



Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular

# Regeneración del endotelio corneal con plasma rico en factores de crecimiento a partir de tejido descartado para trasplante

Trabajo de investigación para optar al grado de Doctor por la  
Universidad de Oviedo realizado por

**Sergio Alonso Alonso**

Directores:

Jesús Merayo Lloves

Natalia Vázquez Moreno



## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

<b>1.- Título de la Tesis</b>	
Español/Otro Idioma: Regeneración del endotelio corneal con plasma rico en factores de crecimiento a partir de tejido descartado para trasplante	Inglés: Recovery of corneal endothelium with plasma rich in growth factors using tissue discarded for transplantation
<b>2.- Autor</b>	
Nombre: Sergio Alonso Alonso	
Programa de Doctorado: Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular	
Órgano responsable:	

### RESUMEN (en español)

La insuficiencia endotelial es una de las principales causas de ceguera corneal en los países desarrollados. Engloba patologías que pueden ser congénitas o adquiridas, e incluye enfermedades curables con colirios, y enfermedades cuyo tratamiento es el trasplante corneal en cualquiera de sus versiones, el trasplante clásico de córnea completa (trasplante penetrante) o el trasplante de la parte posterior de la córnea (trasplante endotelial).

Sin embargo, tanto los trasplantes penetrantes como los más novedosos trasplantes endoteliales requieren de tejido corneal de donante cadáver. El modelo Español de Trasplantes es líder mundial en la obtención y trasplante de órganos y tejidos. Pese a esto, el envejecimiento de la población, que conlleva un aumento de las enfermedades a tratar y una disminución de la calidad del tejido corneal donado, ha llevado a un desequilibrio entre las córneas donadas y las necesarias para trasplante, aumentando la lista de espera del trasplante endotelial. En esta situación, la investigación en medicina regenerativa ocular surge como respuesta para aumentar los tratamientos disponibles.

En el presente trabajo de investigación se ha desarrollado una metodología que permite obtener cultivos de Células Endoteliales Corneales (CECs), para tratar la patología endotelial y contribuir a disminuir la lista de espera del trasplante endotelial. Esta metodología utiliza tejidos descartados para trasplante y un medio de cultivo simple, libre de componentes xenogénicos, en el que el Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) se utiliza como único suplemento del medio de cultivo, aumentando la seguridad y sencillez del sistema de cultivo.

En primer lugar, se estudió la capacidad de los diferentes tejidos descartados (anillos endoteliales corneales y endotelios completos de diferentes características) para generar cultivos de CECs con un medio de cultivo convencional, obteniéndose resultados similares que permitieron no hacer distinción entre tejidos en los experimentos sucesivos. Posteriormente, a través de una caracterización exhaustiva utilizando técnicas de inmunocitoquímica, análisis morfológico, mediciones de la Resistencia Eléctrica Transendotelial (TER), RNA-seq y qPCR, se comparó los cultivos de CECs obtenidos utilizando el medio de cultivo convencional y el libre de factores xenogénicos desarrollado en este estudio. Los resultados obtenidos evidenciaron una expansión similar a la obtenida con la metodología de cultivo tradicional y que las CECs mantienen el fenotipo celular fisiológico.

Además, se estudió la funcionalidad de los cultivos tanto *in vitro*, mediante la evaluación de la actividad bomba metabólica  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa, como *ex vivo*, con un modelo organotípico de disfunción endotelial, donde las CECs cultivadas evidenciaron la viabilidad de su aplicación clínica.



Finalmente, se estudió la posibilidad de implementar el sistema de cultivo desarrollado en una instalación que cumple con las Normas de Correcta Fabricación (NCF) para la elaboración de Medicamentos de Terapia Avanzada (MTA). Se realizó un primer lote de producción siguiendo la Guía de Fabricación redactada, teniéndose que realizar ajustes en la cantidad del material fungible. Posteriormente, se realizó la producción de tres lotes, que cumplieron los requisitos de calidad especificados en la Guía de Fabricación. Lo que indica que sería posible la aplicación clínica de los cultivos de CECs obtenidos con la metodología desarrollada.

En conclusión, la traslación clínica del presente estudio contribuiría a paliar el problema de la escasez de donantes de tejido corneal, y a disminuir la lista de espera del trasplante endotelial, utilizando tejido descartado para trasplante. Además, ampliaría la cartera de terapias disponibles para el tratamiento de la insuficiencia endotelial corneal, siendo su única limitación que el número de pacientes tratados va a depender directamente de la cantidad y calidad del tejido descartado.

### RESUMEN (en Inglés)

Endothelial dysfunction is one of the main causes of corneal blindness in developed countries. It involves pathologies that can be congenital or acquired, and includes diseases treatable with eye drops, and diseases whose treatment is corneal transplantation in any of its versions, the classic transplantation of the entire cornea (penetrating transplantation) or transplantation of the posterior part of the cornea (endothelial transplantation).

However, both penetrating transplants and the newest endothelial transplants require corneal tissue from cadaveric donors. The Spanish transplant model is a world leader in organ and tissue procurement and transplantation. Nevertheless, the aging of the population, which leads to an increase in the number of diseases to be treated and a decrease in the quality of donated corneal tissue, has led to an imbalance between donated corneas and those needed for transplantation, increasing the waiting list for endothelial transplantation. In this situation, research in ocular regenerative medicine has emerged as a response to increase the available treatment options.

A methodology for culturing corneal endothelial cells (CECs) to treat endothelial pathology and reduce the waiting list for endothelial transplantation was developed in this study. This methodology uses tissue discarded for transplantation and a simple culture medium, free of xenogenic components, in which Plasma Rich in Growth Factors (PRGF) is used as the only supplement to the culture medium, increasing the safety and simplicity of the culture system.

First, the capacity of the different discarded tissues (corneal endothelial rings and complete endothelia of different characteristics) to generate CECs cultures with conventional culture medium was studied, obtaining similar results that allowed no distinction to be made between tissues in successive experiments. Subsequently, through an exhaustive characterization using immunocytochemical techniques, morphological analysis, Transendothelial Electrical Resistance (TER) measurements, RNA-seq and qPCR, we compared the cultures of CECs obtained using the conventional culture medium and the one free of xenogeneic factors developed in this study. The results obtained evidenced a similar expansion to that obtained with the traditional culture methodology and that the CECs maintain the physiological cell phenotype.

In addition, the functionality of the cultures was studied both in vitro, by evaluating the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase metabolic pump activity, and ex vivo, with an organotypic model of endothelial dysfunction, where the cultured CECs evidenced the feasibility of their clinical application.

Finally, the possibility of implementing the developed culture system in a GMP-compliant facility for the production of Advanced Therapy Medicinal Product (ATMP) was studied. A





Universidad de Oviedo

first mock production was carried out following the written manufacturing guide, adjusting the quantity of consumables. Subsequently, three batches were produced, which met the quality requirements specified in the manufacturing guide. This indicates that the clinical application of the CEC cultures obtained with the methodology developed would be possible.

In conclusion, the clinical translation of the present study would contribute to alleviate the problem of the shortage of corneal tissue donors, and to reduce the waiting list for endothelial transplantation, using tissue discarded for transplantation. Furthermore, it would broaden the portfolio of therapies available for the treatment of corneal endothelial insufficiency, the only limitation being that the number of patients treated will depend directly on the quantity and quality of the tissue discarded.

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO  
EN \_\_\_\_\_



*“Somos como enanos colocados a hombros de gigantes”*

- Jean de Salisbury





# Agradecimientos

*“La ciencia y la vida cotidiana no pueden ni deben separarse”*

- Rosalind Franklin



## Agradecimientos

## Agradecimientos

El proceso de realización de esta tesis doctoral ha sido, definitivamente, un viaje. A lo largo de él, he tenido la fortuna de estar rodeado por personas que me han ayudado a labrar mi propio camino. Sin ellos, probablemente, no hubiese alcanzado el final, por eso me gustaría que este trabajo de investigación comience dedicándoos mis más sinceros agradecimientos.

En primer lugar, a mis directores: A la doctora Natalia Vázquez por su inconmensurable paciencia, diligencia y buen hacer, por las incontables horas revisando este, y otros trabajos y por la confianza de elegirme como su primer doctorando. Al profesor Jesús Merayo, por ser un ejemplo de carácter, carisma, trayectoria profesional e ingenio. Y a ambos los dos por haberme encaminado en la dirección correcta siempre que me desvíe y permitirme compaginar el desarrollo de la tesis con mi pasión: el remo.

En segundo lugar, al grupo de medicina regenerativa en la superficie ocular de la FIO. A Álvaro por enseñarme, no sólo a desenvolverme en el mundo de la ciencia siendo escéptico y crítico, sino también a ser una persona culta. Sin ti no hubiese escuchado una ópera, no sabría nada de música clásica y ni tampoco cuanto tiempo debes mantener la bolsa de té en el agua hirviendo, por todo ello, gracias, Álvaro. A Manu, por ser mi profesor en mil y una técnicas del laboratorio, la persona que me enseñó lo poco que sé de diseño gráfico, mi compañero de laboratorio y de aventuras por el mundo, y, por supuesto, mi amigo. A Mairobi por ser la primera en trabajar en equipo conmigo, incluirme en todos sus experimentos, por su “buena onda” y por enseñarme como desenvolverme en el laboratorio.

También agradecer al resto de compañeros de la FIO, los que aún están y los que ya se han ido, vuestra inestimable ayuda, siempre dispuestos a colaborar, darme truquillos con los experimentos, consejos, buena conversación y apoyo. Gracias Cristina, Nacho, Enol, Rosa, Susana, Carla, Claudia, Nagore, Carlota, Ana, Montse, Lydia y Héctor (si de manera inadvertida omití a alguien, por favor sabed que mi gratitud es para vosotros también).

A todo el personal del Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias, especialmente a Sara, Marta y Rosana por ser un ejemplo de trabajo.

Al Instituto Oftalmológico Fernández–Vega como institución, puesto que sin su apoyo esta tesis no hubiese sido posible. También a su personal, porque todos han contribuido de algún modo en la realización de este trabajo, en especial a Ramón y Silvia que me han ayudado incontables veces con el papeleo de convocatorias y justificaciones.

## Agradecimientos

Me gustaría expresar mi gratitud, además, a todos los donantes de tejidos y a sus familias, vuestra solidaridad es un ejemplo para la sociedad y sin ella, este trabajo no sería posible.

Mi gratitud va también para el profesor Laszlo Nagy y los miembros de sus laboratorios en Debrecen y en St. Pete. Un trocito de mi corazón está con vosotros.

Gracias a mis amigos, miembros integrantes de la sociedad gastronómica los sastres y del grupo de montaña a bloke, pasar el rato con vosotros hace que todo lo malo sea menos malo y todo lo bueno sea mejor. Sois mi terapia, y si aún estoy cuerdo (cosa que dudo) es gracias a vosotros. Gracias a Nora en concreto, por compartir su magia creativa conmigo y ayudarme con el diseño de la tesis.

A Mari sin la que nunca hubiese superado el instituto.

Por último, a los miembros de mi familia cuyo amor y confianza en mí se mantienen firmes, incluso en los momentos en los que yo mismo he dudado:

A la gente del Fresno, Regueral y Ferrol, a pesar de que nos veamos con poca frecuencia saber que puedo visitaros y desconectar de los problemas diarios es un rayito de luz en el día a día.

A mi madrina, que me inició en eso de subir montañas, que contagia a todos con su carácter alegre y que cuenta las mejores anécdotas del mundo, es imposible no reírse contigo Madri, gracias de corazón.

A mi padre, aunque es un tipo duro, siempre encuentra la manera de demostrarme su afecto y apoyo incondicional, con su mera presencia, es capaz de animarme. Tú me has inculcado la importancia de la autoestima y que para ser autodidacta lo único que se necesita es dedicación y esfuerzo. Gracias, papá.

Gracias a Leo por forjar este equipo conmigo, por la Fe inquebrantable que depositas en mí, por aguantarme cuando me pongo inaguantable y por la valentía de decirme lo que necesito, aunque con frecuencia, no quiera escucharlo.

Por último, la persona a la que me gustaría dedicar este manuscrito, gracias, Maribel. Los valores que me inculcaste desde niño, esfuerzo, sacrificio, humildad, honradez... me han ayudado infinidad de veces a lo largo de la vida. Siempre fuiste una madre sargento, pero aun así tuviste la capacidad de hacerme sentir infinitamente querido. Albert Einstein decía “predicar con el ejemplo no es la mejor forma de enseñar, es la única forma de enseñar” y

## Agradecimientos

en eso de ser buena persona, tú lo llevas a rajatabla, por todo ello, una y mil veces gracias, mamá.

Mis más sinceras gracias a todos los nombrados y a los que, sin mala intención, he podido olvidar mencionar. Sabed que esta tesis es un poco vuestra también, espero ser capaz de haceros sentir orgullosos.

## Agradecimientos

# Índice

Abreviaturas .....	1
Resumen.....	7
Motivación, pregunta de investigación y estructura de la tesis.....	11
Introducción.....	17
El sistema visual .....	19
La córnea.....	20
Morfología de la córnea.....	20
Composición corneal: bioquímica e histología.....	21
Inervación corneal.....	26
Vascularización corneal.....	27
Biomecánica corneal .....	27
Función corneal.....	28
El endotelio corneal .....	30
Morfología endotelial .....	30
Función endotelial .....	31
Patología del endotelio corneal .....	32
Epidemiología de la patología endotelial corneal.....	34
Requisitos del tejido corneal donado .....	35
Medicina regenerativa del endotelio corneal.....	36
Regulación de los Medicamentos de Terapia Avanzada (MTA) y Normas de Correcta Fabricación (NCF).....	50
Regulación de Medicamentos de Terapia Avanzada (MTA).....	50
Normas de Correcta Fabricación (NCF) .....	52
Justificación.....	55
Hipótesis .....	59
Objetivos .....	63
Material y método.....	67
1. Obtención de cultivos de Células Endoteliales Corneales (CECs), a partir de tejidos descartados para su uso clínico, con un medio de cultivo libre de factores xenogénicos .....	69

## Índice

1.1.	Tejidos empleados para el estudio.....	69
1.2.	Obtención y cultivo de Células Endoteliales Corneales (CECs) 69	
1.3.	Caracterización de los cultivos obtenidos .....	72
2.	Estudio de la funcionalidad de los cultivos de Células Endoteliales Corneales (CECs) .....	79
2.1.	Estudio de la funcionalidad <i>in vitro</i> de los cultivos de Células Endoteliales Corneales (CECs).....	79
2.2.	Estudio de la funcionalidad de los cultivos de Células Endoteliales Corneales (CECs) en un modelo organotípico <i>ex vivo</i> de disfunción endotelial .....	79
3.	Traslación de la terapia celular desarrollada a las Normas de Correcta Fabricación (NCF).....	84
4.	Análisis Estadístico .....	88
	Resultados.....	89
1.	Obtención de cultivos de Células Endoteliales Corneales (CECs), a partir de tejidos descartados para su uso clínico, con un medio de cultivo libre de factores xenogénicos .....	91
1.1.	Obtención y cultivo de Células Endoteliales Corneales (CECs) a partir de tejidos descartados para su uso clínico.....	91
1.2.	Obtención de cultivos de Células Endoteliales Corneales (CECs), con un medio de cultivo libre de factores xenogénicos .....	94
2.	Estudio de la funcionalidad de los cultivos de Células Endoteliales Corneales (CECs) .....	106
2.1.	Estudio de la funcionalidad <i>in vitro</i> de los cultivos de Células Endoteliales Corneales (CECs).....	106
2.2.	Estudio de la funcionalidad de los cultivos de Células Endoteliales Corneales (CECs) en un modelo organotípico <i>ex vivo</i> de disfunción endotelial .....	106
3.	Traslación de la terapia celular desarrollada a las Normas de Correcta Fabricación (NCF).....	118
	Discusión .....	121
	Perspectivas de futuro .....	139
	Conclusiones .....	143
	Bibliografía.....	147



## Índice

Divulgación científica.....	189
Financiación .....	199
Anexos .....	203

# Índice



# Abreviaturas

*“Un hombre que se atreve a perder una hora de tiempo no  
ha descubierto el valor de la vida”*

- Charles Darwin

## Abreviaturas

**A**

ATMP *Advanced Therapy Medicinal Products*  
(Medicamentos de Terapia Avanzada)

**C**

CECs Células Endoteliales Corneales

CCST Centro Comunitario de Sangre y de Tejidos de Asturias

CEIM Comité de Ética de la Investigación del Principado de Asturias

**D**

DAPI 4',6-diamidino-2-fenilindol

DEGs *Differentially Expressed Genes* (Genes Diferencialmente Expresados)

DLEK *Deep Lamellar Endothelial Keratoplasty*  
(Queratoplastia Endotelial Lamelar Profunda)

DMEK *Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty*  
(Queratoplastia Endotelial de Membrana de Descemet)

DSAEK *Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty* (Queratoplastia Endotelial Automatizada con «pelado» de Membrana de Descemet)

DSEK *Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty*  
(Queratoplastia Endotelial con «pelado» de la Membrana de Descemet)

DSO / DWEK *Descemet's Stripping Only/ Descemetorhexis Stripping Without Endothelial Keratoplasty*  
(Descemetorhexis sin Queratoplastia Endotelial)

## Abreviaturas

### E

EMA European Medicines Agency (Agencia Europea de Medicamentos)

ESM Error Estándar de la Media

### F

FIO Fundación de Investigación Oftalmológica

### H

H-E Tinción de Hematoxilina-Eosina

### I

ICH *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (Consejo Internacional de Armonización de los requisitos técnicos para el registro de medicamentos de uso humano)

### M

MTA Medicamento de Terapia Avanzada

### N

NCF Normas de Correcta Fabricación

### O

ONT Organización Nacional de Trasplantes

OCT *Optical Coherence Tomography* (Tomografía de Coherencia Óptica)

**P**

PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Análisis de Componentes Principales)
PK	<i>Penetrating Keratoplasty</i> (Queratoplastia Penetrante)
PLK	<i>Posterior Lamellar Keratoplasty</i> (Queratoplastia Lamelar Posterior)
PMDA	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (Agencia de Dispositivos Médicos y Farmacéuticos)
PNT	Procedimiento Normalizado de Trabajo
PRGF	<i>Plasma Rich in Growth Factors</i> (Plasma Rico en Factores de Crecimiento)
PRK	<i>Photorefractive Keratectomy</i> (Queratotomía Fotorrefractiva)

**R**

ROCK	<i>Rho-associated Protein Kinase</i> (Proteína Quinasa Asociada a Rho)
------	------------------------------------------------------------------------

**S**

SBF	Suero Bovino Fetal
SRA	<i>Sequence Read Archive</i> (Archivo de lectura de secuencias)

**T**

TER	<i>Transendothelial Electrical Resistance</i> (Resistencia Eléctrica Transendotelial)
-----	---------------------------------------------------------------------------------------

**Z**

ZO-1	<i>Zónula Occludens-1</i>
------	---------------------------



## Abreviaturas



# Resumen

*“La Ciencia más útil es aquella cuyo fruto es el más comunicable”*

- Leonardo Da Vinci

## Resumen

La insuficiencia endotelial es una de las principales causas de ceguera corneal en los países desarrollados. Engloba patologías que pueden ser congénitas o adquiridas, e incluye enfermedades curables con colirios, y enfermedades cuyo tratamiento es el trasplante corneal en cualquiera de sus versiones, el trasplante clásico de córnea completa (trasplante penetrante) o el trasplante de la parte posterior de la córnea (trasplante endotelial).

Sin embargo, tanto los trasplantes penetrantes como los más novedosos trasplantes endoteliales requieren de tejido corneal de donante cadáver. El modelo Español de Trasplantes es líder mundial en la obtención y trasplante de órganos y tejidos. Pese a esto, el envejecimiento de la población, que conlleva un aumento de las enfermedades a tratar y una disminución de la calidad del tejido corneal donado, ha llevado a un desequilibrio entre las córneas donadas y las necesarias para trasplante, aumentando la lista de espera del trasplante endotelial. En esta situación, la investigación en medicina regenerativa ocular surge como respuesta para aumentar los tratamientos disponibles.

En el presente trabajo de investigación se ha desarrollado una metodología que permite obtener cultivos de Células Endoteliales Corneales (CECs), para tratar la patología endotelial y contribuir a disminuir la lista de espera del trasplante endotelial. Esta metodología utiliza tejidos descartados para trasplante y un medio de cultivo simple, libre de componentes xenogénicos, en el que el Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) se utiliza como único suplemento del medio de cultivo, aumentando la seguridad y sencillez del sistema de cultivo.

En primer lugar, se estudió la capacidad de los diferentes tejidos descartados (anillos endoteliales corneales y endotelios completos de diferentes características) para generar cultivos de CECs con un medio de cultivo convencional, obteniéndose resultados similares que permitieron no hacer distinción entre tejidos en los experimentos sucesivos. Posteriormente, a través de una caracterización exhaustiva utilizando técnicas de inmunocitoquímica, análisis morfológico, mediciones de la Resistencia Eléctrica Transendotelial (TER), RNA-seq y qPCR, se comparó los cultivos de CECs obtenidos utilizando el medio de cultivo convencional y el libre de factores xenogénicos desarrollado en este estudio. Los resultados obtenidos evidenciaron una expansión similar a la obtenida con la metodología de cultivo tradicional y que las CECs mantienen el fenotipo celular fisiológico.

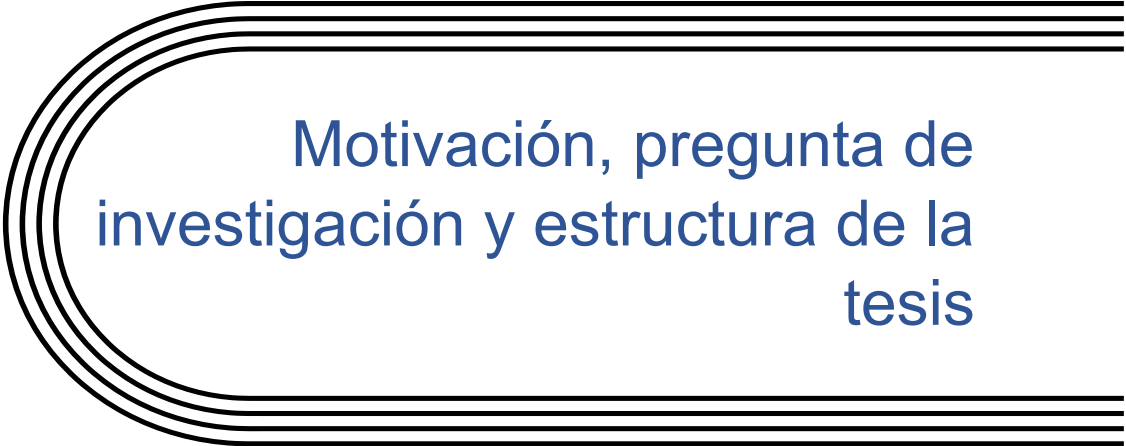
Además, se estudió la funcionalidad de los cultivos tanto *in vitro*, mediante la evaluación de la actividad bomba metabólica  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa, como ex

## Resumen

*vivo*, con un modelo organotípico de disfunción endotelial, donde las CECs cultivadas evidenciaron la viabilidad de su aplicación clínica.

Finalmente, se estudió la posibilidad de implementar el sistema de cultivo desarrollado en una instalación que cumple con las Normas de Correcta Fabricación (NCF) para la elaboración de Medicamentos de Terapia Avanzada (MTA). Se realizó un primer lote de producción siguiendo la guía de fabricación redactada, teniéndose que realizar ajustes en la cantidad del material fungible. Posteriormente, se realizó la producción de tres lotes, que cumplieron los requisitos de calidad especificados en la Guía de Fabricación. Lo que indica que sería posible la aplicación clínica de los cultivos de CECs obtenidos con la metodología desarrollada.

En conclusión, la traslación clínica del presente estudio contribuiría a paliar el problema de la escasez de donantes de tejido corneal, y a disminuir la lista de espera del trasplante endotelial, utilizando tejido descartado para trasplante. Además, ampliaría la cartera de terapias disponibles para el tratamiento de la insuficiencia endotelial corneal, siendo su única limitación que el número de pacientes tratados va a depender directamente de la cantidad y calidad del tejido descartado.



## Motivación, pregunta de investigación y estructura de la tesis

*“La ciencia siempre vale la pena porque sus descubrimientos, tarde o temprano, siempre se aplican”*

- Severo Ochoa de Albornoz

Motivación, pregunta de investigación y estructura de la tesis



Tras concluir la licenciatura en Biología en la Universidad de Oviedo en 2017, un creciente interés en el campo de la biomedicina regenerativa me llevó a elegir el máster del mismo nombre en la Universidad de Granada. Al regresar a Asturias al año siguiente, tuve la oportunidad de realizar el Máster en Terapias Avanzadas y Medicina Regenerativa en la Fundación de Investigación Oftalmológica (FIO), título propio de la Universidad de Oviedo.

En la FIO, me incorporé al Grupo de Medicina Regenerativa de la Superficie Ocular, donde presencié de primera mano, los desafíos a los que se enfrentan los científicos que trabajan en este campo, así como la satisfacción de realizar una ciencia pragmática cercana a la práctica clínica, capaz de ofrecer soluciones a los problemas médicos de la población.

El grupo de Medicina Regenerativa de la Superficie Ocular de la FIO, busca desarrollar herramientas terapéuticas, como alternativa a los trasplantes convencionales, para el tratamiento de patologías oculares no resueltas, utilizando tejidos no trasplantables.

En el momento de incorporarme al grupo de investigación, este había desarrollado un endotelio corneal bioingenierizado, mediante el cultivo de las Células Endoteliales Corneales (CECs) sobre una membrana de colágeno tipo I, utilizando un medio de cultivo convencional que incluye el uso de factores xenogénicos.

Además, se había desarrollado un epitelio corneal bioingenierizado, mediante el cultivo de las células madre limbares sobre una membrana de Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF, *Plasma Rich in Growth Factors*), siendo en este caso el medio de cultivo utilizado para la expansión celular, un medio de cultivo libre de factores xenogénicos basado en el PRGF.

Estos hechos, junto con la publicación de los resultados de un estudio, en el que se demostraba la eficacia de una inyección de CECs expandidas *in vitro* con un medio de cultivo convencional, en el tratamiento de la insuficiencia endotelial corneal, nos llevó al planteamiento de la siguiente pregunta de investigación ¿es posible simplificar la herramienta terapéutica desarrollada hasta el momento para el tratamiento de las insuficiencias endoteliales, eliminando el uso del soporte y cultivando las CECs humanas en un medio de cultivo libre de factores xenogénicos?.

Hay que tener en cuenta, que la insuficiencia endotelial corneal es una de las principales causas de ceguera corneal en los países desarrollados y que su único tratamiento eficaz, en etapas avanzadas, es el trasplante corneal en cualquiera de sus versiones. Sin embargo, la disponibilidad limitada de donantes hace que la demanda de tejido corneal supere a la oferta,

surgiendo la investigación en medicina regenerativa ocular como respuesta para aumentar los recursos de tratamiento disponibles.

El presente trabajo de investigación se ha desarrollado siguiendo el método científico y se ha estructurado en tres grandes bloques:

### **Bloque 1: Introducción y Contexto**

Este primer bloque presenta una introducción general sobre la córnea y el endotelio corneal. A continuación, se aborda las causas y los tratamientos médicos y quirúrgicos convencionales de la insuficiencia endotelial y los tratamientos alternativos a los trasplantes convencionales. También se describen los problemas a los que se enfrentan estos tratamientos alternativos que incluyen el cultivo celular y que se categorizan como Medicamentos de Terapias Avanzadas (MTA) y se discute la regulación que han de cumplir. Al final de este bloque se plantean la justificación, la hipótesis de trabajo y los objetivos.

### **Bloque 2: Trabajo Experimental**

Este bloque comprende los apartados de material y método, así como los resultados derivados del trabajo experimental. En la sección de material y método, se detallan los tipos de tejidos utilizados en los experimentos y las técnicas experimentales empleadas. En la sección de resultados se presentan y analizan los datos obtenidos del trabajo experimental. Se incluyen gráficas, tablas, y la estadística realizada para respaldar los resultados obtenidos

Ambos apartados se encuentran organizados en 3 secciones:

En la primera sección, un primer estudio describe la obtención de cultivos de CECs a partir de tejidos descartados (anillos endoteliales corneales y endotelios completos con diferentes características) con el medio convencional utilizado para el cultivo de esta estirpe celular, y se realiza la caracterización de los cultivos obtenidos mediante técnicas de inmunocitoquímica y la medida de la Resistencia Eléctrica Transendotelial (TER, *Transendothelial Electrical Resistance*). Posteriormente, un segundo estudio, en el que no se realizó distinción entre tejidos descartados debido a los resultados obtenidos en el primer experimento, realiza una caracterización exhaustiva utilizando técnicas de inmunocitoquímica, análisis morfológico, TER, RNA-seq y qPCR, y compara los cultivos de CECs obtenidos con el medio de cultivo convencional y con un medio de cultivo libre de factores xenogénicos.

En la segunda sección, se demuestra la funcionalidad de los cultivos de CECs obtenidos con un medio libre de factores xenogénicos en estudios *in vitro* y *ex vivo*.

Finalmente, en la tercera sección, se realizan los cultivos de CECs con un medio de cultivo libre en factores xenogénicos en una instalación y bajo un sistema de calidad que respetan la estricta regulación existente para la fabricación de cualquier MTA que aspire a ser utilizado en la práctica clínica.

### **Bloque 3: Discusión, Perspectivas Futuras y Conclusiones**

Este bloque finaliza el trabajo con una discusión general de los resultados obtenidos que detalla el impacto de las investigaciones realizadas, comparando los hallazgos con hipótesis previas, teorías existentes, y otros trabajos en este campo. Además, se plantean perspectivas futuras relacionadas con la investigación, abriendo la puerta a posibles desarrollos y aplicaciones. Finalmente, se presentan las conclusiones que se desprenden de la totalidad de la investigación.

Motivación, pregunta de investigación y estructura de la tesis



# Introducción

*“Maravillarse es el primer paso para el descubrimiento”*

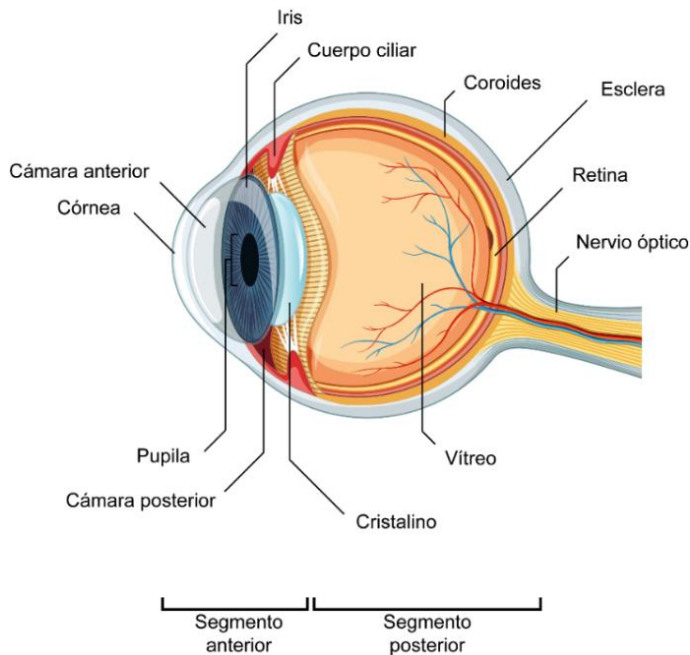
- Luis Pasteur



## El sistema visual

El sistema visual es un intrincado conjunto de estructuras y procesos que permite la percepción visual. Este sistema está compuesto principalmente por el ojo, que actúa como receptor y transformador de la luz visible, y el nervio óptico, que transmite esta información al cerebro, donde se interpreta y se convierte en imágenes visuales. El cerebro integra la información visual con otros sentidos para formar una imagen completa y significativa del entorno<sup>1</sup>.

El ojo presenta una forma prácticamente esférica que se puede dividir en dos segmentos principales: el segmento anterior y el segmento posterior (Figura 1). El segmento anterior, ubicado en la parte frontal del ojo, constituye aproximadamente 1/6 del volumen ocular y está compuesto por la córnea, la cámara anterior, el iris, la pupila, la cámara posterior, el cristalino y el cuerpo ciliar. Por su parte, el segmento posterior, más grande, comprende las restantes 5/6 partes del ojo, e incluye estructuras como el vítreo, la retina, la coroides y la esclerótica o esclera. Este segmento, se encuentra fusionado con el segmento anterior<sup>2,3</sup> y conectado al nervio óptico.



**Figura 1.** El ojo y sus estructuras.



## La córnea

La córnea es una estructura transparente ubicada en la parte frontal del ojo que cubre la cámara anterior, el iris y la pupila. La córnea, junto a la cámara anterior y el cristalino, se encargan de la refracción de la luz direccionándola y enfocándola en la retina. La córnea es responsable de 2/3 partes de la capacidad de refracción del ojo<sup>4,5</sup>. En humanos, el poder refractivo de la córnea es de aproximadamente 43 dioptrías<sup>6</sup>, contribuyendo así, a la mayor parte del poder de enfoque del ojo. El enfoque de la córnea es fijo, por ello, para poder modificar el enfoque y permitir ver con claridad objetos cercanos y lejanos, los músculos ciliares actúan sobre el cristalino ajustando su capacidad refractiva. Estos músculos efectúan cambios en la curvatura del cristalino por tensión mecánica, lo que ocasiona el cambio de capacidad refractiva, a este fenómeno se le denomina acomodación<sup>4</sup>.

Desde el punto de vista histológico, la córnea se clasifica como un órgano debido a su composición de múltiples tejidos, incluyendo un epitelio externo, un estroma central y un epitelio interno, también conocido como endotelio. Sin embargo, en el ámbito de los trasplantes, la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) la considera un tejido. Por tanto, en el transcurso de este trabajo de investigación, se utilizará de manera indistinta el término "órgano" o "tejido" para referirnos a la córnea, según el contexto.

### Morfología de la córnea

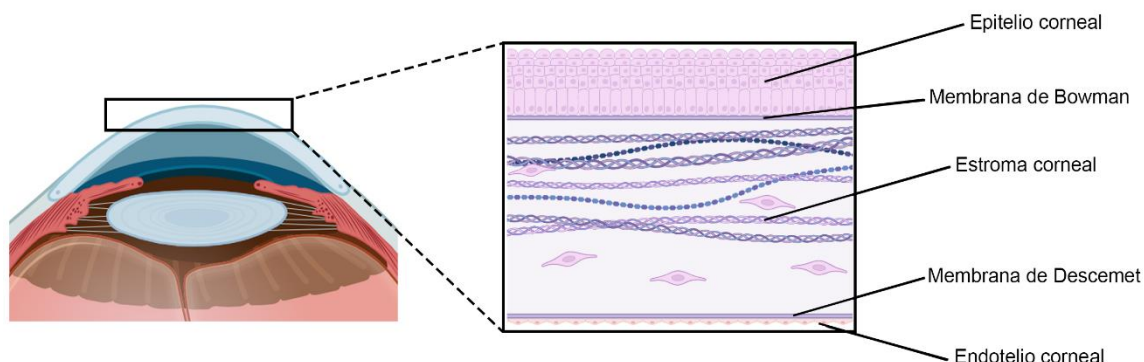
La córnea en adultos tiene una forma elíptica, con un diámetro vertical de aproximadamente 11,5 mm y un diámetro horizontal de alrededor de 12 mm<sup>1,4</sup>. Su espesor también varía, siendo de 0,5-0,6 mm en la zona central y de 0,7-0,9 mm en la zona periférica. Estas diferencias se deben a que la curvatura de la superficie posterior es más pronunciada que la de la superficie anterior<sup>5</sup>.

La cara anterior de la córnea se encuentra en contacto con la lágrima, mientras que la cara posterior está bañada por el fluido que ocupa la cámara anterior, denominado humor acuoso. El perímetro de la córnea en su parte exterior se denomina limbo esclerocorneal y se continúa con la esclerótica y la conjuntiva bulbar. En su parte interior, el perímetro de la córnea linda con la red trabecular y el canal de Schlemm, zona encargada de regular la producción y reabsorción del humor acuoso de la cámara anterior<sup>4</sup>.

## Composición corneal: bioquímica e histología

La córnea presenta una composición dual, consistente en componentes celulares y acelulares. La fracción acelular constituye aproximadamente el 78% de la córnea siendo predominantemente agua; también se encuentran proteínas, principalmente queratina y colágeno<sup>7</sup>; lípidos; ácido ascórbico; riboflavina; y diversas sales. La fracción celular comprende las células epiteliales corneales, los queratocitos ubicados en el estroma, y las Células Endoteliales Corneales (CECs), un epitelio que recubre la cara interna de la córnea.

Histológicamente, la córnea se estructura en cinco capas (Figura 2), ordenadas de la más externa a la más interna: el epitelio, la membrana de Bowman, el estroma, la membrana de Descemet y el endotelio corneal. Aunque en 2013 se propuso la existencia de una posible sexta capa entre el estroma y la membrana de Descemet, conocida como membrana de Dua o pre-Descemet, este hallazgo ha generado controversias y continúa siendo objeto de estudio<sup>8</sup>. A continuación, se describen cada una de las capas de la córnea humana.



**Figura 2.** Esquema representativo de la estructura corneal con sus 5 capas diferenciadas.

### *Epitelio corneal:*

El epitelio corneal está compuesto por células epiteliales escamosas, estratificadas y no queratinizadas. Representa aproximadamente el 5% del espesor total de la córnea y tiene un grosor de alrededor de 50-56  $\mu\text{m}$ . En la zona central del epitelio corneal, se encuentran entre 5 y 7 capas de células, mientras que en la periferia hay entre 8 y 10 capas. Según la ubicación en el estrato<sup>9</sup>, se pueden distinguir tres tipos de células: células superficiales, células alares y células basales columnares.

## Introducción

- Las células superficiales, también conocidas como células escamosas o apicales, constituyen las capas más superficiales del epitelio corneal. Son células poligonales planas con un diámetro de 40-60  $\mu\text{m}$  y un grosor de 2-6  $\mu\text{m}$ . Estas células están en contacto directo con la lágrima y su superficie está cubierta de microvellosidades que aumentan la superficial total<sup>10</sup>. Esto facilita el intercambio activo de oxígeno y nutrientes entre las células del epitelio corneal y la lágrima.

- Las células alares, también conocidas como células aladas, se encuentran por debajo de las células superficiales. Reciben este nombre debido a que presentan prolongaciones en forma de ala. Estas células forman de 2 a 3 capas y están interdigitadas entre sí. Tienen pocos orgánulos citoplasmáticos en comparación con las células superficiales.

- Las células basales o columnares son el estrato más interno del epitelio corneal. Forman una monocapa de células cuboides que se apoyan sobre una membrana basal. Estas células se originan a partir de células amplificadoras transitorias que migran desde el limbo esclerocorneal. Son células epiteliales corneales con actividad mitótica y son responsables de la renovación del epitelio corneal<sup>9</sup>. Las células basales tienen una mayor cantidad de orgánulos intracelulares en comparación con las células alares y superficiales. Su núcleo es prominente. Estas células secretan una membrana basal de aproximadamente 75 nm de espesor. Bajo el microscopio electrónico de transmisión, se pueden distinguir dos zonas en la membrana basal: la lámina lúcida, que es una capa más clara y cercana a las células (aproximadamente 25 nm de espesor), y la lámina densa, que es una capa más oscura (aproximadamente 50 nm de espesor). Los principales componentes de la membrana basal son el colágeno tipo IV y la laminina<sup>9</sup>. Esta membrana basal proporciona soporte para que las células puedan migrar, además, establece la polaridad de las células epiteliales con lo que contribuye a mantener un epitelio corneal estratificado bien organizado.

El epitelio corneal, junto con la película lagrimal, desempeña un papel importante en el mantenimiento de una superficie corneal ópticamente lisa. Además, una función esencial del epitelio corneal es actuar como barrera protectora contra agresiones externas. Las fuertes uniones intercelulares presentes en el epitelio corneal dificultan el paso de sustancias químicas hacia las capas internas de la córnea. Asimismo, evita que la lágrima penetre fácilmente en el estroma, lo cual podría ocasionar edema e interferir con la transmisión de la luz a través de la córnea.

Las células epiteliales corneales están conectadas mediante tres tipos de uniones: desmosomas, uniones comunicantes o en hendidura (*gap junctions*) y uniones focales estrechas (*tight junctions*). Las células basales se unen a la membrana basal a través de hemidesmosomas, que son complejos de unión muy fuertes. Los hemidesmosomas están compuestos por fibrillas de colágeno tipo VII, conocidas como fibras de anclaje, que conectan estas células a la membrana basal, la membrana de Bowman y el estroma anterior mediante placas de colágeno tipo IV, tipo VII y laminina<sup>11</sup>.

El epitelio corneal, al ser la capa más externa de la córnea, está expuesto constantemente a agresiones externas, por lo que la rápida regeneración del epitelio es crucial. La renovación del epitelio corneal ocurre aproximadamente cada 7 días y se produce a partir de células madre que se encuentran en el limbo esclerocorneal. La hipótesis más aceptada para explicar la renovación del epitelio corneal es la del movimiento celular X, Y, Z. Según esta hipótesis, las células madre limbares tienen un movimiento horizontal centrípeto (Y), diferenciándose en células amplificadoras transitorias que migran hacia la capa basal del epitelio corneal. Allí, estas células proliferan y se desplazan verticalmente (X), diferenciándose primero en células alares y luego en células superficiales, que finalmente se desprenden y se eliminan en la lágrima (Z)<sup>12-16</sup>.

#### *La membrana de Bowman:*

La membrana de Bowman es una capa acelular que se encuentra entre el epitelio y el estroma corneal. Tiene un grosor de aproximadamente 12  $\mu\text{m}$  y está compuesta principalmente por fibras de colágeno tipo I, colágeno tipo III y proteoglicanos. Estas fibras de colágeno son sintetizadas por los queratocitos estromales, lo que crea una continuidad entre las fibras de colágeno del estroma y las de la membrana de Bowman. La membrana de Bowman no se regenera después de una lesión y cualquier daño que ocurra en ella puede llevar a un proceso de cicatrización no deseado que concluya en opacidad corneal<sup>17,18</sup>.

La función precisa de la membrana de Bowman no está del todo clara<sup>18</sup>. Se cree que desempeña un papel importante en el mantenimiento de la estructura epitelial, actuando como una barrera física que limita el paso de sustancias. Sin embargo, se ha observado que el epitelio corneal puede formarse y mantenerse incluso en ausencia de la membrana de Bowman. Algunos mamíferos que no poseen esta membrana también presentan una estructura epitelial bien organizada, lo que sugiere que la membrana de Bowman no es esencial para la formación y el mantenimiento del epitelio

corneal, aunque podría desempeñar un papel en la función y la estabilidad de la córnea<sup>19</sup>.

En base a la evidencia disponible, se han propuesto que la membrana de Bowman puede proporcionar soporte estructural al epitelio corneal, ayudando a mantener su forma y función y que puede desempeñar un papel en la regulación del crecimiento celular epitelial, ayudando a controlar la proliferación y diferenciación de las células epiteliales.

### *El estroma corneal:*

El estroma corneal es la capa central de la córnea, tiene un grosor de aproximadamente 500  $\mu\text{m}$  lo que constituye alrededor del 90% del espesor total. Es una estructura compuesta principalmente por una matriz extracelular que alberga colágeno y proteoglicanos. Los queratocitos, fibroblastos corneales, residen en esta matriz<sup>20</sup>.

La matriz extracelular del estroma corneal está compuesta principalmente por colágeno tipo I, acompañado en menor proporción por colágeno tipo III, V y VI<sup>21-23</sup>. Las fibras de colágeno, con un diámetro uniforme, se disponen tridimensionalmente formando entre 200 y 250 láminas que atraviesan la córnea. Estas láminas se organizan oblicuamente en el tercio anterior y de forma paralela en los dos tercios más profundos. Esta disposición especialmente ordenada es responsable de la transparencia de la córnea<sup>24</sup>.

El estroma corneal incluye una proporción significativa de proteoglicanos, especialmente condroitín sulfato y queratán sulfato. Estos proteoglicanos no solo tienen la capacidad de atraer agua y cationes, sino que también se unen de manera organizada a las fibras de colágeno, siendo esenciales para el espaciado y ordenamiento celular en el estroma<sup>25,26</sup>.

Los queratocitos son células de forma estrellada con núcleos alargados y aplanados. Se ubican entre las láminas de colágeno, conectándose entre sí a través de estas láminas. Desempeñan un papel crucial en la homeostasis del estroma corneal al sintetizar colágeno y proteoglicanos. Además, producen enzimas proteolíticas, como las colagenasas, que regulan la síntesis y degradación de la matriz extracelular, contribuyendo a mantener la integridad estructural y funcional del estroma<sup>27</sup>.

### *La membrana de Descemet:*

La membrana de Descemet es una capa acelular que separa el estroma corneal posterior del endotelio corneal subyacente, constituyendo así, la

membrana basal del endotelio corneal. Se trata de una matriz densa, transparente y libre de células. Históricamente recibió el nombre de membrana de Descemet por Jean Descemet, un médico francés, pero también se la conoce como lámina elástica limitante posterior, lámina elástica posterior y membrana de Demours. En la periferia de la córnea, la membrana de Descemet tiene protrusiones que se proyectan hacia la cámara anterior del ojo. Estas proyecciones se conocen como cuerpos de Hassal-Henle. La membrana de Descemet es continua con la red trabecular del canal de Schlemm, y su unión es denominada "línea de Schwalbe"<sup>28</sup>.

El espesor de la membrana de Descemet aumenta con la edad. En el momento del nacimiento, su espesor es de alrededor de 3-4  $\mu\text{m}$ , y en adultos alcanza aproximadamente los 10-12  $\mu\text{m}$  a los 60 años<sup>29</sup>. Al observarla bajo el microscopio electrónico de transmisión, se puede distinguir dos zonas en su estructura, una zona estriada anterior, que se desarrolla durante la vida intrauterina, y una zona no estriada posterior, que se produce durante la vida postnatal<sup>29</sup>.

La composición de la membrana de Descemet incluye lamininas y colágeno<sup>30,31</sup>, siendo este último principalmente colágeno tipo VIII<sup>32,33</sup>. Aunque comparte algunos componentes con otras membranas basales, como el colágeno tipo IV, la membrana de Descemet exhibe una composición única, incorporando también fibronectina, queratán y dermatán sulfato<sup>34</sup>. Se postula que el colágeno tipo VIII forma una estructura reticular hexagonal que facilita el paso de nutrientes del humor acuoso al estroma corneal<sup>35</sup>. Por otro lado, la fibronectina se ha encontrado depositada a lo largo de la membrana de Descemet. Al interactuar con las fibrillas de colágeno, la fibronectina desempeña un papel en la adhesión del estroma y las CECs a la membrana de Descemet y, por lo tanto, ayuda a mantener la arquitectura de la membrana<sup>36</sup>.

La membrana de Descemet desempeña un papel esencial en la estructura y la homeostasis de la córnea, así como en el mantenimiento de su transparencia. La membrana de Descemet ancla el endotelio a la córnea, al tiempo que permite la entrada de nutrientes y macromoléculas en el estroma corneal desde el humor acuoso.

Las alteraciones fisiopatológicas de la membrana de Descemet se observan en enfermedades oculares como la distrofia de Fuchs, la queratopatía bullosa, el queratocono, el glaucoma congénito primario (estrias de Haab), así como en afecciones sistémicas. El daño extenso no reparado de la membrana de Descemet provoca una opacidad corneal grave y pérdida de visión debido a la fibrosis estromal<sup>34</sup>.

En el contexto de la reconstrucción del endotelio corneal, es importante comprender la estructura y función de la membrana de Descemet, ya que esta capa desempeña un papel importante en la adhesión y la integridad del endotelio corneal.

### *El endotelio corneal*

El endotelio corneal es una monocapa celular, íntimamente ligada a la membrana de Descemet que juega un papel vital en mantener la homeostasis y la transparencia de la córnea. Por ser el centro del presente trabajo de investigación se describirá en profundidad en un apartado posterior.

### Inervación corneal

La córnea es uno de los tejidos más densamente inervados y sensibles en el cuerpo humano, con una densidad de terminaciones nerviosas de 300 a 400 veces superior a la de la piel<sup>6</sup>. La inervación corneal es principalmente sensorial y proviene de los nervios nasociliares largos, una de las ramas oftálmicas del nervio trigémino. Estas fibras nerviosas son de tipo sensorial-nociceptivo y tienen una conducción lenta<sup>37</sup>. Este tipo de fibras llegan al limbo corneal, donde forman el plexo limbal, y luego se adentran radialmente en la córnea. Un grupo de fibras nerviosas se dirige hacia el estroma, mientras que otras atraviesan la capa de Bowman y forman plexos sub-basales amielínicos en el epitelio basal<sup>38,39</sup>. Desde estos plexos, emergen fibras nerviosas individuales que terminan en el epitelio superficial como terminaciones nerviosas libres<sup>40,41</sup>.

Además de las fibras sensoriales, existen fibras nerviosas simpáticas que desempeñan una función trófica. Estas fibras provienen del ganglio cervical superior y generalmente se asocian con los vasos sanguíneos en el limbo esclerocorneal, llegando algunos axones hasta el nivel epitelial y subepitelial de la córnea. Las pruebas acumuladas sugieren que los factores tróficos derivados de los nervios sirven a los procesos tróficos y reguladores en curso en el epitelio corneal, y que cuando se liberan de los nervios corneales en condiciones fisiológicas basales estimulan las células epiteliales corneales como parte del proceso normal de mantenimiento tisular y renovación fisiológica<sup>42</sup>. Los resultados de los estudios de co-cultivo *in vitro* sugieren que las neuronas y las células epiteliales de la córnea se apoyan mutuamente mediante la liberación recíproca de sustancias solubles. Por ejemplo, las neuronas del trigémino liberan factores difusibles como son algunos neurotransmisores presentes en la córnea, entre ellos la sustancia

P<sup>43</sup>, catecolaminas<sup>44</sup> y acetilcolina<sup>45,46</sup>, que estimulan el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y la producción de colágeno de tipo VII de las células epiteliales de la córnea<sup>47,48</sup>. A su vez, las células epiteliales corneales liberan factores solubles como el factor de crecimiento nervioso y el factor neurotrófico derivado de la glía que promueven la extensión y supervivencia de las neuritas<sup>49,50</sup>.

### Vascularización corneal

La córnea carece de vasos sanguíneos y vasos linfáticos cuando se encuentra en un estado fisiológico saludable<sup>51</sup>. Sin embargo, algunos vasos se distribuyen por la región del limbo esclerocorneal. En esta zona, los vasos sanguíneos forman el plexo marginal límbico, que consiste en una serie de arcos provenientes de las arterias ciliares anteriores (ramas de la arteria oftálmica), los cuales se anastomosan con terminaciones de la rama facial (proveniente de la arteria carótida externa).

A este estado de avascularización corneal se conoce como privilegio angiogénico<sup>52</sup> y es crucial para una visión adecuada. Se mantiene mediante diversos mecanismos<sup>53-56</sup> que son susceptibles de fallar en situaciones patológicas como lesiones tisulares graves o procesos inflamatorios. Estos procesos patológicos terminan dando lugar a la penetración de vasos sanguíneos y linfáticos desde el limbo hacia la zona central de la córnea<sup>51</sup>. Además la presencia de vasos linfáticos en la córnea es considerada indeseable ya que, en los trasplantes corneales, la enfermedad de ojo seco y en enfermedades alérgicas, los vasos linfáticos facilitan la migración de células presentadoras de antígenos desde la córnea hacia los ganglios linfáticos, contribuyendo a la inducción y la progresión del rechazo del trasplante, el ojo seco y las enfermedades alérgicas<sup>57,58</sup>.

Sin embargo, estudios recientes han cuestionado este concepto demostrando que la linfangiogénesis desempeña un papel beneficioso en la regulación del edema y la transparencia corneal, siendo una parte necesaria de la resolución de la inflamación<sup>59-61</sup>.

### Biomecánica corneal

La estabilidad mecánica de la córnea está determinada por factores externos, que no dependen de la córnea, e internos, que son inherentes a la estructura misma de la córnea. Estos factores actúan como fuerzas que resultan en un equilibrio dinámico<sup>62</sup>.



Entre los factores externos, la presión intraocular es el más importante, ejerciendo una fuerza sobre la cara interna de la córnea<sup>63-65</sup>. Otros factores externos de menor relevancia incluyen la presión atmosférica, que actúa sobre la cara externa de la córnea, los párpados, los músculos extraoculares a través de sus inserciones en la esclera, y el músculo ciliar, que durante la acomodación produce un cambio en el diámetro corneal y en la curvatura.

Los factores internos son la elasticidad, el espesor y la densidad y entrecruzamiento de las fibras de colágeno<sup>62</sup>. Características, todas ellas, necesarias para soportar las presiones ejercidas por los factores externos y mantener una curvatura estable y las propiedades ópticas adecuadas<sup>66</sup>.

Este equilibrio dinámico se sostiene principalmente debido a la disposición, densidad y entrecruzamiento de las fibras de colágeno en el estroma<sup>67</sup>. Estas fibras aumentan su elasticidad y se reorganizan cuando la córnea se mantiene sometida a compresión o estiramiento, alcanzando un nuevo estado de equilibrio<sup>68,69</sup>.

En el estroma corneal, el tercio anterior es el que determina la estabilidad de la curvatura corneal. Estudios experimentales han demostrado que este tercio presenta una mayor resistencia al edema, lo que proporciona soporte al resto de la estructura, esto se debe, en parte, a la presencia de la membrana de Bowman<sup>70</sup>. No obstante, la importancia de la membrana de Bowman está sujeta a debate<sup>17</sup>. De este modo, algunos estudios<sup>71,72</sup> sugieren que esta membrana es crucial para mantener la estabilidad de la curvatura corneal, mientras que la experiencia empírica de la clínica indica que la mayoría de las personas sometidas a cirugía de Queratotomía Fotorrefractiva (*Photorefractive Keratectomy*), en la cual se elimina la membrana de Bowman, no suelen desarrollar ectasias corneales<sup>62</sup>.

### Función corneal

La córnea desempeña dos funciones principales, la primera es la función óptica, permitiendo la transmisión y refracción de la luz. En segundo lugar, cumple una función de barrera, al proteger los contenidos intraoculares del daño mecánico, la luz ultravioleta y las infecciones<sup>73</sup>.

En cuanto a su función óptica, la córnea permite la transmisión de aproximadamente el 95% de la luz. Esto se debe a su propiedad fundamental: la transparencia. La teoría más aceptada, propuesta por Maurice en 1957<sup>66</sup> atribuía esta transparencia a la estructura homogénea de la córnea con un índice de refracción constante en todas las capas, ausencia de vasos sanguíneos y baja celularidad. Según esta teoría, las fibras de

colágeno forman una estructura ordenada en la que el diámetro y la distancia media entre las fibras son uniformes y miden menos de la mitad de la longitud de onda de la luz visible (400-700 nm). Esta relación anatómica permite que la luz dispersada por cada fibra de colágeno se cancele por la interferencia de otras fibras dispersadas, lo que limita la dispersión total y permite el paso de la luz a través de la córnea. Mientras las fibras estén dispuestas de manera regular, ordenada y separadas por una distancia menor a la longitud de onda de la luz visible, la córnea se mantendrá transparente. Sin embargo, estudios posteriores de microscopía electrónica han indicado que las fibrillas no están dispuestas en una estructura perfectamente ordenada. De hecho, las técnicas de difracción de rayos X han sugerido una disposición paracristalina de tipo líquido con algún tipo de orden local<sup>74,75</sup>. A pesar de la existencia en la actualidad de varios modelos propuestos para explicar la transparencia corneal<sup>76-78</sup>, todos ellos aceptan que los parámetros cruciales que afectan a la transparencia corneal son<sup>79</sup>:

- Densidad numérica de las fibrillas de colágeno.
- Diámetro de las fibrillas de colágeno.
- Diferencial del índice de refracción entre la sustancia interfibrilar o básica y las fibrillas.
- Espesor del estroma.
- Ordenación espacial de la matriz fibrilar.

Además de su transparencia, la córnea tiene una alta capacidad de refracción, actuando como la lente más potente del sistema óptico del ojo y contribuyendo a más del 70% de la convergencia de los rayos de luz<sup>80</sup>. Para cumplir esta función, además de ser transparente, la córnea debe tener superficies refractivas curvas, regulares y lisas.

Para cumplir su función protectora, la córnea está provista de una gran resistencia mecánica, una inervación altamente sensitiva, y una capacidad de regeneración limitada. Además, está estrechamente relacionada con los anejos oculares, que son sistemas de soporte y protección para el globo ocular<sup>81</sup>, especialmente la conjuntiva, el sistema lagrimal y los párpados<sup>82</sup>.

## El endotelio corneal

El endotelio corneal es una monocapa celular adherida a la membrana de Descemet, ubicada en la superficie interna de la córnea y, por consiguiente, en contacto directo con el humor acuoso. Pese a que su nombre pueda inducir a confusión con el endotelio vascular, el endotelio corneal se trata de un neuroepitelio que comparte unas pocas similitudes con su homónimo: ambos epitelios forman una monocapa y ambos actúan como una interfaz eficiente entre un fluido (la sangre o el humor acuoso) y los tejidos que se encuentran al otro lado<sup>83</sup>.

En términos embriológicos, el desarrollo del endotelio corneal está íntimamente ligado a la cresta neural. Alrededor de los 39 días de gestación, las células derivadas de la cresta neural comienzan a formar el endotelio corneal. Aproximadamente a la octava semana, estas células adoptan la forma de una monocapa. Hacia la semana 20 de gestación, el endotelio corneal está completamente desarrollado, coincidiendo con el inicio de la secreción del humor acuoso y la maduración de las funciones de transporte y barrera del endotelio<sup>84</sup>.

Desde la octava semana de gestación, las CECs inician la deposición de colágeno en la superficie posterior de la córnea, contribuyendo a la formación de la membrana de Descemet. Esta membrana, inicialmente parcheada, no forma una capa completa hasta el cuarto mes de gestación, alcanzando un espesor aproximado de 3  $\mu\text{m}$  hacia el octavo mes<sup>34</sup>.

## Morfología endotelial

El endotelio corneal se caracteriza por ser una monocapa de células planas con una morfología hexagonal<sup>85,86</sup>, similar a un panal de abejas. Las CECs humanas tienen una altura de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  y un ancho de 18-20  $\mu\text{m}$ , con un núcleo redondeado de alrededor de 7  $\mu\text{m}$  de diámetro. La superficie posterior de estas células presenta microvellosidades que se proyectan hacia la cámara anterior del ojo<sup>87</sup>, y su citoplasma es rico en orgánulos como mitocondrias, retículo endoplásmico y aparato de Golgi.

En el microscopio electrónico de transmisión se observa que las CECs están separadas por uniones en hendidura o comunicantes (uniones gap) desde la cámara anterior. También existen uniones focales estrechas (*tight junctions*), uniones adherentes (*adherens junctions*) así como proteínas transportadoras de iones y canales de agua (aquoporinas) que les permiten realizar su función biológica, por otro lado, no se observan uniones desmosómicas<sup>88</sup>. La membrana celular anterior de las CECs está en

contacto directo con la membrana de Descemet, lo que posibilita que las células puedan separarse mediante un trauma mecánico<sup>89</sup>.

La morfología del endotelio corneal varía con la edad. En niños, las CECs tienen un aspecto compacto y una forma hexagonal regular. Con el envejecimiento, estas células aumentan de tamaño y experimentan cambios morfológicos, llevando a una disminución en el porcentaje de células hexagonales, que puede reducirse al 60% en la segunda década de vida<sup>90</sup>. Este cambio está relacionado con la disminución en el número de CECs que ocurre a lo largo de la vida<sup>91</sup>.

### Función endotelial

La función principal del endotelio corneal es la regulación del flujo de líquidos entre el humor acuoso y el estroma corneal. Para ello actúa como una barrera selectiva y una bomba metabólica activa<sup>92</sup>. La función de barrera impide la entrada libre de líquido desde la cámara anterior hacia el estroma, mientras que la bomba metabólica activa se realiza a través del transporte de iones, especialmente a través de la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa. Este transporte de iones provoca, en última instancia, la salida de agua del estroma corneal hacia la cámara anterior, manteniendo así el estado de hidratación necesario para la transparencia corneal.

En condiciones normales alrededor de  $2 \mu\text{L}/\text{h}/\text{cm}^2$  de humor acuoso se transfieren a través del endotelio hacia el estroma corneal, y una cantidad equivalente se extrae del estroma mediante la bomba endotelial. Cualquier desequilibrio en este proceso, ya sea por una disminución en la función de la bomba o un aumento en la permeabilidad del endotelio, puede causar acumulación de agua, edema y, como consecuencia opacificación corneal<sup>93-95</sup>.

La disposición hexagonal de las CECs optimiza su capacidad de actuar como una barrera, permitiendo un recubrimiento eficiente de la superficie corneal sin dejar espacios intercelulares. Las uniones intercelulares son necesarias para la adhesión celular, la comunicación intercelular y la función barrera<sup>89</sup>.

El endotelio corneal extrae agua del estroma para mantener la córnea con un contenido de agua del 78% y un grosor promedio de 0,5 mm. Este mecanismo contrarresta el gradiente de presión generado por los proteoglicanos en el estroma, que tienden a atraer el agua hacia sí<sup>94</sup>. Además, existen mecanismos pasivos que contribuyen a mantener el adecuado porcentaje de hidratación corneal, como la evaporación de la

película lagrimal, que pueden aumentar la osmolaridad de esta y sacar agua del estroma<sup>96</sup> o como la presión intraocular, que es capaz de comprimir el estroma forzando la salida de agua<sup>97</sup>.

La existencia de una bomba metabólica activa en el endotelio corneal fue demostrada inicialmente por Harris en 1956<sup>98</sup> y fue confirmada posteriormente por Maurice<sup>99</sup>. Aunque el mecanismo exacto no se comprende en su totalidad, se sabe que las CECs expresan una variedad de proteínas transportadoras de iones, como canales de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , intercambiadores de  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  y  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , cotransportadores de  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ , bombas de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa y acuaporinas<sup>92</sup>. Estas proteínas permiten el flujo de iones y, posteriormente, el transporte pasivo de fluidos desde el estroma al humor acuoso, así como el transporte de nutrientes desde el humor acuoso al estroma y al epitelio corneal.

La energía necesaria para el funcionamiento de esta bomba se obtiene principalmente de la glucosa, metabolizada en las mitocondrias de las CECs para generar ATP en condiciones aeróbicas. Por otro lado, el oxígeno necesario para este proceso proviene de la cámara anterior del ojo más que de la película lagrimal. Estudios recientes han revelado que alteraciones en el metabolismo y la función mitocondrial pueden afectar significativamente esta bomba metabólica<sup>100</sup>.

## Patología del endotelio corneal

### *Densidad endotelial y su evolución con la edad*

Los seres humanos nacen con aproximadamente 5.000<sup>101-103</sup> células/mm<sup>2</sup>, con el envejecimiento, esta densidad decrece paulatinamente pasando por una media de CECs en adultos sanos de 20-39 años de unas 3.000 células/mm<sup>2</sup> y alcanzándose una media de 2.600 células/mm<sup>2</sup> en el endotelio de adultos sanos de entre 60 y 79 años<sup>104</sup>. Esta disminución en la densidad de CECs es parte de un proceso natural de envejecimiento del ojo que resulta en una pérdida anual media del 0,3-0,6%<sup>38,105,106</sup> de la densidad endotelial en adultos<sup>104</sup>.

Esta reducción gradual en la densidad endotelial con la edad es indicativa de la limitada capacidad regenerativa del endotelio corneal. En los seres humanos, las CECs se encuentran retenidas en la fase G1 del ciclo celular<sup>107</sup>. Pese a que esta capacidad regenerativa prácticamente nula ha sido el paradigma durante largos años en la ciencia, algunos autores proponen que las CECs sí que tienen una cierta capacidad regenerativa, postulando que las células de la periferia endotelial han sido capaces de regenerar la parte central en algunos casos<sup>108</sup>.

A pesar de la disminución progresiva de la densidad celular con la edad, el endotelio corneal mantiene una reserva funcional significativa. Se ha estimado que una densidad mínima de entre 300 y 500 células/mm<sup>2</sup> es suficiente para en el mantenimiento de la transparencia corneal a corto plazo<sup>89,109,110</sup>.

#### *Causas de la descompensación endotelial*

La enfermedad endotelial corneal se produce cuando la densidad de CECs disminuye por debajo del nivel mínimo de 300 - 500 células/mm<sup>2</sup> o por el mal funcionamiento de las células. Esto conlleva una pérdida de la función de barrera y bomba metabólica que desemboca en edema y opacidad corneales. Además del proceso natural de envejecimiento, existen varias causas que pueden contribuir al desequilibrio o mal funcionamiento en el endotelio corneal, estas causas incluyen:

- Endoteliopatías primarias: trastornos como la distrofia endotelial de Fuchs, la distrofia posterior polimorfa, la distrofia endotelial congénita hereditaria y el síndrome iridocorneal endotelial son ejemplos de endoteliopatías primarias. Estas condiciones implican alteraciones genéticas o estructurales en el endotelio corneal que conducen a su deterioro funcional.
- Intervenciones quirúrgicas: procedimientos como la cirugía de cataratas o el trasplante corneal pueden causar daño iatrogénico en las CECs. Estas cirugías, especialmente cuando implican manipulación directa o proximidad al endotelio, pueden resultar en una pérdida significativa de CECs.
- Infecciones virales: virus como el herpes simple pueden afectar directamente el endotelio corneal, causando inflamación y daño celular.
- Traumatismos: lesiones mecánicas que afectan a la córnea o al endotelio pueden resultar en la pérdida de CECs y deterioro de la función endotelial.
- Presión intraocular elevada: afecciones como el glaucoma, que aumentan la presión dentro del ojo, pueden tener un impacto negativo en el endotelio corneal. Aunque el endotelio puede adaptarse a incrementos graduales en la presión, aumentos rápidos o sostenidos pueden resultar en daño celular.
- Hipoxia por uso de lentes de contacto: el uso prolongado de lentes de contacto, especialmente aquellos que no son permeables al oxígeno,

puede inducir hipoxia en el endotelio corneal, lo que lleva a cambios en el tamaño y forma de las CECs (polimegatismo y pleomorfismo).

### Epidemiología de la patología endotelial corneal

La ceguera corneal es una de las principales causas de ceguera y afecta a un gran número de personas en todo el mundo. Datos recientes indican que, aproximadamente 36 millones de personas en el mundo eran ciegas y 216,6 millones tenían discapacidad visual de moderada a severa en 2015, con una proyección de aumento en estas cifras. Las causas principales de discapacidad visual y ceguera incluyen errores de refracción no corregidos y cataratas, lo que implica la necesidad continua de intervenciones preventivas y terapéuticas en este campo<sup>111</sup>. Además, un estudio reveló que la prevalencia ajustada por edad de la ceguera, ha disminuido significativamente entre los adultos mayores de 50 años, mientras que el número de personas afectadas, ha aumentado debido al crecimiento y envejecimiento de la población mundial<sup>112</sup>. Estos hallazgos subrayan la importancia de fortalecer los servicios oftálmicos para abordar la pérdida de visión evitable.

Según datos recientes de la Eye Bank Association of America<sup>113</sup>, en 2022 los procedimientos de implantación de córneas donadas aumentaron ligeramente de 49.110 en 2021 a 49.597 en 2022. Cifras alejadas de la situación en años previos a la pandemia de la COVID 19, cuando se realizaban anualmente, en torno a 80.000 trasplantes corneales en los Estados Unidos de América (EE. UU.). De los 49.597 trasplantes realizados en 2022, 15.835 fueron queratoplastias penetrantes, mientras que, 30.792 fueron trasplantes lamelares endoteliales, prácticamente el mismo número que el año previo.

En España, según datos de la Memoria de Actividad de Donación e Implante de Tejidos de 2022<sup>114</sup>. Durante ese año se procesaron un total de 6.925 córneas, de las cuales se consideraron válidas para trasplante 4.919 córneas y se desestimaron 2012, bien por causas relacionadas con el donante (574) o con el procesamiento (1.283). De los 4.647 trasplantes realizados, 1.616 fueron queratoplastias penetrantes y 2.074 trasplantes lamelares.

Estos datos indican que la patología endotelial corneal es una causa significativa de deterioro visual, siendo responsable tanto en EE. UU. como en España de más de la mitad de los procedimientos de implantación de córneas donadas.

El aumento de la actividad de trasplante agrava la escasez mundial de tejido donante, estimándose que 12,7 millones de personas requieren un trasplante de córnea en todo el mundo<sup>115</sup>. De este modo, el desequilibrio global sitúa una proporción de 1 córnea disponible por cada 70 necesarias<sup>115</sup>. Además, debido a la pandemia de COVID-19, los requisitos de tejido para ser considerado aceptable para el trasplante se han vuelto más estrictos, lo que afecta al suministro mundial de tejido corneal<sup>116</sup>.

### Requisitos del tejido corneal donado

Actualmente en España, para que una córnea donada pueda ser trasplantada, debe cumplir directrices estrictas publicadas por la ONT en el plan nacional de corneas<sup>117</sup> elaborado en 2016. Según este plan, no pueden ser utilizadas en trasplantes las córneas procedentes de donantes que se encuentren en uno de estos grupos:

- Causa de la muerte desconocida, sin historia clínica previa y sin la posibilidad de realizar autopsia después de la donación.
- Imposibilidad de realizar una correcta evaluación de la historia clínica y del riesgo social biológico del donante.
- Ingesta o exposición a sustancias tóxicas que se puedan transmitir en dosis tóxicas al receptor de tejidos o a las células (cianuro, plomo, mercurio, oro).
- Enfermedades neurológicas, como las causadas por priones o la esclerosis múltiple.
- Antecedentes de neoplasia maligna ya sea ocular o hematológica.
- Infecciones, sepsis o infecciones víricas activas.
- Antecedente de xenotrasplante.
- Antecedente de transfusión en el Reino Unido.
- En el caso que la sangre del donante haya sufrido hemodilución, será necesario recuperar sangre previa a la politransfusión, de lo contrario se debe descartar el donante.

Además de estas directrices, existen una serie de recomendaciones de utilización del tejido donado, siendo cada centro de tejidos el que toma la decisión final sobre su uso en trasplante. En el caso del trasplante endotelial, el más restrictivo en cuanto a las características del tejido donado, algunos de los criterios utilizados para descartar una córnea que cumple todos los requisitos del plan nacional de corneas son: el tiempo *post mortem* en la obtención del tejido (cuanto mayor sea, más probabilidades de descarte), la presencia de guttas o pliegues en el endotelio corneal, una densidad endotelial inferior a 2.000 células/mm<sup>2</sup> o una morfología anómala de las



CECs. Estos requisitos, que aseguran la seguridad y eficacia de los trasplantes, limitan la disponibilidad de tejidos aptos.

Estos tejidos no utilizables para trasplante (córneas que no cumplen criterios de trasplante o anillos sobrantes tras la realización de una queratoplastia) son los únicos que se pueden utilizar en investigación en España<sup>118</sup>.

### Medicina regenerativa del endotelio corneal

La medicina regenerativa es la encargada del proceso de reemplazar, fabricar o regenerar células humanas, tejidos u órganos, para restaurar su funcionamiento normal. El abordaje clásico de la medicina regenerativa del endotelio corneal es el tratamiento quirúrgico mediante la realización de un trasplante, siempre y cuando el paciente no responde a los colirios hiperosmóticos.

#### *Abordaje clásico de la patología endotelial: tratamientos quirúrgicos*

Históricamente, la Queratoplastia Penetrante (PK, *Penetrant Keratoplasty*), introducida en 1906 por el Dr. Eduard Zirm y refinada por el Dr. Ramón Castroviejo, ha sido el principal tratamiento quirúrgico para las disfunciones endoteliales severas<sup>119-121</sup>. Este procedimiento implica la implantación de un segmento corneal de espesor completo de un donante. Aunque efectiva y relativamente sencilla, esta técnica conlleva riesgos significativos como la aparición de astigmatismo secundario, complicaciones de la superficie ocular<sup>122,123</sup>, infecciones asociadas a las suturas<sup>124,125</sup>, y, en casos raros, hemorragias expulsivas intra y postoperatorias<sup>126,127</sup>. Estos problemas conducen a que las tasas de supervivencia del injerto a los diez años varíen entre el 36 y el 90%<sup>128,129</sup>.

La evolución en las técnicas e instrumentos de microcirugía ha llevado al desarrollo de la Queratoplastia Lamelar Posterior (PLK, *Posterior Lamellar Keratoplasty*), inicialmente descrita por el Dr. Gerrit Melles<sup>130,131</sup>, y posteriormente adaptada y renombrada por el Dr. Terry como la Queratoplastia Endotelial Lamelar Profunda (DLEK, *Deep Lamellar Endotelial Keratoplasty*)<sup>132</sup>. En estas técnicas el estroma, la membrana de Descemet y el endotelio de un donante se trasplanta a un receptor en el que se retira el equivalente de tejido. Estas nuevas técnicas, que reemplazan únicamente la parte patológica de la córnea del paciente, ofrecen ventajas como una recuperación visual más rápida y menos complicaciones en comparación con la queratoplastia penetrante<sup>133-135</sup>. Sin embargo, se adoptaron lentamente, debido a su dificultad técnica ya que requerían de la disección manual tanto del tejido del receptor como del donante.

A lo largo de los años, las técnicas lamelares han experimentado a su vez varias modificaciones y mejoras como la disminución de la incisión limbar o la realización de una descemetorrexia (eliminación del endotelio patológico)<sup>136,137</sup>, dando lugar a las técnicas actuales: la Queratoplastia Endotelial con «Pelado» de la Membrana de Descemet (DSEK, *Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty*), la Queratoplastia Endotelial Automatizada con «Pelado» de Membrana de Descemet (DSAEK, *Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty*) y la Queratoplastia Endotelial de Membrana de Descemet (DMEK, *Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty*).

En la DSEK y la DSAEK, la membrana de Descemet y el endotelio del paciente son eliminados y reemplazados por un injerto de tejido de donante sano compuesto de membrana de Descemet, endotelio y una fina capa de estroma posterior de espesor variable<sup>138</sup>, la cual actúa como estructura de soporte. La DMEK, descrita por primera vez en 2006, permite la sustitución selectiva del endotelio disfuncional y su membrana de Descemet mediante una pequeña incisión en la esclera<sup>139</sup>. Debido a que el injerto introducido no incluye estroma posterior, se evita la manipulación de las fibras de colágeno del estroma del paciente y el donante. Además, con la DMEK se consigue una configuración anatómica más regular, lo cual resulta en unas curvaturas anteriores y posteriores similares a la curvatura fisiológica de las córneas sanas<sup>140</sup>.

Estas técnicas, especialmente la DMEK, han demostrado ser menos invasivas y ofrecer una recuperación visual más rápida, con una mayor proporción de pacientes alcanzando una agudeza visual óptima de 20/20<sup>139,141 133 134,135</sup>. Sin embargo, la cirugía tipo DMEK es un reto técnico, en el que la preparación del injerto es delicada y compleja y en el que además, los desprendimientos del injerto complican alrededor de una cuarta parte de los casos<sup>142</sup>. Además, esta técnica requiere de córneas de mayor calidad en cuanto a su densidad endotelial ya que en esta cirugía se produce una mayor pérdida de CECs durante la preparación del injerto<sup>143</sup>.

En un esfuerzo por mejorar el aprovechamiento de tejido, se ha intentado el uso de la mitad<sup>144</sup>, e incluso de un cuarto<sup>145</sup> del injerto endotelial trasplantado en una cirugía DMEK. Sin embargo, debido a las bajas densidades de CECs notificadas tras estos procedimientos, el mayor desprendimiento de injertos en comparación con la DMEK convencional, los casos de edema corneal periférico persistente y la estrecha indicación de uso (únicamente para distrofia de Fuchs), estas técnicas siguen siendo controvertidas.

Recientemente, se ha descrito una nueva técnica consistente en la extirpación quirúrgica de 4-5 mm de la membrana de Descemet, sin

trasplante endotelial posterior. Esta técnica es conocida como Descemetorrexix sin Queratoplastia Endotelial (DSO, *Descemet's Stripping Only*; o DWEK, *Descemetorhexis Without Endotelial Keratoplasty*) y se encuentra todavía en una fase temprana de desarrollo. Esta técnica que se ha utilizado para el tratamiento de pacientes relativamente jóvenes con distrofia de Fuchs, que presentaban gutta central y endotelio periférico relativamente sano<sup>146-148</sup>, ha mostrado resultados impredecibles y un largo periodo de recuperación durante el cual la córnea permaneció inflamada. Para mejorar su éxito, esta técnica puede requerir el uso de modulación farmacológica, por ejemplo, con inhibidores de la proteína quinasa asociada a Rho (ROCK, *Rho-associated Protein Kinase*).

### *Abordaje alternativo de la patología endotelial*

A pesar de que todos los tratamientos quirúrgicos anteriormente mencionados han demostrado ser eficaces en el tratamiento de las insuficiencias endoteliales severas. Todos, incluso las más modernas técnicas quirúrgicas, presentan problemas asociados, como un rendimiento visual subóptimo, los cambios refractivos<sup>149-151</sup>, la dificultad del procedimiento quirúrgico, la pérdida de CECs aguda y crónica, la aparición de opacidad en el estroma corneal posterior a la DSAEK, el desprendimiento del injerto después de la DMEK y la ya mencionada escasez de córneas de donantes<sup>115,152-157</sup>, de la que todos los procedimientos quirúrgicos son dependientes. Por esta razón, numerosos grupos de investigación han estado trabajando a lo largo de los años en desarrollar tratamientos que permitan la regeneración del endotelio corneal utilizando cultivos de CECs en técnicas de terapia celular e ingeniería tisular que, en muchos casos, aprovechan los tejidos no empleados en los trasplantes convencionales, los anillos esclerocorneales sobrantes tras la realización de una queratoplastia y las córneas que son descartadas por diferentes motivos.

### *Cultivo in vitro de Células Endoteliales Corneales (CECs)*

En los seres humanos, las CECs se encuentran retenidas en la fase G1 del ciclo celular<sup>107</sup>. Pese a esta capacidad regenerativa prácticamente nula *in vivo*, se sabe que las CECs, tanto del endotelio periférico como del endotelio central, conservan su capacidad proliferativa<sup>158</sup>, si bien se ha demostrado que las CECs del endotelio periférico tienen un mayor número de duplicaciones antes de alcanzar la senescencia y una mayor capacidad proliferativa, que las CECs cultivadas a partir del endotelio central, con independencia de la edad del donante<sup>159,160</sup>.

Los principales obstáculos para el cultivo *in vitro* de las CECs son las dificultades para forzar la proliferación de células que se encuentran quiescentes en su estado fisiológico, evitando al mismo tiempo la transición endotelio-mesenquimal, la cual provoca una transdiferenciación celular hacia un fenotipo miofibroblástico, ocasionando una pérdida de función celular<sup>161,162</sup>.

La transición endotelio-mesenquimal se caracteriza por una serie de eventos celulares como son: la pérdida de proteínas de unión célula-célula, la pérdida de polaridad celular, la reorganización del citoesqueleto de actina, el aumento de la movilidad celular, la producción anormal de matriz extracelular y los cambios en la expresión génica<sup>162</sup>. La transición endotelio-mesenquimal es, por tanto, una de las principales alteraciones no deseadas en el cultivo endotelial, ya que puede convertir un cultivo celular para uso clínico en inútil, en el mejor de los casos, y peligroso, en el peor.

Los intentos de cultivar CECs humanas se remontan a principios de la década de 1980. En aquella época, los protocolos publicados diferían significativamente en el método utilizado para aislar el endotelio corneal y en la composición de los medios de cultivo para la expansión *in vitro*. Las técnicas de aislamiento variaban desde la disección de trozos de endotelio corneal y el cultivo de las células mediante explantes<sup>163-165</sup>, la generación de una suspensión unicelular raspando la superficie endotelial con un bisturí curvo<sup>164,166</sup>, o tratando el endotelio corneal *in situ* con un cóctel enzimático a base de colagenasa para generar suspensiones unicelulares<sup>167-169</sup>.

El aislamiento por explantes requería mucho tiempo y era difícil de reproducir debido a las variaciones manuales de la técnica, inconvenientes que dificultaban su aplicación en un entorno terapéutico. Además, los métodos de aislamiento anteriores eran propensos a la contaminación con fibroblastos estromales, lo cual no es deseable, ya que la población fibroblástica supera a la población de CECs debido a su mayor velocidad de proliferación. Por otro lado, la variabilidad entre donantes en cuanto a causa de la muerte, edad, consumo de fármacos o etnia dificultó los primeros pasos para la generación y validación de los protocolos de cultivo de las CECs.

En 2004, las investigaciones realizadas por Amano y colaboradores allanaron el camino para el uso de CECs humanas en medicina regenerativa. En estos experimentos, se demostró que las CECs procedentes de cultivos obtenidos por explantes podían reconstruir el endotelio corneal de córneas humanas *ex vivo*<sup>170</sup> y revertir el edema corneal en conejos y ratas<sup>171-173</sup>.

Con la introducción a principios de la década de 2000 de las técnicas lamelares en las que se realiza una descemetorrexis, los protocolos de cultivo evolucionaron hasta adoptar una metodología en la que se realiza una descemetorrexis seguida de una digestión enzimática, en un procedimiento conocido como “*peel and digest*”. En esta metodología, el endotelio corneal se separa primero mecánicamente de la córnea y luego se somete a una digestión enzimática, generalmente con colagenasa, para obtener una suspensión de CECs. Esta metodología aumentó la reproducibilidad de los cultivos de CECs y redujo drásticamente el riesgo de contaminación por otros tipos de células corneales<sup>174–178</sup>, una mejora necesaria de cara a un futuro uso clínico de los cultivos.

Hasta la fecha, se ha utilizado una amplia gama de medios y suplementos para cultivar las CECs, con el objetivo principal de promover la proliferación manteniendo el fenotipo y evitando la transición endotelio-mesenquimal. Mediante la combinación de diferentes medios basales (Ham’s F12, Medio 199, Medio Eagle Modificado de Dulbecco y Optimem-1), suero bovino fetal (SBF), factores de crecimiento (factor de crecimiento nervioso, factor básico de crecimiento de fibroblastos<sup>169,171,172,177</sup> o factor de crecimiento epidérmico<sup>175–178</sup>) y aditivos (extracto hipofisario, cloruro cálcico, ácido ascórbico, insulina, transferrina y selenito sódico entre otros), los protocolos han promovido eficazmente la proliferación *in vitro* manteniendo el fenotipo celular<sup>161,179</sup>.

Algunos estudios comparativos<sup>177,180</sup> han demostrado cómo las diferentes composiciones de los medios de cultivo afectan a la proliferación y fenotipo de las CECs cultivadas. En 2015, Peh y colaboradores desarrollaron un protocolo de cultivo nuevo que utilizaba un medio de cultivo dual para expandir las CECs manteniendo su fenotipo *in vitro*<sup>181</sup>. La metodología de cultivo dual permite primero la expansión de las CECs utilizando un medio de cultivo proliferativo y luego el mantenimiento de una monocapa confluyente de CECs, durante una semana, utilizando un medio de cultivo estabilizador, de baja proliferación. Desde entonces, esta metodología de cultivo ha sido ampliamente adoptada<sup>182–185</sup>.

También se ha evaluado la adición al medio de cultivo de l-ascorbato 2-fosfato<sup>186</sup>, un antioxidante para reducir el estrés oxidativo, y de inhibidores del TGF- $\beta$  para evitar la transición endotelio-mesenquimal<sup>187</sup>. Una de las metodologías de cultivo más exitosas para aumentar la proliferación y la supervivencia celular ha sido la adición al medio de cultivo del inhibidor de ROCK Y-27632, una molécula bloqueadora de las vías apoptóticas<sup>181,188–190</sup> que permite aumentar la adhesión y proliferación de las CECs.

Otros estudios se han basado en la búsqueda de posibles alternativas al SBF en el medio de cultivo como fuente de factores tróficos. Por ejemplo, se ha utilizado el suero humano<sup>191</sup>, productos de lisado de plaquetas<sup>192-195</sup>, medios acondicionados<sup>196,197</sup>, o también un medio de cultivo sin suero<sup>180</sup>, para la expansión *in vitro* de las CECs. Esto es debido a que los métodos que utilizan como fuente de factores tróficos el SBF, extracto hipofisario y otros productos xenogénicos pueden producir la reacción del sistema inmunitario a las proteínas animales residuales<sup>198</sup> y, en algunos casos, son incompatibles con las Normas de Correcta Fabricación (NCF) exigidas para la fabricación de Medicamentos de Terapia Avanzada (MTA)<sup>199</sup>.

A pesar de los avances actuales en el cultivo de las CECs, quedan muchas cuestiones por resolver. Aunque la densidad de siembra celular<sup>200</sup> y la edad de los donantes<sup>201,202</sup> se han correlacionado directamente con el potencial proliferativo y el mantenimiento del fenotipo de las CECs, no se traducen necesariamente en cultivos óptimos. Los factores relacionados con el donante, como son, el uso de fármacos<sup>203</sup> o el nivel de estrés oxidativo producido por la elevada actividad metabólica celular o a la alta exposición a la luz ultravioleta<sup>204,205</sup>, podrían afectar a la proliferación y al mantenimiento del fenotipo celular. Clasificar a los donantes en función de características específicas como la causa de la muerte, la edad, las patologías previas, el uso de fármacos y otros factores relevantes, podría ser esencial para explicar el éxito variable de los cultivos de CECs y ayudar a predecir si una determinada córnea donante daría lugar a una expansión *in vitro* de CECs satisfactoria.

Otro problema a superar es que la ya mencionada necesidad de forzar a las CECs a salir de su quiescencia natural podría dar lugar a alteraciones genéticas y fenotípicas. Las CECs pueden multiplicarse un número limitado de veces antes de presentar alteraciones genéticas y funcionales, lo que limita el número de células que pueden generarse a partir de una única córnea donante<sup>183,206,207</sup>.

Por último, en la mayoría de los estudios mencionados, se han utilizado principalmente córneas de donantes jóvenes (menos de 40 años) y de alta calidad en términos de densidad celular (más de 2.500 células/mm<sup>2</sup>), para la obtención de las CECs. Esto limita el número de córneas disponibles para la obtención de cultivos de CECs, ya que entra en competencia con las córneas disponibles para trasplante. En España los tejidos utilizables para trasplante no pueden ser utilizados en investigación<sup>118</sup>. A lo largo de los años, algunos estudios han explorado el uso de córneas procedentes de donantes de más edad<sup>208-210</sup> o de anillos esclerocorneales desechados tras

una cirugía, para aumentar la disponibilidad de fuentes tisulares empleables en la obtención de cultivos de CECs<sup>210,211</sup>.

### Criterios de calidad de los cultivos de Células Endoteliales Corneales (CECs)

A lo largo de los años se ha buscado estandarizar unos criterios de calidad en los cultivos de CECs para permitir su implementación en el ámbito clínico. Estos criterios deben demostrar el mantenimiento del fenotipo celular y una expresión génica y proteica comparable a la de las CECs humanas nativas, que garanticen la seguridad y la eficacia de los cultivos de CECs. Los criterios más empleados han sido los siguientes:

### Morfología

La morfología de la CECs es un parámetro fácilmente evaluable mediante microscopía de contraste de fases. La morfología celular hexagonal de las CECs al alcanzar la confluencia en cultivo se utiliza como criterio para descartar la presencia de células fibroblásticas fusiformes, asociadas a una transición endotelio-mesenquimal. Además, se calcula el índice de circularidad de las CECs, el cual confirma la hexagonalidad y un bajo polimorfismo<sup>189,200,208</sup>.

### Genotipo y fenotipo

Los marcadores genéticos utilizados con más frecuencia para caracterizar a las CECs son: Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa (GEN: *ATP1A1*), colágeno tipo VIII (GEN: *COL8*) y la *zónula occludens-1* (ZO-1) (GEN: *TJP1*)<sup>212</sup>. Cada uno de estos genes son importantes para constatar la presencia de: transportadores metabólicos, la producción de matriz extracelular y la existencia de uniones intercelulares estrechas, respectivamente.

A nivel fenotípico, la ZO-1 y la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa han sido las proteínas que tradicionalmente han sido utilizadas como marcadores de la función barrera y la función bomba endotelial de las CECs, respectivamente<sup>213</sup>. Si bien, un estudio reciente ha sugerido que la forma hexagonal y la interdigitación de las CECs junto con la expresión de proteínas funcionales y estructurales como CD56, CD166, conexina-43, vimentina, N-cadherina e integrina  $\alpha 3\beta 1$  es un sello distintivo importante de las CECs humanas<sup>214</sup>.

## Funcionalidad

Los estudios de funcionalidad se basan en demostrar que las CECs poseen su actividad de bomba metabólica activa que garantice el mantenimiento de la transparencia corneal. La expresión de transportadores a nivel fenotípico, concretamente la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa o el cotransportador electrogénico de bicarbonato sódico 1 (*SLC4A4*), es una prueba insuficiente de funcionalidad por sí sola, ya que la expresión de proteínas no necesariamente se correlaciona con una actividad de bomba metabólica activa en las células<sup>161</sup>. Hasta la fecha, se han desarrollado métodos *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* para probar la funcionalidad de las CECs.

En lo referente a los métodos *in vitro*, el método más utilizado es la medición de la Resistencia Eléctrica Transendotelial (TER, *Transendothelial Electrical Resistance*)<sup>183</sup> que consiste en la medición de la resistencia eléctrica a través de una monocapa celular. La TER refleja la conductancia iónica en las monocapas<sup>215,216</sup>, una propiedad de la membrana celular que representa la facilidad con la que los iones atraviesan la membrana celular. La medida de la TER es una forma sencilla, sensible y fiable para confirmar la integridad y la permeabilidad de las monocapas, con la que demostrar la existencia de la función barrera y el transporte de iones. Otro método para demostrar la funcionalidad *in vitro* de los cultivos de CECs, es la medida, mediante espectrofotometría, de la actividad bomba  $\text{Na}^+/\text{k}^+$  ATPasa que indica la existencia, de manera directa, de una función transportadora<sup>217,218</sup>.

Tradicionalmente, los modelos animales han sido aceptados como indicadores principales de funcionalidad, donde las diferentes terapias desarrolladas han tenido que demostrar la capacidad de curar una determinada enfermedad. A lo largo de los años, se han utilizado, por motivos logísticos y/o económicos, diferentes modelos animales<sup>219</sup>, más o menos cercanos al modelo humano, en cuanto a la capacidad de las CECs para proliferar *in vivo*. Además, en estos modelos animales se han generado diferentes modelos de enfermedad endotelial, mediante una lesión criogénica, la eliminación de las CECs manteniendo íntegra la membrana de Descemet, o la realización de una descemetorrexia, generando un edema corneal y una opacificación de la córnea que posteriormente era tratada<sup>220</sup>. El éxito de la terapia se evaluaba mediante la valoración clínica de la córnea, utilizando una lámpara de hendidura; la medida del grosor corneal, mediante Tomografía de Coherencia Óptica (OCT, *Optical Coherence Tomography*); y la valoración de la densidad endotelial, mediante microscopía especular<sup>221-224</sup>.

Aunque los modelos animales representan un método valioso para comprobar la seguridad y la eficacia de las terapias desarrolladas, no son



capaces de predecir al 100% la eficacia de los futuros tratamientos en humanos. Por otro lado, la entrada en vigor del Real Decreto 53/2013 del 1 de febrero<sup>225</sup>, por el que “se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia” ha supuesto un importante avance en la protección y el bienestar de los animales de experimentación, implementando el principio de las tres erres (reemplazo, reducción y refinamiento) y fomentando el uso de métodos alternativos a la experimentación con animales vivos.

De este modo, en los últimos años han surgido métodos alternativos a los modelos animales que evalúan la funcionalidad de las CECs estudiando su capacidad de adhesión, reepitelización y reparación activa en córneas *ex vivo* mantenidas en un pocillo de una placa de cultivo<sup>226</sup> o en un entorno, como la cámara de Barrow, que imite las condiciones fisiológicas<sup>227-229</sup>. En estos estudios se han realizado, diferentes modelos de enfermedad, que han consistido en eliminar las CECs manteniendo preservada la membrana de Descemet<sup>230,231</sup>, o eliminar tanto la membrana de Descemet como las CECs<sup>228,232-234</sup>. Posteriormente, los modelos son tratados con suspensiones de CECs. Para confirmar el éxito de la terapia, se evalúa la reepitelización calculando la densidad endotelial, utilizando imágenes de microscopía de contraste de fases o microscopía electrónica de barrido en las que se cuenta manualmente las CECs; y se evalúa la capacidad de eliminar el edema corneal, midiendo el espesor corneal mediante OCT.

### Generación *de novo* de Células Endoteliales Corneales (CECs)

La generación *de novo* de CECs, utilizando células madre pluripotentes u otras fuentes celulares, ha sido intensamente investigada en los últimos años, mostrando avances significativos<sup>235-238</sup>. En general, la diferenciación de células madre pluripotentes humanas a CECs presenta varias ventajas, como la expansión *in vitro* más rápida de las células madre pluripotentes en comparación con los cultivos primarios de CECs y la independencia de las córneas de los donantes<sup>161</sup>. A pesar de los progresos en este campo, existen desafíos aún no superados en esta metodología, siendo uno de los más críticos la pureza celular. Durante la diferenciación, pueden emerger poblaciones celulares secundarias no deseadas, lo que conlleva variaciones entre los lotes de diferenciación debido a la ineficiencia de los protocolos actuales. Además, es fundamental asegurar que las células diferenciadas no solo sean funcionales y seguras, sino también aptas para su uso terapéutico. Existen interrogantes sobre cómo los protocolos de diferenciación afectan la firma genómica de las células y si inducen

alteraciones en el ADN, como pueden ser modificaciones epigenéticas o anomalías en el cariotipo. Por último, es crucial garantizar que la diferenciación sea completa y que las células generadas no retengan capacidades pluripotenciales, ya que esto podría implicar un riesgo de tumorigenicidad.

Debido a estos desafíos, la generación *de novo* de CECs todavía no ha alcanzado el mismo nivel de desarrollo que la expansión *in vitro* de cultivos primarios de CECs. Este enfoque, centrado en la proliferación y mantenimiento de CECs extraídas directamente del tejido, representa un área clave de estudio. Los cultivos primarios de CECs ofrecen características fisiológicas más cercanas a las de su estado natural, lo que se traduce en tratamientos más efectivos y seguros para las patologías del endotelio corneal.

#### Cultivo de Células Endoteliales Corneales (CECs) para el tratamiento de la patología endotelial: ingeniería tisular

Las técnicas de ingeniería tisular endotelial buscan mimetizar los injertos endoteliales corneales que se trasplantan en una cirugía tipo DMEK. El atractivo de esta estrategia radica en que, mediante el cultivo de las CECs sobre un *scaffold* o soporte, las células pueden administrarse en el lugar correcto de forma controlada, habiendo formado ya una monocapa celular confluyente que está lista para empezar a funcionar, utilizando la misma técnica quirúrgica empleada habitualmente en la práctica clínica. Por otro lado, el uso de soportes o andamiajes reduce el número de células necesarias en comparación con una inyección celular, aumentando así el número de pacientes que podrían beneficiarse de la terapia<sup>161</sup>.

Para realizar un injerto endotelial artificial, es necesario optimizar el cultivo de las CECs y que el soporte cumpla unos requisitos específicos. De este modo, debe ser lo suficientemente resistente como para someterse a una manipulación quirúrgica sin romperse, pero poseer un grosor equiparable al de los injertos trasplantados en una cirugía tipo DSAEK o DMEK, para conservar las dimensiones anatómicas. Además, el andamiaje seleccionado debe ser transparente, con un índice de refracción cercano a 1,38 para ajustarse a las características ópticas de la córnea<sup>239</sup> y debe ser permeable a los iones, nutrientes y restos metabólicos como el ácido láctico. Igualmente, es importante que promueva la adhesión y el mantenimiento del fenotipo de las CECs, siendo también capaz de adherirse al estroma corneal del receptor. Finalmente, es importante que el andamiaje seleccionado no desencadene reacciones fibróticas que puedan dañar el ojo del receptor, y aunque no es esencial, si es deseable que sea biodegradable para que las células trasplantadas generen su propia membrana de Descemet.

En la actualidad existen dos tipos principales de soportes para las CECs: los andamios biológicos derivados de tejidos y los andamios sintéticos o artificiales.

Los materiales biológicos ofrecen ventajas significativas debido a su biocompatibilidad inherente. Estos materiales raramente desencadenan respuestas inmunológicas adversas<sup>240,241</sup>, lo que facilita su integración en el tejido nativo. Los productos de su degradación son generalmente más tolerados por el metabolismo del receptor y menos tóxicos en comparación con los materiales sintéticos. Sin embargo, una limitación notable de estos biomateriales es su heterogeneidad química, que puede resultar en variabilidad en cuanto a sus propiedades mecánicas, estructura, rendimiento y tasas de degradación local<sup>240,242</sup>. Ejemplos de estos materiales son el estroma nativo<sup>243,244</sup>, la membrana amniótica<sup>245,246</sup>, la gelatina<sup>247</sup>, la cápsula del cristalino<sup>248</sup>, la queratina<sup>249</sup>, el colágeno<sup>250</sup>, o la fibroína de seda<sup>251,252</sup>

Por otro lado, los materiales sintéticos se desarrollaron para superar la variabilidad de los tejidos biológicos. Sus propiedades pueden ser precisamente controladas durante el proceso de fabricación, lo que permite obtener características químicas y estructurales específicas. Estos polímeros pueden ser diseñados para ser biodegradables o no. Los materiales no degradables son ventajosos en entornos biológicos con alta demanda de carga mecánica, ya que pueden mantener su integridad estructural de forma prolongada. Sin embargo, pueden presentar desafíos, como una respuesta fibrótica a un soporte inerte, debido a su incapacidad para integrarse completamente en el tejido nativo, o provocar una respuesta inflamatoria adversa, lo que a largo plazo podría causar el fallo del injerto o complicaciones secundarias<sup>242</sup>. Ejemplos de estos materiales son el ácido poliláctico<sup>253,254</sup>, el ácido poliláctico-co-glicólico<sup>255</sup>, el polietilenglicol<sup>256</sup> y la policaprolactona<sup>257,258</sup>.

### [Cultivo de Células Endoteliales Corneales \(CECs\) para el tratamiento de la patología endotelial: terapia celular](#)

La terapia celular consiste en la administración de CECs de forma sencilla y mínimamente invasiva mediante su inyección en la cámara anterior del ojo. A principios de la década de 2000, Mimura y colaboradores sentaron las bases para la administración de CECs cultivadas mediante inyección intracameral en un modelo de queratopatía bullosa en conejo<sup>173</sup>.

La inyección de CECs cultivadas requiere de una adecuada posición de la cabeza para favorecer la deposición de las CECs por gravedad. De este modo, tras la inyección celular, los sujetos deben permanecer en decúbito

prono (boca abajo) de dos a tres horas para permitir la adhesión de las CECs<sup>259,260</sup>. Una estrategia que exploró la mejora de la adhesión de las CECs fue la que usa la fuerza magnética para atraer a CECs cargadas con perlas ferromagnéticas<sup>231,261,262</sup>. Más recientemente, la administración conjunta de las CECs con el inhibidor de ROCK Y-27632 combinada con la posición prona del receptor mejoró significativamente la adhesión celular<sup>260,263,264</sup>.

A lo largo de los años, se han realizado diversas investigaciones para estudiar si la membrana de Descemet es necesaria para garantizar la eficacia de la inyección celular. De este modo, en un estudio realizado por Okumura y colaboradores en conejos, se compararon los resultados de la inyección de CECs en dos grupos experimentales: en el primer grupo se rasparon las CECs dejando intacta la membrana de Descemet y en el segundo, se realizó una descemetorrexia de 4 mm de diámetro<sup>265</sup>. Tras 14 días de seguimiento, el grosor y la transparencia corneal en ambos grupos era comparable, aunque la recuperación de la función visual en el grupo que había recibido una descemetorrexia fue más lenta<sup>265</sup>. En otro estudio, Peh y colaboradores realizaron, también en conejo, la inyección de CECs en dos modelos experimentales: en el primer grupo se rasparon las CECs dejando intacta la membrana de Descemet, mientras que en el segundo grupo se realizó una descemetorrexia completa<sup>264</sup>. Tras tres semanas de seguimiento, las córneas del grupo experimental al que se realizó una descemetorrexia completa y que recibieron una inyección de CECs permanecieron edematizadas con un grosor aproximado de 850  $\mu\text{m}$ , mientras que en el grupo al que se dejó intacta la membrana de Descemet, el grosor corneal disminuyó a 582  $\mu\text{m}$  tras la inyección de las CECs. Este estudio, en controversia con el anterior, sugiere que la presencia de la membrana de Descemet en la córnea receptora es importante para un resultado satisfactorio de la inyección de CECs.

En el primer ensayo clínico con CECs cultivadas inyectadas con el inhibidor de ROCK Y-27632<sup>188</sup>, Kinoshita y colaboradores revirtieron el edema corneal en pacientes con queratopatía bullosa derivada de la realización de una cirugía de cataratas y en pacientes con distrofia de Fuchs. En el estudio de seguimiento a 5 años, la reversión clínica de la patología endotelial se mantuvo en 10 de los 11 pacientes tratados<sup>266</sup>.

Actualmente, hay un ensayo clínico en fase de reclutamiento en México (NCT05636579) que evaluará la seguridad de múltiples inyecciones intracamerales de cultivos primarios de CECs (EO2002) con y sin tratamiento con un inhibidor ROCK tópico. Además, en marzo del año 2023 una terapia celular para el tratamiento de la queratopatía bullosa que utiliza

cultivos primarios de CECs recibió la aprobación regulatoria de la Agencia de Dispositivos Médicos y Farmacéuticos de Japón (PMDA, *Pharmaceuticals and Medical Devices Agency*): Vyznova™ de Aurion Biotech<sup>267</sup>. La aprobación de la PMDA se basa en el tratamiento de 65 sujetos en tres ensayos clínicos realizados en Japón. En los tres estudios, una única inyección intracameral, con inhibidor de ROCK, de CECs cultivadas en varias concentraciones tuvo un perfil de seguridad favorable en sujetos adultos con disfunción endotelial corneal. No observándose acontecimientos adversos graves oculares o sistémicos relacionados con el tratamiento. Además, este mismo medicamento se encuentra en la actualidad en ensayo clínico de fase dos en los EE. UU.

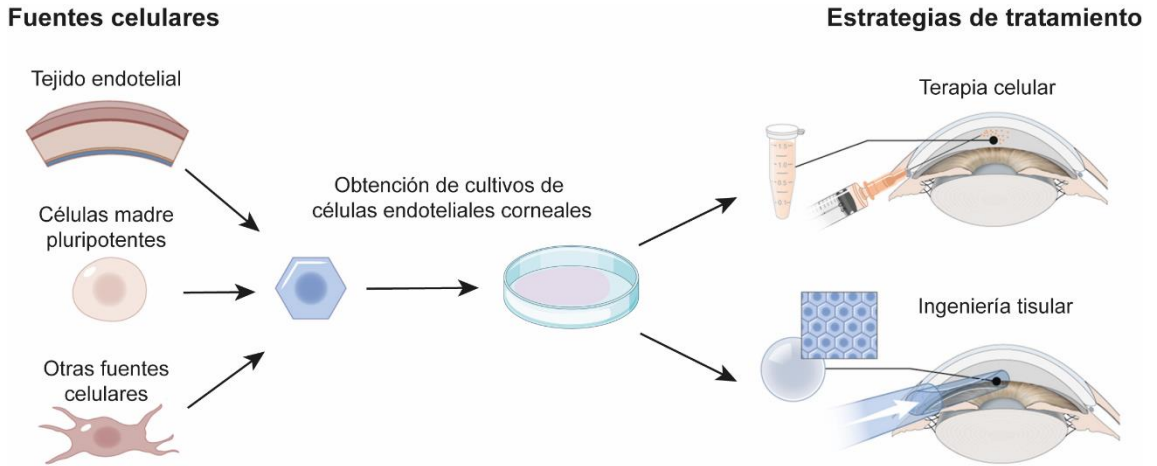
Pese al éxito de los estudios realizados hasta la fecha, la inyección celular todavía no es un método eficaz en cuanto al número de células utilizadas. De este modo, habitualmente se utilizan  $1 \times 10^6$  de CECs en cada inyección, un número de CECs aproximadamente 4-5 veces superior al recuento celular del endotelio corneal humano sano.

Por otro lado, es necesario demostrar la seguridad de la inyección de CECs estudiando la distribución de las CECs no adheridas. Hasta la fecha, los estudios han mostrado resultados controvertidos en lo que se refiere a la distribución de las CECs inyectadas y el efecto que pueden tener tanto dentro del ojo del receptor como sistémicamente. Un estudio describió el depósito de células detrás de la cápsula del cristalino del ojo tras la inyección de CECs<sup>221</sup>. Mientras que en el estudio realizado por Kinoshita y colaboradores<sup>188</sup> no se encontró que las CECs inyectadas se hubieran dispersado sistémicamente al atravesar la malla trabecular del ojo.

Pese a esto, la terapia celular ofrece una alternativa potencialmente más versátil y menos invasiva, en comparación con el trasplante de córnea y la ingeniería tisular. Mientras que el trasplante y la ingeniería tisular a menudo requieren manipulación quirúrgica extensa, la terapia celular podría ofrecer una recuperación más rápida y un menor riesgo de complicaciones asociadas con los procedimientos quirúrgicos. Por otro lado, defectos extensos relacionados con la membrana de Descemet podrían no ser tratables mediante este procedimiento, requiriendo estos pacientes aproximaciones como la ingeniería de tejidos o el trasplante convencional.

Puesto que ambas técnicas presentan limitaciones y ventajas la combinación de ingeniería tisular con las terapias celulares tiene el potencial de mejorar la forma en que se abordan las enfermedades endoteliales corneales. La disponibilidad de diferentes modalidades de tratamiento para la patología endotelial acerca el concepto de la medicina personalizada permitiendo seleccionar terapias individualizadas para cada paciente (Figura

3). Estos avances no solo prometen mejorar la calidad de vida de los pacientes afectados, sino también reducir la dependencia de los trasplantes de córnea y minimizar los riesgos asociados con los procedimientos quirúrgicos tradicionales.



**Figura 3.** Esquema explicativo de los tratamientos alternativos de la patología endotelial corneal. Modificado de Català et al. 2022<sup>179</sup>.

## Regulación de los Medicamentos de Terapia Avanzada (MTA) y Normas de Correcta Fabricación (NCF)

### Regulación de Medicamentos de Terapia Avanzada (MTA)

Los tejidos que se utilizan para los trasplantes convencionales son regulados de acuerdo a la ley española de trasplantes<sup>118</sup>. En el momento que un tejido sufre una modificación denominada “sustancial”, como puede ser una digestión enzimática o un proceso de cultivo, pasa ser considerado un MTA.

En España los MTA se regulan por el Reglamento (CE) N° 1394/2007 del Parlamento Europeo y el RD 1/2015 de la legislación española, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios<sup>268,269</sup>.

El Reglamento (CE) N° 1394/2007<sup>268</sup>, establece que los MTA son medicamentos de uso humano que están basados en genes (terapia génica), células (terapia celular) o tejidos (ingeniería tisular) e incluyen productos de origen autólogo, alogénico o xenogénico.

Los tres tipos de MTA que incluyen células son:

- Terapia celular: es un medicamento biológico que contiene células o tejidos que han sido objeto de manipulación sustancial de modo que se hayan alterado sus características biológicas, funciones fisiológicas o propiedades estructurales pertinentes para el uso clínico previsto, o por células o tejidos que no se pretende destinar a la misma función esencial en el receptor y en el donante.
- Ingeniería de tejidos: un “producto de ingeniería tisular” es aquel que contiene o está formado por células o tejidos manipulados por ingeniería, con el objetivo de regenerar, restaurar o reemplazar un tejido humano.
- Terapia génica: involucra la introducción, eliminación o modificación de material genético dentro de las células de un paciente para tratar una enfermedad. Este enfoque terapéutico busca proporcionar una copia funcional de un gen ausente o defectuoso, o modificar la expresión de genes para lograr un efecto terapéutico y en ocasiones se combina con la terapia celular o la ingeniería de tejidos para su aplicación.

Este Reglamento<sup>268</sup> introduce el concepto "*manipulación sustancial*", cuando:

- Las células o tejidos no están destinados a emplearse para la misma función o funciones esenciales en el receptor y en el donante.

- Han sido sometidos a manipulación sustancial, de modo que se logren las características biológicas, funciones fisiológicas o propiedades estructurales pertinentes para la regeneración, reparación o sustitución pretendidas. Se considera manipulación sustancial cualquier tipo de manipulación distinta de las manipulaciones no sustanciales enumeradas en el anexo I del Reglamento (CE) N° 1394/2007: corte, trituración, moldeo, centrifugación, imbibición en disoluciones antibióticas o antimicrobianas, esterilización, irradiación, separación, concentración o purificación celular, filtrado, liofilización, congelación, criopreservación y vitrificación.

El Reglamento (CE) n.º 1394/2007<sup>268</sup> establece normativas específicas para la autorización, supervisión y farmacovigilancia de los MTA. Este reglamento se centra en garantizar la seguridad, eficacia y calidad de estos productos, abarcando desde el proceso de desarrollo hasta su comercialización y uso clínico. Un aspecto crítico de este Reglamento es la trazabilidad y la farmacovigilancia, asegurando que todos los MTA puedan ser rastreados en cada etapa de su ciclo de vida.

En general, la autorización de comercialización de los MTA se realiza mediante el procedimiento centralizado solicitado a la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, *The European Medicines Agency*). Sin embargo, el Reglamento (CE) N° 1394/2007, en el punto 7, contempla la denominada “*exención hospitalaria*”, “*que se define como la exclusión de algunos medicamentos de ese procedimiento centralizado, que son fabricados de forma no rutinaria, preparados ocasionalmente, de acuerdo con normas de calidad específicas, usados dentro del mismo Estado miembro en un hospital, bajo la exclusiva responsabilidad profesional de un facultativo para hacer frente a una prescripción médica individual de un producto a medida para un paciente concreto*”. También llamada “*cláusula de exclusión hospitalaria*”, da origen a la regulación nacional de los MTA de fabricación no industrial. La autorización de estos medicamentos corresponde a las autoridades nacionales, en el caso de España, a la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), quien los autoriza, y éstos deben asegurar la trazabilidad y los requerimientos de farmacovigilancia, así como estándares específicos de calidad, que serán equivalentes a los que se ofrecen a nivel de la UE para los MTA que siguen el procedimiento centralizado de autorización.

La regulación de autorización de uso de estos MTA está contemplada en el RD 477/2014<sup>270</sup>, en que se describe que “*al igual que sucede con otros medicamentos tales como las fórmulas magistrales o los radiofármacos, se*



*ha considerado que los MTA de fabricación no industrial deben disponer de un procedimiento específico de autorización que se adapte a sus especiales características de producción y aplicación sin olvidar la naturaleza específica de los MTA y sin menoscabo de las garantías de calidad, seguridad, eficacia, identificación e información”.*

Como se recoge en el RD 477/2014: *“Algunos de estos productos, que en su día no se consideraron medicamentos, se encuentran en situación de uso en la práctica en algunas instituciones hospitalarias, y deberán, de acuerdo con las nuevas regulaciones, obtener una autorización por parte de la AEMPS de acuerdo con lo establecido en la disposición transitoria única de este RD. Entre ellos se encuentran el trasplante autólogo de condrocitos, el implante de queratinocitos para tratamiento de quemados o el tratamiento de lesiones corneales con células troncales limboconiales”* <sup>270</sup>. Esto se traduce en la consolidación de éstos tres MTA a nivel europeo, no siendo exigible para ellos ensayos clínicos previa autorización de uso.

### Normas de Correcta Fabricación (NCF)

Según el artículo 64 del RD 1/2015, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios<sup>271</sup>, para la producción de medicamentos, donde se incluyen los MTA, se deben seguir la guía de NCF.

La guía de NCF se define como “la parte de la garantía de calidad que asegura que los medicamentos son elaborados y controlados de acuerdo con las normas de calidad apropiadas para el uso al que están destinados” <sup>272</sup>. Está destinada al cumplimiento de un sistema de calidad farmacéutico, que engloba todo aquello que puede afectar a la calidad final de un medicamento<sup>272</sup>. Esta Guía de NCF, en la parte IV, *“Directrices sobre normas de correcta fabricación específicas para Medicamentos de Terapia Avanzada”*, publicada en 2017 y de obligado cumplimiento desde el 22 de mayo de 2018, define los requisitos que van a asegurar esos estándares de calidad en la producción de MTA<sup>272</sup>. Representa por tanto el conjunto de medidas adoptadas con el objeto de garantizar que los medicamentos son de la calidad requerida para el uso al que están destinados, exigiendo una serie de requisitos para el personal, los locales, los equipos, el sistema de documentación, el sistema de control de calidad y la trazabilidad<sup>272</sup>.

El cumplimiento de las NCF nos asegura que:

- Existe un sistema de control de calidad que sea funcionalmente independiente de la producción.

- Existen medidas implantadas para la evaluación prospectiva de cambios planificados y su aprobación previa a su implantación.
- Los defectos de calidad y las desviaciones de proceso son identificadas tan pronto como sea posible, las causas son investigadas y se toman las medidas correctoras y/o preventivas.
- Se implantan los sistemas adecuados para asegurar la trazabilidad de los MTA y de sus materiales de partida y materias primas críticas apropiadas.

Las NCF son esenciales para garantizar la calidad y seguridad en la producción de MTA. Estas normas cubren todos los aspectos de la fabricación, desde la adquisición de materias primas hasta los controles de calidad del producto final. En el caso de los MTA, las NCF son particularmente importantes debido a la complejidad y la naturaleza personalizada de estos productos.

En el cultivo de CECs para uso terapéutico, la adhesión a las NCF es crucial. Estas normas requieren la estandarización de los procesos de cultivo, validación rigurosa de los métodos de producción, y un control exhaustivo de la calidad. Esto incluye la verificación de la esterilidad del producto, la consistencia en la composición de los medios de cultivo, y el monitoreo continuo de las condiciones ambientales durante el proceso de cultivo. La trazabilidad de las células, desde su origen hasta su uso final en terapias, es un componente esencial de las NCF y fundamental para garantizar la seguridad del paciente<sup>273</sup>.

El cumplimiento de las NCF en la producción de MTA plantea desafíos únicos, especialmente en términos de estandarización de procesos que tradicionalmente han sido más “artesanales”. Se requiere un equilibrio entre mantener la calidad y eficacia del producto y adaptarse a las necesidades individuales de los pacientes. La implementación efectiva de las NCF en el cultivo de CECs y en la producción de MTA es un área de investigación y desarrollo continua, buscando optimizar la seguridad y la eficacia del tratamiento.

Además, el Consejo Internacional de Armonización de los requisitos técnicos para el registro de medicamentos de uso humano (ICH, *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) proporciona directrices adicionales que resultan útiles en la producción de MTA. Estas directrices ayudan a armonizar los estándares técnicos, promoviendo una mayor coherencia y calidad en el desarrollo de productos farmacéuticos a nivel internacional<sup>274</sup>.

## Introducción

En resumen, la regulación de los MTA y la adhesión a las NCF son aspectos cruciales en el desarrollo y la producción de terapias avanzadas. Estos marcos garantizan que los tratamientos no solo sean innovadores sino también seguros y efectivos para los pacientes. Con la evolución constante de la tecnología y la medicina, la regulación y las prácticas de fabricación seguirán adaptándose para satisfacer las necesidades emergentes en este campo.



## Justificación

"La ciencia es un instrumento para hacer posible lo imposible"

- J. Robert Oppenheimer

## Justificación

La disfunción endotelial corneal se trata actualmente con éxito mediante la realización de un trasplante de la parte posterior de la córnea (trasplante endotelial) en sus distintas modalidades. Procedimientos menos invasivos que el trasplante corneal clásico de córnea completa (trasplante penetrante) y que tienen mejores resultados de recuperación de la agudeza visual para los pacientes.

En cualquier caso, tanto los trasplantes penetrantes tradicionales como los más novedosos trasplantes endoteliales requieren de donantes de tejido corneal. En este sentido, el modelo Español de Trasplantes es un referente mundial, siendo España líder en la obtención y trasplante de órganos y tejidos. Sin embargo, en los últimos años, el envejecimiento de la población, que conlleva un aumento de las enfermedades a tratar y una disminución de la calidad del tejido corneal donado, ha llevado a un desequilibrio entre las córneas donadas y las necesarias para trasplante; y a un aumento en la lista de espera para recibir un trasplante endotelial corneal.

En este contexto de escasez de tejidos, la búsqueda de terapias alternativas a los tratamientos quirúrgicos tradicionales queda justificada, pudiendo las nuevas terapias disminuir la necesidad de donantes y aumentar la oferta de tratamientos disponibles, reduciendo la lista de espera para recibir un trasplante. Para ello, en los últimos años, se han desarrollado endotelios artificiales utilizando técnicas de ingeniería tisular o la inyección de Células Endoteliales Corneales (CECs) en cámara anterior (Terapia Celular), que puedan utilizarse según el estado clínico del paciente a tratar.

Recientemente, se ha descrito la inyección en cámara anterior de CECs expandidas *in vitro*, como una herramienta eficaz para el tratamiento de la queratopatía bullosa y la distrofia endotelial de Fuchs. Esta inyección de células cultivadas, no disponible aún en Europa, utiliza corneas de donantes jóvenes y con un alto recuento endotelial para llevar a cabo la expansión *in vitro* de CECs con un medio de cultivo que utiliza factores xenogénicos.

La incorporación de suplementos xenogénicos al medio de cultivo incrementa la posibilidad de respuestas no deseadas del sistema inmunológico a proteínas animales residuales y posibilita la presencia de patógenos animales. Para evitar estas limitaciones, la adopción de un medio de cultivo libre de factores xenogénicos está justificado, ya que surge como una alternativa más segura para el cultivo de las CECs. Aunque el uso de hemo-derivados ya ha mostrado ser eficiente para el cultivo de las CECs en el pasado, la mayoría de estos productos no están estandarizados y no cuentan con un marcado CE. El Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF, *Plasma Rich in Growth Factors*) es uno de los hemo-derivados humanos más estandarizados que ha sido aprobado para su uso clínico por

## Justificación

la Comunidad Europea y la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU., y que se emplea habitualmente en forma de colirio para tratar la patología de la superficie ocular. Se trata de un tipo de plasma rico en plaquetas, consistente en plasma enriquecido en proteínas y factores de crecimiento que estimulan y aceleran la regeneración tisular y que ha demostrado ser efectivo para la expansión de otras estirpes celulares. Todo lo cual justifica el usar el PRGF para el cultivo de CECs, ya que, de ser efectivo, los cultivos serían más fáciles de realizar, seguros, económicos y la terapia desarrollada sería más fácil de trasladar a la práctica clínica.

Por otro lado, actualmente en España, la utilización de córneas procedentes de donantes jóvenes y con una densidad endotelial superior a las 2.500 células/mm<sup>2</sup> para la obtención de cultivos de CECs sólo es posible, si no pueden ser utilizadas para trasplante, pudiéndose utilizar también en investigación, los anillos endoteliales que se descartan habitualmente tras la realización de cualquier tipo de trasplante. Teniendo en cuenta, que en 2022 en España se desestimaron por causas relacionadas con el procesamiento 1.283 córneas y que estas podrían haber sido utilizadas en métodos alternativos a los trasplantes, queda justificado el desarrollo de métodos alternativos de tratamiento aprovechando este tejido para reducir la lista de espera del trasplante endotelial corneal una vez haya sido demostrado que los diferentes tejidos descartados son igual de eficientes para la obtención de cultivos de CECs.

Finalmente, la traslación clínica de la terapia desarrollada requerirá su adaptación a la Normas de Correcta Fabricación (NCF) por tener la consideración de Medicamento de Terapia Avanzada (MTA), por lo que nuevamente queda justificado el poner a prueba la metodología de cultivo desarrollada a nivel experimental, mediante la realización de su producción en una instalación y bajo un sistema de calidad acorde a las NCF.

Por todo lo anterior es pertinente, original y queda justificado, el realizar un trabajo de investigación sobre la obtención de cultivos de CECs, que puedan ser utilizadas en una inyección en cámara anterior, a partir de tejidos descartados para trasplante y con un medio de cultivo libre de factores xenogénicos.



## Hipótesis

"Si supiéramos qué es lo que estamos haciendo, no se llamaría investigación ¿verdad?"

- Atribuido a Albert Einstein



Hipótesis

Es posible obtener cultivos de Células Endoteliales Corneales (CECs) a partir de tejidos descartados para trasplante, con un medio de cultivo libre de factores xenogénicos y una metodología adaptada a las Normas de Correcta Fabricación (NCF), que permita su utilización en el tratamiento de las insuficiencias endoteliales.

Hipótesis



## Objetivos

*"Todo trabajo sobresaliente, tanto en el arte como en la ciencia, es el resultado de un inmenso celo aplicado a una gran idea"*

- Santiago Ramón y Cajal

## Objetivos

1. Estudiar si los diferentes tipos de tejidos endoteliales descartados (anillos y endotelios completos de diferentes características) son eficaces para la obtención de cultivos de Células Endoteliales Corneales (CECs) con un medio de cultivo convencional que incluye factores xenogénicos.
2. Demostrar que un medio de cultivo libre en factores xenogénicos basado en el Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF, *Plasma Rich in Growth Factors*) permite la obtención de cultivos de CECs a partir de tejidos descartados, los cuales preservan el genotipo, fenotipo y función de la CECs nativas en estudios *in vitro*.
3. Estudiar la funcionalidad *ex vivo* de los cultivos de CECs obtenidos con un medio de cultivo libre de factores xenogénicos en modelos organotípicos de lesión endotelial.
4. Trasladar la metodología de cultivo desarrollada a las Normas de Correcta Fabricación (NCF) para su futura aplicación en la práctica clínica.

## Objetivos

## Material y método

*“Si no puedes describir lo que haces como un proceso, no sabes lo que haces”*

- W. Edwards Deming



## Material y método

## 1. Obtención de cultivos de Células Endoteliales Corneales (CECs), a partir de tejidos descartados para su uso clínico, con un medio de cultivo libre de factores xenogénicos

### 1.1. Tejidos empleados para el estudio

Las muestras de tejido humano fueron obtenidas en base al acuerdo marco de colaboración entre el Centro Comunitario de Sangre y de Tejidos (CCST) de Asturias (Oviedo, Asturias, España) y la Fundación de Investigación Oftalmológica (FIO) y fueron tratadas siguiendo los principios de las Declaración de Helsinki y el Real Decreto 1716/2011 por el que se establecen los requisitos de tratamiento de las muestras biológicas de origen humano. De acuerdo con la ley española de trasplantes Real Decreto-Ley 9/2014, todas las córneas utilizadas en este estudio fueron descartadas para uso clínico. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación del Principado de Asturias (CEIM): 2020.050 y 2022.359.

Todos los tejidos se mantuvieron a 4 °C en medio de almacenamiento Optisol/Eusol-C (Alchimia, Ponte S. Nicolò, Italia) o a 31 °C en medio de mantenimiento Tissue C (Alchimia, Ponte S. Nicolò, Italia) hasta su uso. En este estudio se utilizaron 51 córneas de 38 donantes cadáver. La edad media de los donantes de córneas fue de 61,24 ± 2 años y la densidad de CECs, determinada utilizando un microscopio especular CellCheck (Konan Medical, Irvine, CA, EE. UU.), fue de 2.587,78 ± 65 células/mm<sup>2</sup>.

### 1.2. Obtención y cultivo de Células Endoteliales Corneales (CECs)

El protocolo realizado consistió en una disección mecánica del endotelio corneal y su posterior digestión enzimática. Para ello, las córneas fueron recuperadas del medio de mantenimiento y se colocaron con la cara endotelial hacia arriba en una placa Petri que contenía medio de cultivo. Posteriormente, la membrana de Descemet junto con las Células Endoteliales Corneales (CECs) fue diseccionada desde el límite visible de la línea de Schwalbe, y se acondicionó durante 2-7 días a 37 °C en medio de cultivo.

Posteriormente, se digirió la membrana de Descemet junto con las CECs durante 2 horas a 37 °C con TrypLE® (Número de catálogo: 12605010; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). A continuación, la acción enzimática se neutralizó con medio de cultivo y las CECs se centrifugaron a 400 rcf durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y las suspensiones

celulares procedentes de los anillos endoteliales periféricos se sembraron en un pocillo de una placa de 48 (área de 1,10 cm<sup>2</sup>). En el caso de las suspensiones celulares procedentes de un endotelio completo se sembraron en dos pocillos de placas de cultivo de 48 pocillos.

Para los estudios de medida de la Resistencia Eléctrica Transendotelial (TER, *Transendothelial Electrical Resistance*) las suspensiones celulares fueron sembradas de la misma forma, pero en *inserts* Transwell® de 1,12 cm<sup>2</sup> y 0,4 µm de tamaño de poro situados en una placa de cultivo de 12 pocillos (Corning, Corning, NY, EE. UU.). Todos los pocillos de las placas de cultivo fueron previamente tratados con FNC Coating Mix® (Athena Environmental Sciences, Baltimore, MD, EE. UU.).

Todas las incubaciones y los cultivos de CECs se llevaron a cabo en un incubador con una humedad relativa del 95%, una temperatura de 37 °C y un 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se cambió cada dos o tres días.

### *1.2.1. Obtención y cultivo de Células Endoteliales Corneales (CECs) a partir de tejidos descartados para su uso clínico*

Se obtuvieron cultivos de CECs siguiendo la metodología de cultivo descrita en el apartado 1.2., a partir de los diferentes tejidos corneales descartados que pueden ser procesados y que han sido clasificados en tres grupos:

1. **“No DMEK”**: endotelios con bajo recuento endotelial y/o con presencia de guttas, pliegues, o zonas de células muertas (n = 5).
2. **“No Trasplante”**: endotelios con un buen recuento endotelial, en los que se produce una rotura del endotelio central cuando está siendo diseccionado para su utilización en una cirugía tipo DMEK, o endotelios descartados para trasplante por un motivo registrado en la historia del donante (neoplasia hematológica, enfermedad neurodegenerativa...) (n = 5).
3. **“Anillo Endotelial”**: anillos endoteliales periféricos sobrantes tras la preparación del endotelio central para una cirugía tipo DMEK (n = 4).
4. **“Endotelio Nativo”**: endotelios no cultivados de bajo recuento endotelial, que se utilizan como un control de las CECs (n = 3).

Para la obtención de los cultivos celulares se utilizó un medio de cultivo convencional suplementado con Suero Bovino Fetal (SBF) compuesto de: opti-mem I (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.) suplementado con 8% (v/v) de SBF; 0,3 mM de ácido ascórbico 2-fosfato; 200 mg/L de cloruro de calcio; 0,04% (v/v) de sulfato de condroitina; 10 U/mL de penicilina, 10 µg/mL de estreptomina; 20 ng/mL de factor de crecimiento nervioso (Merck,

Darmstadt, Alemania) y 5 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (Austral Biologicals, San Ramón, CA, EE. UU.).

*1.2.2. Obtención de cultivos de Células Endoteliales Corneales (CECs), con un medio de cultivo libre de factores xenogénicos*

Para evaluar el efecto de un medio de cultivo libre de xenogénicos se obtuvieron cultivos de CECs según la metodología de cultivo descrita en el apartado 1.2. comparando el medio de cultivo convencional (n = 31) y un medio de cultivo libre en factores xenogénicos que emplea el Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF, *Plasma Rich in Growth Factors*) como única fuente de factores de crecimiento (n = 31).

Medio de cultivo convencional: optimem I suplementado con 8% (v/v) de SBF; 0,3 mM de ácido ascórbico 2-fosfato; 200 mg/L de cloruro de calcio; 0,04% (v/v) de sulfato de condroitina; 10 U/mL de penicilina, 10 µg/mL de estreptomina; 20 ng/mL de factor de crecimiento nervioso y 5 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico.

Medio de cultivo libre de factores xenogénicos: optimem I suplementado con 10% (v/v) de PRGF; 200 mg/L de cloruro de calcio; 10 U/mL de penicilina y 10 µg/mL de estreptomina.

Para la preparación del PRGF se utilizó la siguiente metodología: se extrajo sangre de voluntarios sanos mediante venopunción (rango de edad entre 25 y 45 años), previo consentimiento informado de los participantes. En este consentimiento informado se proporcionó una explicación sobre la naturaleza y las posibles consecuencias del estudio, en cumplimiento con los principios de la Declaración de Helsinki. Las muestras de sangre de cada voluntario fueron procesadas siguiendo el método descrito por Anitua et al<sup>275</sup>. En resumen, se obtuvieron 81 mL de sangre humana en tubos de 9 mL con citrato sódico al 3,8% (p/v) (Vacuette®, Greiner Bio-One, Madrid, España). Las muestras de sangre se centrifugaron a 580 rcf durante 8 minutos a temperatura ambiente. Se pipeteó la columna de plasma evitando la fase leucocitaria y se incubó a 37 °C con 50 µL/mL de cloruro de calcio al 10% (p/v) (B. Braun Medical, Barcelona, España) hasta la formación del coágulo. Finalmente, se recogieron los sobrenadantes evitando el coágulo, y el PRGF se alicuotó y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

### 1.3. Caracterización de los cultivos obtenidos

La caracterización de los cultivos de CECs se llevó a cabo mediante el empleo de diversas técnicas.

En el apartado "1.2.1. Obtención y cultivo de CECs a partir de tejidos descartados para su uso clínico", se utilizaron técnicas de Inmunocitoquímica (n = 6) y la medición de la TER (n = 9).

En el caso del apartado "1.2.2. Obtención de cultivos de CECs, con un medio de cultivo libre de factores xenogénicos" se realizó una completa caracterización de los cultivos obtenidos, incluyendo inmunocitoquímica (n = 22), TER (n = 18), densidad celular y análisis morfométrico (n = 12), secuenciación de ARN (RNA-seq) (n = 8), y PCR cuantitativa (qPCR) (n = 14).

#### 1.3.1. Examen de los cultivos celulares

Los cultivos de CECs fueron examinados a diario tomando fotografías mediante una cámara EC3 acoplada a un microscopio de contraste de fases Leica DMIL LED (Leica, Wetzlar, Hesse, Alemania). Una vez que los cultivos alcanzaron confluencia fueron utilizados para el resto de los estudios realizados.

#### 1.3.2. Inmunocitoquímica

Para verificar el fenotipo de las CECs, se utilizaron anticuerpos contra la zonula occludens-1 (ZO-1) (1:50; Número de catálogo: 61-7300, Thermo Fisher Scientific), la subunidad  $\alpha 1$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa (1:100; Número de catálogo: 05-369, Merck), la conexina-43 (1:100; Número de catálogo: C6219, Merck) y la vimentina (1:100; Número de catálogo: M0725, Agilent DAKO, Santa Clara, CA, EE. UU.). Para ello, los cultivos de CECs confluentes se fijaron con metanol frío (Merck) durante 10 minutos, se lavaron con una solución de PBS 1X 3 veces durante 5 minutos y se permeabilizaron con Triton-X 100 al 0,3% (VWR, Radnor, PA, EE. UU.) durante otros 5 minutos (se utilizó Triton-X 100 al 0,03% para el anticuerpo ZO-1). A continuación, las muestras se lavaron con PBS 1X una vez durante 5 minutos y se incubaron a 4 °C durante la noche con los anticuerpos primarios seleccionados en una solución de PBS 1X que contenía un 10% de suero de cabra como agente bloqueante (Número de catálogo: ab7481, Abcam, Cambridge, Reino Unido). Posteriormente, las muestras se incubaron en agitación con los anticuerpos secundarios correspondientes (1:500; Número de catálogo: A-11032 y A-11034, Thermo Fisher Scientific)

durante 2 horas a temperatura ambiente y se tiñeron durante 10 minutos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Thermo Fisher Scientific), para permitir la visualización de los núcleos. Entre ambas incubaciones, las muestras se lavaron de nuevo 3 veces con PBS 1X durante 5 minutos.

Todas las muestras se examinaron utilizando un microscopio de fluorescencia Leica DMI6000B, y se capturaron 5 fotos de campos aleatorios con una cámara Leica DFC310FX a una magnificación de 200x.

### 1.3.3. Estudio de la función barrera: Resistencia Eléctrica Transendotelial (TER, Transendotelial Electrical Resistance)

Se utilizaron un par de sondas Ag/AgCl y un medidor de voltios-ohmios Millicell-ERS2 (Merck), de acuerdo con las pautas del fabricante, para evaluar la TER de los cultivos confluentes de CECs. El valor de TER ( $\Omega\text{cm}^2$ ) se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{TER} = (R_{\text{muestra}} - R_{\text{blanco}}) \times \text{área efectiva}$$

$R_{\text{muestra}}$ : valor de resistencia de los *inserts* con CECs cultivadas.

$R_{\text{blanco}}$ : valor de resistencia de los *inserts* sin CECs cultivadas.

Área efectiva: 1,12  $\text{cm}^2$ .

Todas las mediciones se realizaron por triplicado y se calculó el valor promedio y el error estándar de la media (ESM).

### 1.3.4. Densidad celular y análisis morfométrico

Para llevar a cabo el estudio de la densidad celular y el análisis morfométrico se empleó el software ImageJ v1.52t (NIH, Bethesda, MD, EE. UU.). Para ello, se utilizaron las imágenes de inmunofluorescencia de los marcadores ZO-1 y  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa, realizadas a los cultivos de CECs. El recuento total de células se realizó de manera manual por dos observadores independientes en las 5 imágenes capturadas. La medición de los datos morfométricos, incluyendo el área, el perímetro y la circularidad de las células, se llevó a cabo de forma manual, trazando los contornos celulares en 2 imágenes seleccionadas al azar de las 5 disponibles para cada cultivo.

El índice de circularidad de las células se calculó como  $\frac{4\pi \cdot \text{área}}{\text{perímetro}^2}$ . Se calculó el valor promedio y el ESM de las mediciones realizadas.

## Material y método

### 1.3.5. Aislamiento y secuenciación de ARN (RNAseq)

Para obtener datos del transcriptoma de las CECs, se realizó un análisis de secuenciación de ARNm en la plataforma de secuenciación Illumina (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.). Se extrajo el ARN total de cultivos confluentes de CECs utilizando el kit de aislamiento de ARN Pico Pure™ (Número de catálogo: KIT0202, Applied Biosystem, Foster City, CA, EE. UU.). La calidad de las muestras se verificó en un Agilent BioAnalyzer (Número de catálogo: G2939BA, Agilent) utilizando el Eukaryotic Total RNA Nano kit (Número de catálogo: 5067-1511, Agilent) según el protocolo del fabricante. Se aceptaron las muestras con un número de integridad del ARN (RIN) > 8 para la preparación de la biblioteca.

Las bibliotecas se prepararon a partir del ARN total con el kit NEBNext® Ultra™ II RNA Library Prep for Illumina (New England BioLabs, Ipswich, MA, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los ciclos de secuenciación se ejecutaron en un instrumento Illumina NextSeq 500 (Illumina) utilizando secuenciación de extremo único de 75 ciclos.

Se descargaron archivos FastQ públicos, utilizados como muestras control de endotelio nativo no cultivado, del Sequence Read Archive (SRA). Estos datos son provenientes del estudio de Tokuda et al<sup>276</sup>. Las muestras seleccionadas fueron DRR228774, DRR228775, DRR228778, DRR228780. Este estudio fue seleccionado debido a que las técnicas y tejidos empleados guardan similitud con los de nuestro estudio.

Las lecturas de todos los datos se alinearon con el genoma de referencia humano (GRCh38) utilizando los parámetros predeterminados de STAR v2.5.4. El control de calidad de los archivos FastQ y BAM se realizó con MuliQC v1.13. sobre la base de la alineación del transcriptoma, así como de la alineación del genoma y se utilizó FeatureCounts Subread-v2.0.2. para obtener el recuento de lecturas para los genes. El análisis posterior se realizó en R v4.2.2. con ayuda de varios paquetes de expansión. El análisis de expresión diferencial se realizó con DEseq2 v1.38.3. Se consideró que cualquier gen en todo el genoma con al menos un recuento  $\geq 1$  estaba expresado, mientras que, para considerar expresión diferencial, los umbrales seleccionados fueron un p-valor < 0,05 y una razón de cambio (*Fold Change*) de al menos 1,5.

Se generaron representaciones gráficas en forma de Diagrama de Volcán (*Volcano Plot*) para visualizar las diferencias en la expresión génica. Además, se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA, *Principal Component Analysis*) para evaluar la similitud entre las muestras analizadas, lo que proporcionó información adicional para comprender las relaciones entre los grupos de datos.

Además, los niveles de expresión génica relativa de 15 genes de interés en las CECs fueron representados en un *Heatmap*. El objetivo de este *Heatmap* es representar gráficamente con una escala de colores los valores relativos de expresión génica de cada uno de los genes seleccionados.

El *Heatmap* se creó utilizando el software de análisis de datos R v4.3.2 y la biblioteca de visualización *Heatmap*. Los colores en el *Heatmap* representan los niveles relativos de expresión génica, con el azul indicando expresión baja y el rojo indicando expresión alta.

Los genes se agruparon en cuatro categorías según su misión en la célula:

Función: genes que intervienen en la capacidad de las CECs de mantener una monocapa celular que regula el equilibrio hídrico y mantiene la homeostasis corneal.

Adhesión: genes relacionados con la capacidad de las CECs de adherirse al sustrato.

Proliferación: genes relacionados con la capacidad de división celular de las CECs.

Matriz extracelular: genes que sintetizan las fibras de colágeno de la membrana basal de las CECs.

Los genes elegidos para cada categoría fueron los siguientes:

### **Función:**

***SLC4A11*** (*Solute Carrier Family 4 Member 11*): este gen codifica una proteína de transporte de aniones que está involucrada en el mantenimiento del equilibrio de electrolitos y el pH en el endotelio corneal.

***ALCAM*** (*Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule*): también conocido como CD166, es una molécula de adhesión celular que juega un papel en la comunicación intercelular y la migración celular. En el endotelio corneal, podría estar involucrada en la interacción entre las CECs y otras células del tejido corneal, así como en la regulación de la respuesta inflamatoria.

***ATP1A1*** (*ATPase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> Transporting Subunit Alpha 1*): este gen codifica una subunidad de la bomba de sodio y potasio en las CECs, esencial para mantener el equilibrio de iones.

***PITX2*** (*Paired-Like Homeodomain 2*): es un factor de transcripción que está involucrado en la regulación de la expresión génica que controla la



morfología y función de las CECs, especialmente durante el desarrollo y diferenciación del tejido ocular.

**PRDX6** (*Peroxiredoxin 6*): es una enzima antioxidante que desempeña un papel en la protección de las células contra el estrés oxidativo. En el endotelio corneal, puede contribuir a mantener la integridad y la función de las CECs en un entorno altamente expuesto a la luz y al oxígeno.

### **Adhesión:**

**CLDN11** (*Claudin 11*): la claudina-11 es una proteína de la familia de las claudinas, que son componentes esenciales de las uniones estrechas en las células epiteliales y endoteliales. Estas uniones desempeñan un papel crucial en la regulación de la permeabilidad de las capas celulares y la integridad del tejido. En el endotelio corneal, *CLDN11* puede contribuir a la formación y mantenimiento de las uniones estrechas entre las CECs, lo que es fundamental para la función barrera endotelial.

**AJAP1** (*Adherens Junctions Associated Protein 1*): este gen está asociado con las uniones adherentes, que son estructuras de adhesión que conectan células adyacentes y desempeñan un papel importante en la cohesión tisular y la comunicación intercelular.

**TMEM204** (*Transmembrane Protein 204*): aunque su función exacta en el endotelio corneal aún no se comprende completamente, se trata de una proteína transmembrana lo que sugiere que podría estar involucrada en la interacción celular y la adhesión a través de la membrana celular.

**TMEM178A** (*Transmembrane Protein 178A*): de manera similar a *TMEM204*, la función precisa de *TMEM178A* en el endotelio corneal aún no se conoce con exactitud. Dado que se trata de otra proteína transmembrana, es posible que esté involucrada en la adhesión y comunicación celular a través de la membrana celular.

### **Proliferación:**

**MKI67**: también conocido como *Ki-67* es un marcador clásico de proliferación. *MKI67* es una buena elección para identificar células en fase activa de división. Su expresión aumenta durante las fases G1, S, G2 y M del ciclo celular.

**CENPF** (*Centromere Protein F*): este gen está relacionado con la formación y función del centrómero y se asocia con la segregación adecuada de los cromosomas durante la mitosis. Su expresión es alta en células en división.

**PCNA** (*Proliferating cell nuclear antigen*): PCNA es un marcador nuclear ampliamente utilizado para medir la proliferación celular. Su expresión está estrechamente relacionada con la fase S del ciclo celular y puede indicar la replicación del ADN.

**TP53** (*Tumor protein P53*): también conocido como *p53*, es un gen supresor de tumores que regula la proliferación celular y su actividad también está relacionada con la respuesta al estrés celular y la regulación del ciclo celular. Su expresión puede aumentar en condiciones de daño celular.

### **Matriz Extracelular:**

**COL8A1** (*Collagen Type VIII Alpha 1 Chain*): codifica una de las subunidades alfa del colágeno tipo VIII, que es un componente importante de la matriz extracelular en varios tejidos, incluido el endotelio corneal. El colágeno tipo VIII se encuentra en la membrana Descemet del endotelio corneal y está involucrado en la estructura de la córnea. Su expresión puede ser un marcador de la matriz extracelular específica del endotelio corneal y su integridad.

**COL4A2** (*Collagen Type IV Alpha 2 Chain*): es otro gen relacionado con la producción de colágeno en la matriz extracelular de la córnea. Codifica una subunidad alfa del colágeno tipo IV, que es un componente clave de las membranas basales en varios tejidos, incluido el endotelio corneal. En el endotelio corneal, el colágeno tipo IV es esencial para mantener la barrera funcional entre las células endoteliales y la estabilidad de la córnea.

#### *1.3.6. Aislamiento de ARN y PCR cuantitativa (qPCR)*

Se realizó una qPCR de los cuatro genes utilizados como marcadores fenotípicos en la inmunocitoquímica (ZO-1: *TJP1*, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa: *ATP1A1*, Conexina-43: *CX43* y Vimentina: *VIM*) que respalda y valida los datos de RNAseq. Para ello, los cultivos confluentes de CECs fueron digeridos con TrypLE®. A continuación, se extrajo el ARN total de las CECs utilizando el kit de aislamiento de ARN Pico Pure™ de Applied Biosystems™. Posteriormente, se verificó la pureza del ARN mediante la relación A260/A280 y A260/A230. Seguidamente, el ARN total se utilizó para la conversión lineal de ARN a cDNA con el High Capacity RNA-to-cDNA Master

Mix (Número de catálogo: 4387406, Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se personalizaron oligonucleótidos (Tabla 1) utilizando PrimerBLAST y se encargó su síntesis a Merck. La expresión génica se analizó mediante cuantificación relativa, utilizando como gen constitutivo (*housekeeping*) el gen de la actina (*ACTB*) en un Sistema de PCR en tiempo real 7500 (Applied Biosystems) utilizando un Power SYBR Green PCR Master Mix (Número de catálogo: 4367659, Applied Biosystems). Para el cálculo de los valores de expresión relativa se utilizó el método  $\Delta\Delta Ct$ . Los datos se analizaron utilizando el software SDS v2.3. (Applied Biosystems). Cada muestra se analizó por triplicado en cada uno de los experimentos, y se calcularon el valor promedio y el ESM para cada grupo.

**Tabla 1.** Oligonucleotidos utilizados en el análisis de qPCR. ZO-1: *TJP1*,  $Na^+/K^+$  ATPasa: *ATP1A1*, *conexina-43*: *CX43*, *vimentina*: *VIM* y *actina*: *ACTB*.

GEN	ID	FORWARD	REVERSE
<b><i>TJP1</i></b>	NM_001301025.3	5'- CAGCAACTTTCAGAC CACCA-3'	5'- GTGCAGTTTCACTT GGCAGA-3'
<b><i>ATP1A1</i></b>	NM_000701.8	5'- TCCCAATTCACCTGTT GGGC-3'	5'- TGCACCACCACGA TACTGAC-3'
<b><i>CX43</i></b>	NM_000165.5	5'- AGGAGTTCAATCACTT GGCGT-3'	5'- TACTGACAGCCAC ACCTTCC-3'
<b><i>VIM</i></b>	NM_003380.5	5'- CTCCCTGAACCTGAG GGAAACT-3'	5'- AGGTCACGTGATG CTGAGAAG-3'
<b><i>ACTB</i></b>	NM_001101.5	5'- ATTCCAAATATGAGAT GCGTTGTT-3'	5'- GTGGACTTGGGAG AGGACTG-3'

## 2. Estudio de la funcionalidad de los cultivos de Células Endoteliales Corneales (CECs)

### 2.1. Estudio de la funcionalidad *in vitro* de los cultivos de Células Endoteliales Corneales (CECs)

Para el estudio de la funcionalidad *in vitro*, se utilizaron córneas de donante cadáver ( $n = 6$ ) descartadas para su uso clínico. Las córneas procedieron de donantes con una edad media de  $61,5 \pm 8$  años y presentaron una densidad de CECs, determinada utilizando un microscopio especular CellCheck, de  $2.670,83 \pm 156$  células /mm<sup>2</sup>.

Para este experimento se utilizaron cultivos de CECs obtenidos con medio de cultivo libre de factores xenogénicos de acuerdo a la metodología de cultivo descrita en el apartado 1.2.

Se realizó una cuantificación de la actividad bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa utilizando el kit Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase Microplate Assay Kit (Número de catálogo: CAK1019, Cohesion Biosciences, Londres, Reino Unido) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Para la cuantificación, se midió mediante espectrofotometría, la actividad ATPasa total de la muestra y la actividad ATPasa total inhibiendo la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa. Del cociente de ambas medidas se obtiene la actividad ATPasa específica de la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa en los cultivos de CECs.

### 2.2. Estudio de la funcionalidad de los cultivos de Células Endoteliales Corneales (CECs) en un modelo organotípico *ex vivo* de disfunción endotelial

Para el estudio de la funcionalidad *ex vivo* se utilizaron córneas de donante cadáver ( $n = 11$ ) descartadas para su uso clínico. Asimismo, se utilizaron córneas de conejo *New Zealand* ( $n = 18$ ) descartadas de cirugías no oftálmicas realizadas en el Bioterio de la Universidad de Oviedo.

En este estudio se utilizaron córneas de conejo con un rango de edad de 2 a 3 meses. La edad media de los donantes de córneas fue de  $58,72 \pm 4$  años y la densidad de CECs, determinada utilizando un microscopio especular CellCheck, fue de  $2.534,33 \pm 65$  células/mm<sup>2</sup>

## Material y método

### *2.2.1. Creación de los modelos organotípicos ex vivo de disfunción endotelial*

Se establecieron dos modelos *ex vivo* de disfunción endotelial, con el propósito de evaluar la funcionalidad de los cultivos de CECs obtenidos con un medio libre en factores xenogénicos.

#### *2.2.1.1. Modelo de raspado*

Para la realización del modelo de raspado, se utilizaron córneas de conejo *New Zealand* (n = 9). En primer lugar, se enuclearon los globos oculares. Posteriormente, se tallaron las córneas y se colocaron con la cara endotelial hacia arriba en una placa Petri con medio de cultivo. A continuación, se realizó un raspado de las CECs utilizando una hemosteta. Se realizaron 20 raspados paralelos en la cara interna de la córnea, seguidos de 20 raspados en sentido perpendicular al anterior, para eliminar las CECs de las córneas dejando íntegra la membrana de Descemet.

#### *2.2.1.2. Modelo de descemetorrexix*

Para la realización del modelo de descemetorrexix, se utilizaron córneas de conejo *New Zealand* (n = 9) y córneas humanas (n = 6). En el primer caso, se enuclearon los globos oculares, se tallaron las córneas y se colocaron con la cara endotelial hacia arriba en una placa Petri con medio de cultivo. Finalmente, la membrana de Descemet junto con las CECs fue diseccionada desde el límite visible de la línea de Schwalbe. En el caso de las córneas humanas, se utilizaron córneas a las que se les había realizado una descemetorrexix para la obtención del endotelio corneal central, siguiendo la misma metodología descrita en conejo *New Zealand*.

### *2.2.2. Tratamiento de los modelos organotípicos ex vivo de disfunción endotelial con cultivos de Células Endoteliales Corneales (CECs)*

Para llevar a cabo el tratamiento de los modelos organotípicos se utilizaron cultivos de CECs humanas o de conejo. Los cultivos de CECs fueron obtenidos de acuerdo con la metodología descrita en el apartado 1.2. utilizando el medio de cultivo libre de factores xenogénicos descrito en el apartado 1.2.2. Las CECs de conejo, se cultivaron con un medio de cultivo, en el que el PRGF fue obtenido de sangre de conejo, siguiendo la misma metodología utilizada para la obtención del PRGF humano.

Los cultivos confluentes de CECs humanas o de conejo, se digirieron con TrypLE®. A continuación, la acción enzimática se neutralizó con medio de

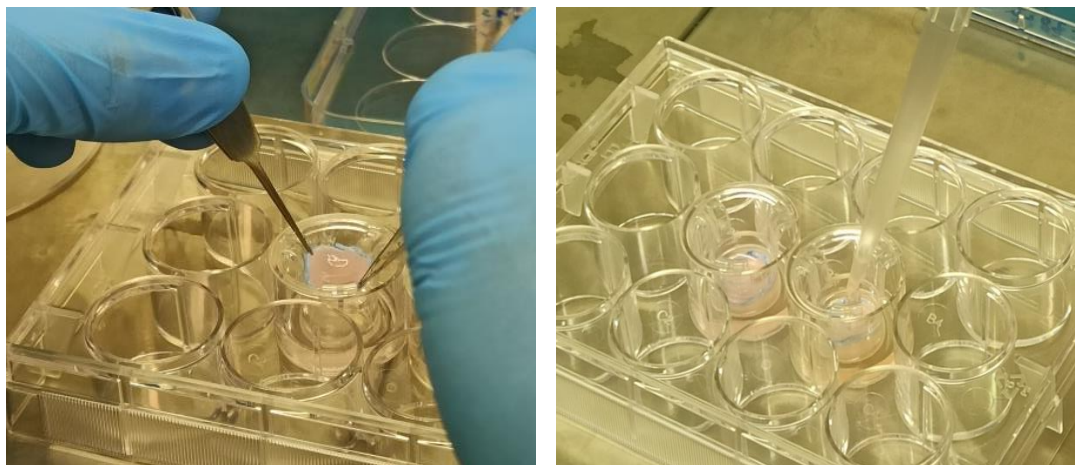
cultivo y las suspensiones de CECs se centrifugaron a 400 rcf durante 10 minutos. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y las CECs se resuspendieron en un volumen total de 250  $\mu$ L hasta su uso en los modelos organotípicos *ex vivo*.

Para el estudio de la funcionalidad de los cultivos de CECs, las córneas desprovistas de CECs (modelo de raspado) o de CECs y membrana de Descemet (modelo de descemetorrexis) se situaron con la cara endotelial hacia arriba en *inserts* Transwell® de 1,12 cm<sup>2</sup> de área y 0,3  $\mu$ m de diámetro de poro (Figura 4). La parte inferior del *insert* se cubrió de 1 mL de medio de cultivo libre de factores xenogénicos y en la parte superior se sembraron las suspensiones de CECs en un volumen de 250  $\mu$ L de medio de cultivo, incubándose durante 24 horas a 37 °C con un 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurridas las 24 horas, se descartó el *insert* y las córneas se sumergieron en un pocillo de una placa de 12 pocillos, manteniéndose en un sistema de órgano-cultivo durante 7 días, cambiando el medio cada 2-3 días.

Los modelos organotípicos *ex vivo* realizados y los tratamientos aplicados aparecen descritos en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Modelos organotípicos *ex vivo* y tratamientos realizados. CECs: Células Endoteliales Corneales.

			TRATAMIENTOS		
			Control	CECs conejo	CECs humanas
MODELOS	Raspado	Córneas conejo	n = 4	n = 3	n = 2
	Descemetorrexis	Córneas conejo	n = 4	n = 3	n = 2
		Córneas humanas	n = 1	n = 2	n = 3



**Figura 4.** Modelos organotípicos ex vivo de funcionalidad endotelial siendo colocados en el insert (izquierda) y en el momento de la siembra (derecha).

### 2.2.3. Caracterización de los modelos organotípicos ex vivo

#### 2.2.3.1. Microscopia Especular

Se realizó un conteo endotelial, utilizando un microscopio especular CellCheck, a córneas de conejo *New Zealand* que posteriormente se utilizaron para la realización del modelo organotípico ex vivo de raspado o de descemetorrexis. Una vez realizados los modelos, las córneas se sumergieron en medio de cultivo y se comprobó la ausencia de CECs a las 2 horas y tras 7 días de órgano-cultivo utilizando el mismo microscopio.

Asimismo, se realizó un conteo endotelial a los modelos organotípicos ex vivo generados y que fueron tratados con cultivos de CECs humanas o de conejo.

#### 2.2.3.2. Estudios histológicos e inmunofluorescencia

Los diferentes modelos organotípicos ex vivo de disfunción endotelial, con y sin CECs cultivadas, fueron evaluados mediante técnicas histológicas. Para ello, los modelos fueron fijados con metanol frío durante 24 horas a 4 °C. Posteriormente, se lavaron con PBS 1X y fueron deshidratados y criopreservados con sacarosa al 30% (p/v) durante 24 horas a 4 °C. Trascorrido este tiempo los modelos fueron embebidos en Tissue-Tek® (Número de catálogo: 4583, Sakura Finetek, Torrance, CA, EE. UU.) a -80 °C. A continuación, se cortaron secciones de 10 µm con un criostato (Leica, Nussloch, Alemania) y las secciones se colocaron en portas Superfrost™

Plus (Thermo Fisher Scientific) para la realización de una tinción Hematoxilina-Eosina (H-E).

Para la realización de la tinción de H-E, se siguieron los siguientes pasos: se prepararon las soluciones de hematoxilina (Número de catálogo: MHS32-1L, Merck) y eosina (Número de catálogo: 1.15935.0100, Merck) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se sumergieron durante aproximadamente 2 minutos en un coplin lleno de agua. Posteriormente, se sumergieron en la solución de hematoxilina durante otros 2 minutos. Transcurrido ese tiempo, se lavaron con agua y se repitió el proceso con la solución de eosina. A continuación, las muestras se deshidrataron a través de un gradiente de etanol, comenzando con etanol al 70% (v/v) y finalizando con xilol. Por último, se utilizó como medio de montaje Entellan® (Número de catálogo: 1.07960.0500, Merck) y se colocó un cubreobjetos. Todas las muestras se examinaron utilizando un microscopio Leica DM6000B con una cámara Leica DFC310FX acoplada.

Además, se realizó una inmunofluorescencia frente a los marcadores ZO-1 y Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa, marcadores característicos de la función barrera y bomba endotelial, de la manera descrita en la sección 1.3.2. en los modelos organotípicos *ex vivo* humanos, tratados con cultivos de CECs humanas.

#### 2.2.3.3. Microscopia electrónica de barrido

La morfología de la superficie posterior corneal de los modelos organotípicos *ex vivo* humanos, tratados con cultivos de CECs humanas, fue evaluada mediante microscopía electrónica de barrido. Para ello, los modelos fueron fijados con disolución Karnovsky (paraformaldehído 2% (p/v), glutaraldehído 2,5% (p/v), tampón Sørensen 0,1 M) durante 24 horas a 4 °C. Posteriormente, se lavaron 3 veces con agua destilada. A continuación, los modelos fueron deshidratados en un gradiente de concentraciones crecientes de acetona: 30%, 50%, 70%, 90% y 100% (v/v), durante 10 minutos y secados por el método de punto crítico. Finalmente, los modelos fueron metalizados con una capa de oro bajo condiciones de vacío y observados con un microscopio electrónico de barrido JEOL 6610LV (JEOL co., Tokio, Japón) usando un voltaje de aceleración de 10kV.



### 3. Traslación de la terapia celular desarrollada a las Normas de Correcta Fabricación (NCF)

Se establecieron los requisitos específicos necesarios para la fabricación, de acuerdo con las Normas de Correcta Fabricación (NCF), del Medicamento de Terapia Avanzada (MTA) desarrollado, consistente en una suspensión celular de CECs para tratar las disfunciones endoteliales. La fabricación se llevó a cabo en el sistema cerrado de presión positiva que se encuentra ubicado en las instalaciones del Instituto Oftalmológico Fernández-Vega (IOFV).

Se definieron los parámetros para el cultivo de las CECs, así como sus requisitos de calidad y los criterios para su liberación y transporte. Con esta finalidad, se desarrollaron el Procedimiento Normalizado de Trabajo (PNT) de Producción y la Guía de Fabricación (Figura 5).



**Figura 5.** Guía de fabricación de suspensión celular de CECs. CECs: Células Endoteliales Corneales.

El proceso de elaboración que aparece detallado en el PNT de Producción y en la Guía de Fabricación puede resumirse en las siguientes etapas:

1. Acondicionamiento del endotelio corneal: se obtiene el endotelio corneal del medio de conservación y se acondiciona durante 2-7 días a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> en medio de cultivo: optimem I; suplementado con 10% (v/v) de PRGF; 200 mg/L de cloruro de calcio.

2. Establecimiento del cultivo primario: una vez acondicionado, el endotelio corneal se digiere durante 2 horas a 37 °C con TrypLE®. A continuación, la acción enzimática se neutraliza con medio de cultivo y las CECs se centrifugan a 400 rcf durante 10 minutos, se elimina el sobrenadante y las suspensiones celulares se siembran con medio de cultivo, en un pocillo de una placa y se incuban a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>.

3. Cambio de medio del cultivo primario: a las 24-72 horas se cambia el medio de cultivo, hasta que los cultivos alcancen la confluencia.

4. Liberación del medicamento de terapias avanzadas (suspensión de CECs): una vez que las CECs son confluentes, y presentan una morfología adecuada, se toman fotografías, y los cultivos primarios se digiere durante 2 horas a 37 °C con TrypLE®. A continuación, la acción enzimática se neutraliza con medio de cultivo y las CECs se centrifugan a 400 rcf durante 10 minutos, se elimina el sobrenadante y la suspensión celular se acondiciona, etiqueta y trasladada al quirófano, una vez revisados todos los controles de calidad de todo el proceso.

Se han establecido los siguientes controles de calidad:

PARÁMETROS DE CONTROL DEL PROCESO		
Monitorización de parámetros físicos del sistema cerrado de presión positiva		
Parámetro	Límite de alerta	Límite de acción
<i>Exhaust filter</i>	20-30 Pa	< 20 Pa
<i>Downflow filter</i>	> 120 Pa	> 140 Pa
<i>Inflow</i>	< 0,28 m/s o > 0,47 m/s	< 0,20 m/s o > 0,55 m/s
Temperatura sistema cerrado	> 25 °C	> 30 °C
Humedad	> 55%	> 60%
Temperatura incubador	< 35 °C o > 38 °C	< 34,5 °C o > 38,5 °C
CO <sub>2</sub> incubador	> 7%	> 10%
Presión salida CO <sub>2</sub>	< 50 bares	< 20 bares
Presión entrada CO <sub>2</sub>	0,3 bares	0,3 bares

<b>Monitorización de partículas no viables</b>		
<b>Parámetro</b>	<b>Límite de alerta</b>	<b>Límite de acción</b>
<b>Partículas de 0,5 µm</b>	3.000	3.520
<b>Partículas de 5 µm</b>	15	20
<b>Monitorización de partículas viables</b>		
<b>Parámetro</b>	<b>Límite</b>	
<b>Tioglicolato del hisopado de las paredes del sistema cerrado</b>	Ausencia	
<b>Tioglicolato del hisopado del interior del incubador</b>	Ausencia	
<b>Tioglicolato del hisopado del agua del incubador</b>	Ausencia	
<b>Tioglicolato del hisopado del exterior de los equipos</b>	Ausencia	
<b>Placas de sedimentación (bacterias)</b>	Ausencia	
<b>Placas de sedimentación (hongos)</b>	Ausencia	
<b>Impronta de huellas de los guantes</b>	Ausencia	
<b>Monitorización de temperaturas</b>		
<b>Zona</b>	<b>Límite de alerta</b>	<b>Límite de acción</b>
<b>Frigoríficos (AP-05_01 y AP-05_02)</b>	< 2 °C y > 8 °C	< 0 °C y > 10 °C
<b>Estufa Memmert UNB 500 (AP-08_01)</b>	< 32 °C y > 36 °C	< 30 °C y > 38 °C
<b>Estufa Prodintec (AP-08_02)</b>	< 22 °C y > 26 °C	< 20 °C y > 28 °C
<b>Almacén</b>	< 15 °C y > 25 °C	< 13 °C y > 28 °C
<b>PARÁMETROS DE CONTROL DEL PRODUCTO</b>		
<b>Esterilidad</b>		
<b>Estudio</b>	<b>Límite</b>	
<b>Tioglicolato al medio de cultivo endotelial y al medio de conservación del endotelio corneal</b>	Sin crecimiento	
<b>Tioglicolato al medio de cultivo del cultivo primario antes de acondicionar y liberar el medicamento</b>	Sin crecimiento	

<b>Ensayo de control de esterilidad al medio de cultivo del cultivo primario antes de acondicionar y liberar el medicamento</b>	Sin crecimiento
<b>Ensayo de detección de micoplasma al medio de cultivo del cultivo primario antes de acondicionar y liberar el medicamento</b>	Sin crecimiento
<b>Ensayo de detección de endotoxinas al medio de cultivo del cultivo primario antes de acondicionar y liberar el medicamento</b>	Mayor a 5 EU/mL
<b>Calidad</b>	
<b>Parámetro</b>	<b>Límite</b>
<b>Morfología del cultivo primario</b>	Morfología hexagonal
<b>Número de células</b>	Informativo (confluencia)

A continuación, se realizó la producción de un primer lote de medicamento de terapia avanzada, siguiendo el sistema de cultivo desarrollado a nivel experimental, con el fin de adaptar este sistema a las nuevas condiciones de trabajo. Finalmente, se procedió a fabricar tres lotes del MTA en el sistema cerrado de presión positiva. Ninguno de los tres lotes fabricados fueron administrados a pacientes.

#### 4. Análisis Estadístico

Se realizaron análisis estadísticos utilizando el programa GraphPad Prism v8.0.1. (GraphPad, San Diego, CA, EE. UU.). La distribución normal de los valores analizados se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Las diferencias significativas entre los grupos definidos se comprobaron utilizando pruebas paramétricas (prueba t de Student o prueba ANOVA) o no paramétricas (prueba Mann-Whitney o prueba Kruskal-Wallis). Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos (\*), y  $p < 0,01$  estadísticamente muy significativos (\*\*). Los datos se expresan como la media  $\pm$  ESM.



## Resultados

*“Lo importante en la ciencia no es tanto obtener nuevos datos, sino descubrir nuevas formas de pensar sobre ellos”*

- William Lawrence Bragg

## Resultados

## 1. Obtención de cultivos de Células Endoteliales Corneales (CECs), a partir de tejidos descartados para su uso clínico, con un medio de cultivo libre de factores xenogénicos

### 1.1. Obtención y cultivo de Células Endoteliales Corneales (CECs) a partir de tejidos descartados para su uso clínico

#### 1.1.1. Tejidos empleados para el estudio

Los cultivos de Células Endoteliales Corneales (CECs) se obtuvieron utilizando un medio de cultivo convencional suplementado con Suero Bovino Fetal (SBF). Se calculó la edad media de los donantes de córnea y la densidad endotelial corneal media, medida tras la donación de la córnea mediante microscopía especular, para cada grupo experimental (Tabla 3). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos al comparar la edad de los donantes de córneas. Por otro lado, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la densidad endotelial entre los grupos de endotelios No DMEK y No Trasplante ( $p$ -valor = 0,0416); y entre el grupo Endotelio Nativo y los grupos No Trasplante ( $p$ -valor = 0,0004) y Anillo Endotelial ( $p$ -valor = 0,0011).

**Tabla 3.** Edad de los donantes de córnea y densidad endotelial corneal determinada mediante microscopía especular tras la donación de la córnea. Los datos se muestran como la media  $\pm$  ESM. La distribución normal de los valores se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos definidos se comprobaron mediante pruebas paramétricas en el caso de la densidad endotelial (ANOVA) y pruebas no paramétricas en el caso de la edad (Kruskal-Wallis). ESM: Error Estándar de la Media.  $\diamond$ : No DMEK vs. No Trasplante ( $p$ -valor = 0,0416).  $\square$ : Endotelio Nativo vs. No Trasplante ( $p$ -valor = 0,0004) y Anillo Endotelial ( $p$ -valor = 0,0011).

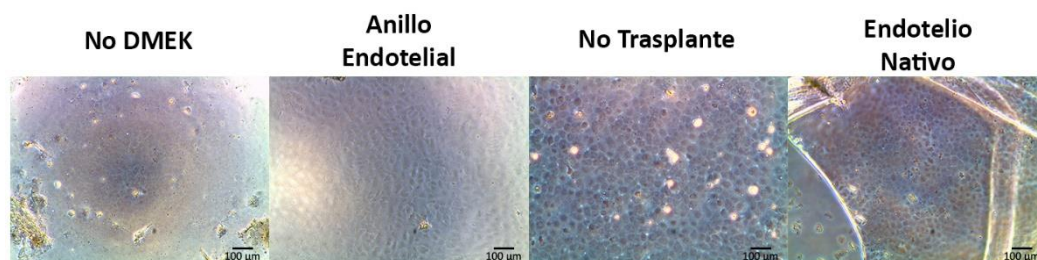
	No DMEK (n = 5)	Anillo Endotelial (n = 4)	No Trasplante (n = 5)	Endotelio Nativo (n = 3)
Edad (años)	66,6 $\pm$ 4	57,75 $\pm$ 12	60 $\pm$ 5	68 $\pm$ 1
Densidad endotelial corneal (células/mm <sup>2</sup> )	2.038 $\pm$ 54 $\diamond$	2.770 $\pm$ 178	2.880 $\pm$ 116	1.423 $\pm$ 241 $\square$



## Resultados

### 1.1.2. Aislamiento y cultivo de Células Endoteliales Corneales (CECs)

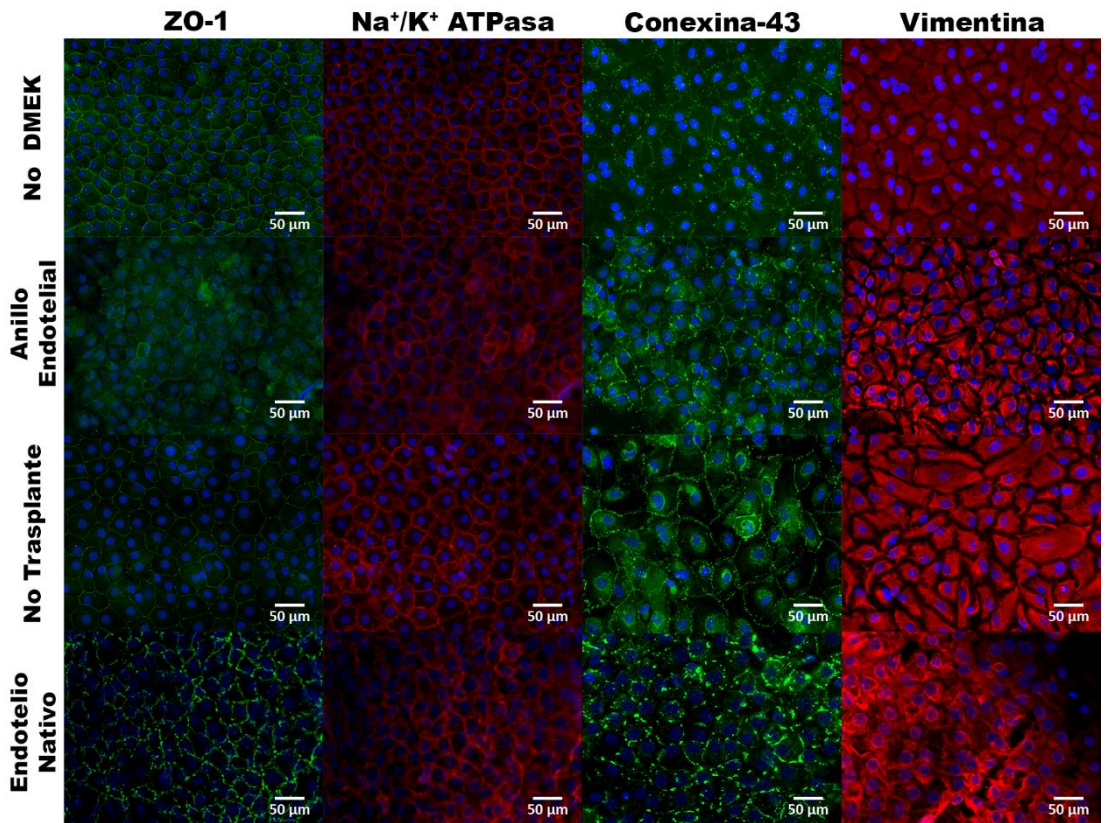
Se observó, en todos los cultivos realizados, que tras 2-7 días de acondicionamiento en el medio de cultivo convencional, las CECs mejoraban su morfología en la membrana de Descemet. Tras la digestión enzimática y después de dos días de cultivo, las CECs estaban adheridas a la placa de cultivo y comenzaban a proliferar. En el día 10-15, se pudo observar una monocapa confluyente con morfología poligonal, obteniéndose una monocapa más compacta y hexagonal de CECs a los 20-30 días en los cultivos realizados a partir de los tres tipos de tejidos procesados (Figura 6).



**Figura 6.** Microscopía de contraste de fases de los cultivos de CECs en P0 obtenidos a partir de córneas descartadas para su utilización en cirugías tipo DMEK (No DMEK), de anillos endoteliales sobrantes de cirugías tipo DMEK (Anillo Endotelial), de córneas no aptas para su utilización en trasplante (No Trasplante) y de las CECs sobre la membrana de Descemet (Endotelio Nativo). CECs: Células Endoteliales Corneales.

### 1.1.3. Inmunocitoquímica

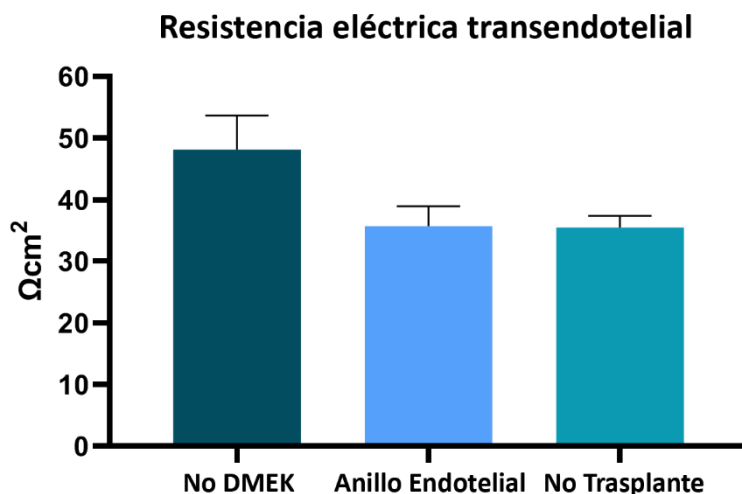
Todos los cultivos obtenidos mostraron tinción positiva para la ZO-1 y la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa, responsables de la función barrera y bomba metabólica, respectivamente. También para la conexina-43, una proteína de adhesión que forma parte de las uniones GAP y que juega un papel importante en la comunicación celular y, por último, para la vimentina, una de las proteínas fibrosas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular (Figura 7).



**Figura 7.** Microscopía de inmunofluorescencia de los cultivos de CECs en P0 obtenidos a partir de córneas descartadas para su utilización en cirugías tipo DMEK (No DMEK), de anillos endoteliales sobrantes de cirugías tipo DMEK (Anillo Endotelial), de córneas no aptas para su utilización en trasplante (No Trasplante) y de las CECs sobre la membrana de Descemet (Endotelio Nativo). Los núcleos se muestran teñidos con DAPI en azul. CECs: Células Endoteliales Corneales; ZO-1: zonula occludens-1; DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol.

#### 1.1.4. Estudio de la función barrera: Resistencia Eléctrica Transendotelial (TER, Transendothelial Electrical Resistance)

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los valores de la Resistencia Eléctrica Endotelial (TER, *Transendothelial Electrical Resistance*) entre los cultivos de CECs obtenidos a partir de córneas descartadas para su utilización en cirugías tipo DMEK:  $50 \pm 6 \Omega\text{cm}^2$ , de anillos endoteliales sobrantes de cirugías tipo DMEK:  $36 \pm 3 \Omega\text{cm}^2$  y de córneas no aptas para su utilización en trasplante:  $35 \pm 2 \Omega\text{cm}^2$  (Figura 8).



**Figura 8.** TER de los cultivos de CECs en P0 obtenidos a partir de córneas descartadas para su utilización en cirugías tipo DMEK (No DMEK), de anillos endoteliales sobrantes de cirugías tipo DMEK (Anillo Endotelial) y de córneas no aptas para su utilización en trasplante (No Trasplante). Los datos se muestran como la media  $\pm$  ESM ( $n = 3$  para cada grupo). La distribución normal de los valores se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos definidos se comprobaron mediante pruebas paramétricas (prueba ANOVA). TER: Resistencia Eléctrica Transendotelial; CECs: Células Endoteliales Corneales; ESM: Error Estándar de la Media.

## 1.2. Obtención de cultivos de Células Endoteliales Corneales (CECs), con un medio de cultivo libre de factores xenogénicos

### 1.2.1. Tejidos empleados para el estudio.

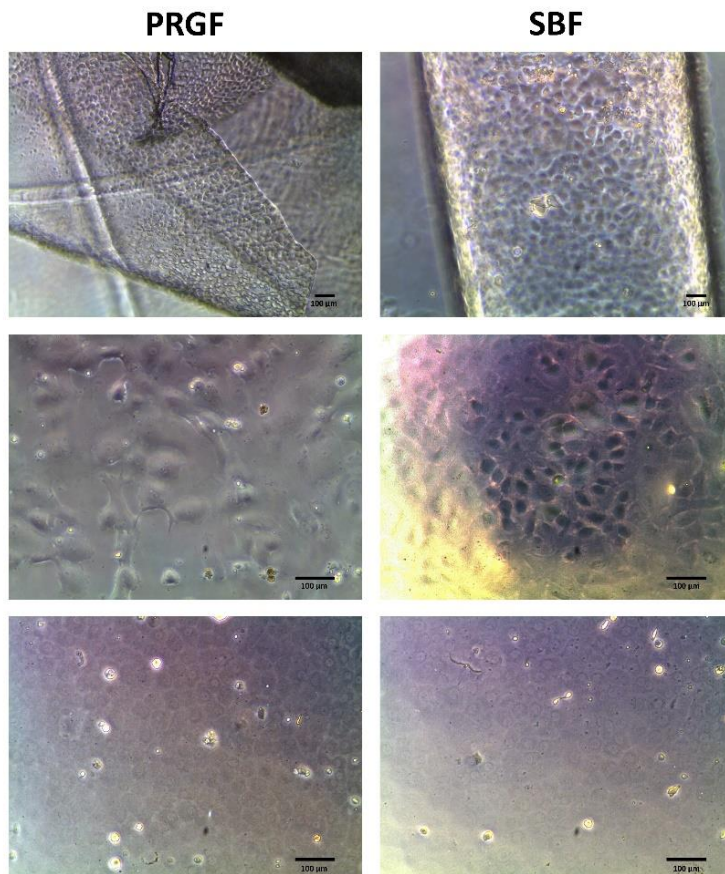
Los cultivos de CECs se obtuvieron utilizando un medio convencional suplementado con SBF y un medio de cultivo libre de factores xenogénicos, suplementado con PRGF. Se calculó la edad media de los donantes de córnea y la densidad endotelial corneal media, medida tras la donación de la córnea mediante microscopía especular, para cada grupo estudiado (Tabla 4). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos al comparar ambos parámetros.

**Tabla 4.** Edad de los donantes de córnea y densidad endotelial corneal determinada mediante microscopía especular tras la donación de la córnea. Los datos se muestran como la media  $\pm$  ESM. La distribución normal de los valores se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos definidos se comprobaron mediante pruebas paramétricas (prueba *t*-student). PRGF: Plasma Rico en Factores de Crecimiento; SBF: Suero Bovino Fetal. ESM: Error Estándar de la Media.

	PRGF (n = 31)	SBF (n = 31)
<b>Edad (Años)</b>	<b>63 <math>\pm</math> 1</b>	<b>61 <math>\pm</math> 2</b>
<b>Densidad endotelial corneal (células /mm<sup>2</sup>)</b>	<b>2.560 <math>\pm</math> 76</b>	<b>2.658 <math>\pm</math> 79</b>

#### 1.2.2. Aislamiento y cultivo de Células Endoteliales Corneales (CECs)

En todos los cultivos procesados, las CECs mejoraron su morfología en la membrana de Descemet, adquiriendo una forma hexagonal típica de endotelio corneal después de la etapa de acondicionamiento. Tras la digestión enzimática y una vez transcurridos dos días de cultivo, las CECs se encontraban adheridas al pocillo de la placa de cultivo y comenzaron a proliferar. El día 10-15, se formó una monocapa de CECs en todos los cultivos realizados, obteniéndose, después de 20-30 días de cultivo, cultivos de CECs compactos y hexagonales a partir de los tejidos procesados (Figura 9).

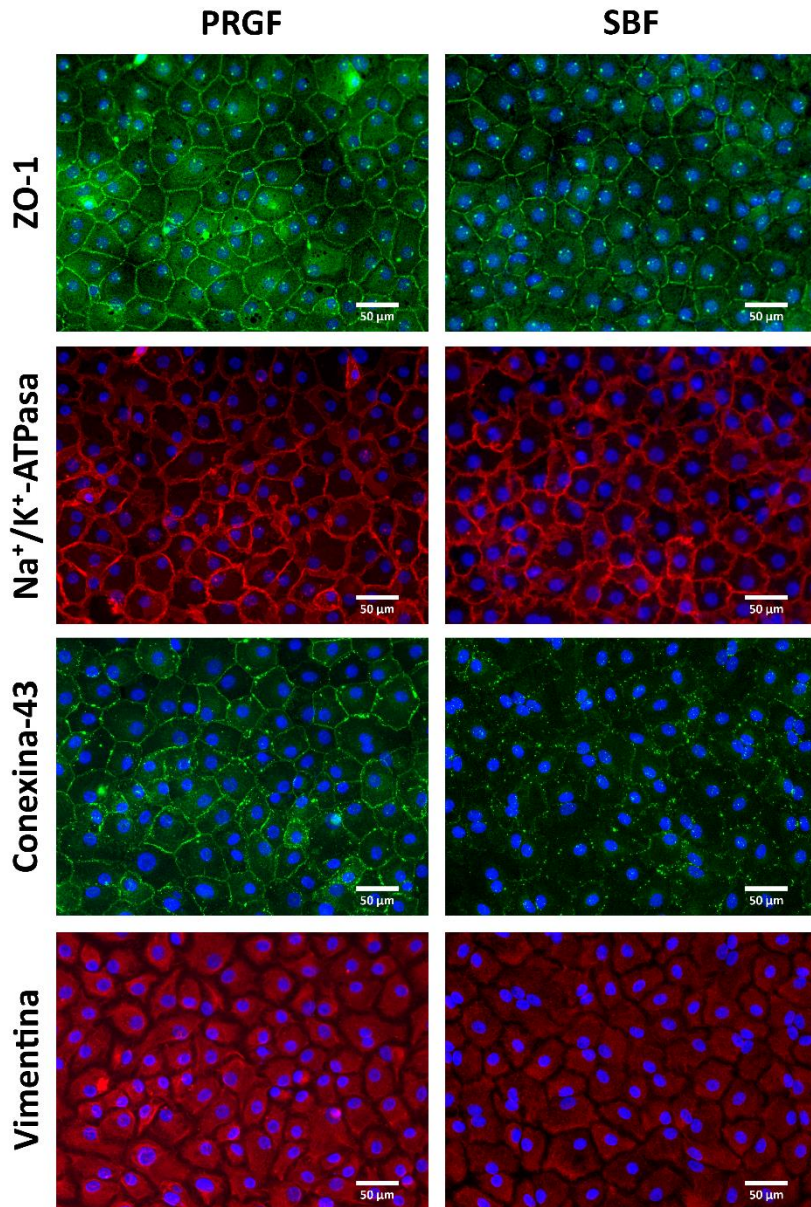


**Figura 9.** Microscopía de contraste de fases de los cultivos de CECs en P0 obtenidos con medio suplementado con PRGF (izquierda) o SBF (derecha). CECs en la membrana de Descemet tras la fase de acondicionamiento (primera línea), tras 7 días de cultivo (segunda línea), y mostrando su típica morfología hexagonal tras 20-30 días de cultivo (tercera línea). CECs: Células Endoteliales Corneales; PRGF: Plasma Rico en Factores de Crecimiento; SBF: Suero Bovino Fetal.

### 1.2.3. Inmunocitoquímica

El análisis mediante técnicas de inmunocitoquímica de los cultivos de CECs obtenidos tanto con un medio de cultivo convencional, como con un medio de cultivo libre de factores xenogénicos, reveló una tinción positiva para las proteínas ZO-1 y conexina-43, que participan en las uniones intercelulares estrechas; la proteína Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPasa, que desempeña un papel esencial en la función de las CECs actuando como bomba de iones; y la proteína estructural vimentina, que forma parte del citoesqueleto (Figura 10).



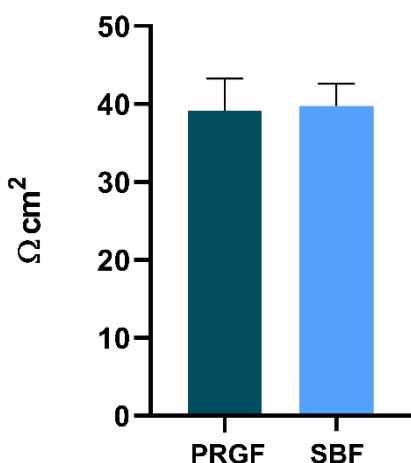


**Figura 10.** Microscopía de inmunofluorescencia de los cultivos de CECs en P0 obtenidos con medio suplementado con PRGF (izquierda) o SBF (derecha). Los núcleos se muestran teñidos con DAPI en azul. CECs: Células Endoteliales Corneales; PRGF: Plasma Rico en Factores de Crecimiento; SBF: Suero Bovino Fetal. ZO-1: zonula occludens-1; DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol.

1.2.4. *Estudio de la función barrera: resistencia eléctrica transendotelial (TER, Transendothelial Electrical Resistance)*

El análisis de la TER de los cultivos de CECs obtenidos tanto con un medio de cultivo convencional, como con un medio libre de factores xenogénicos, no mostró diferencias estadísticamente significativas, obteniéndose valores de  $39,78 \pm 3 \Omega\text{cm}^2$  para los cultivos realizados con medio de cultivo suplementado con SBF y de  $39,20 \pm 4 \Omega\text{cm}^2$  para los cultivos realizados con medio de cultivo suplementado con PRGF (Figura 11).

**Resistencia eléctrica transendotelial**



**Figura 11.** TER de los cultivos de CECs en P0 obtenidos con un medio de cultivo suplementado con PRGF o SBF. Los datos se muestran como la media ± ESM (n = 9 para cada grupo). La distribución normal de los valores se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos definidos se comprobaron mediante pruebas paramétricas (prueba t-student). TER: Resistencia Eléctrica Transendotelial; CECs: Células Endoteliales Corneales; PRGF: Plasma Rico en Factores de Crecimiento; SBF: Suero Bovino Fetal; ESM: Error Estándar de la Media.

1.2.5. *Densidad celular y análisis morfométrico*

La densidad celular y el análisis morfométrico (Tabla 5) se determinaron utilizando las imágenes de inmunofluorescencia para los marcadores ZO-1 y Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPasa y se analizaron con el programa ImageJ. Las CECs cultivadas en medios de cultivo suplementado con PRGF o SBF presentaron una densidad celular de  $615,8 \pm 49$  células/mm<sup>2</sup> y  $816,9 \pm 191$  células/mm<sup>2</sup>, respectivamente. Además, se observó una morfología celular compacta y homogénea con un área celular media de  $1.249 \pm 90 \mu\text{m}^2$  y  $1.386 \pm 305 \mu\text{m}^2$ ,

respectivamente; y una forma hexagonal, con un índice de circularidad de  $0,835 \pm 0,01$  y  $0,801 \pm 0,01$ , respectivamente (la circularidad de un hexágono perfecto tiene un valor de 0,907). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la densidad celular ni en el área celular. Sin embargo, el índice de circularidad reveló un valor significativamente mayor ( $p$ -valor: 0,0243) en los cultivos suplementados con PRGF en comparación con los suplementados con FBS.

**Tabla 5.** Densidad celular (células/mm<sup>2</sup>), área (μm<sup>2</sup>) e índice de circularidad de los cultivos de CECs en P0 obtenidos con un medio de cultivo suplementado con PRGF o SBF en P0. Los datos se muestran como la media ± ESM. La distribución normal de los valores se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos definidos se comprobaron mediante pruebas paramétricas (prueba t-student). CECs: Células Endoteliales Corneales; PRGF: Plasma Rico en Factores de Crecimiento; SBF: Suero Bovino Fetal; ESM: Error Estándar de la Media. ◊: PRGF vs. SBF ( $p$ -valor = 0,0243).

	Densidad celular (células/mm <sup>2</sup> )	Área (μm <sup>2</sup> )	Índice de circularidad <sup>◊</sup>
PRGF (n = 6)	615,8 ± 49	1.249 ± 90	0,835 ± 0,01
SBF (n = 6)	816,9 ± 191	1.386 ± 305	0,801 ± 0,01

#### 1.2.6. Aislamiento y secuenciación de ARN (RNAseq)

Se realizó una secuenciación de ARN para examinar la capacidad de las CECs cultivadas en un medio de cultivo suplementado con PRGF o SBF de mantener un perfil de expresión génica específico de CECs nativas. Para ello, se comparó la expresión génica de las CECs cultivadas con datos públicos del endotelio nativo de Tokuda et al<sup>276</sup>.

Se observó que 23.744 genes de 24.770 genes expresados (91,86%), permanecieron sin cambios en las CECs de los cultivos realizados. Por otro lado, 11.617 (46,90%) y 11.377 (45,93%) genes permanecieron sin cambios, en comparación con el endotelio nativo de Tokuda, en las CECs de los cultivos realizados utilizando un medio de cultivo libre de factores xenogénicos o un medio de cultivo suplementado con SBF, respectivamente (Tabla 6).

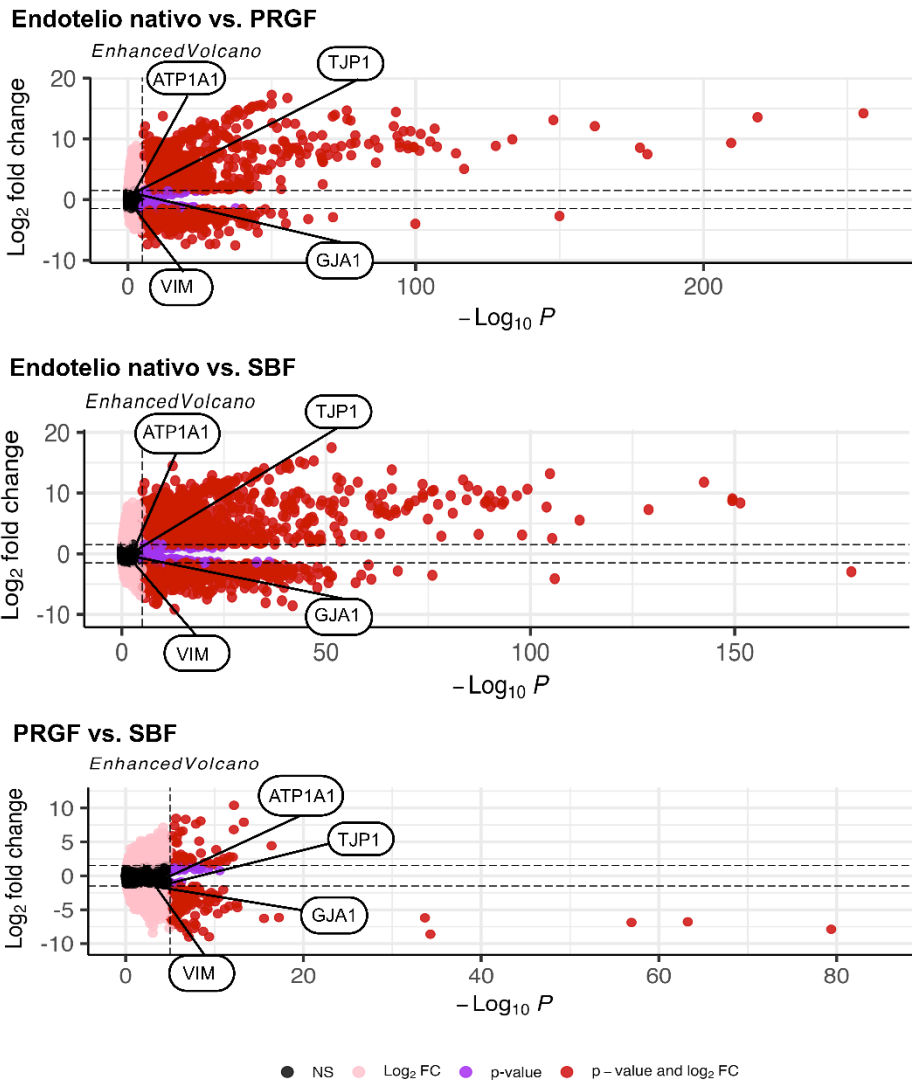


## Resultados

**Tabla 6.** Genes sin cambios y DEGs entre los 3 grupos de CECs: CECs cultivadas con PRGF, CECs cultivadas con SBF, y CECs en el endotelio nativo tomadas de datos públicos. *n* = 4 para cada grupo. DEG: genes expresados diferencialmente; CECs: Células Endoteliales Corneales; PRGF: Plasma Rico en Factores de Crecimiento; SBF: Suero Fetal Bovino.

	<b>PRGF vs. SBF</b>	<b>Endotelio Nativo vs. SBF</b>	<b>Endotelio Nativo vs. PRGF</b>
<b>Genes sin cambios</b>	<b>23.744</b>	<b>11.377</b>	<b>11.617</b>
<b>DEGs</b>	<b>1026</b>	<b>13.393</b>	<b>13.153</b>
<b>Sobreexpresados</b>	<b>497</b>	<b>9.177</b>	<b>9.242</b>
<b>Infraexpresados</b>	<b>529</b>	<b>4.216</b>	<b>3.911</b>

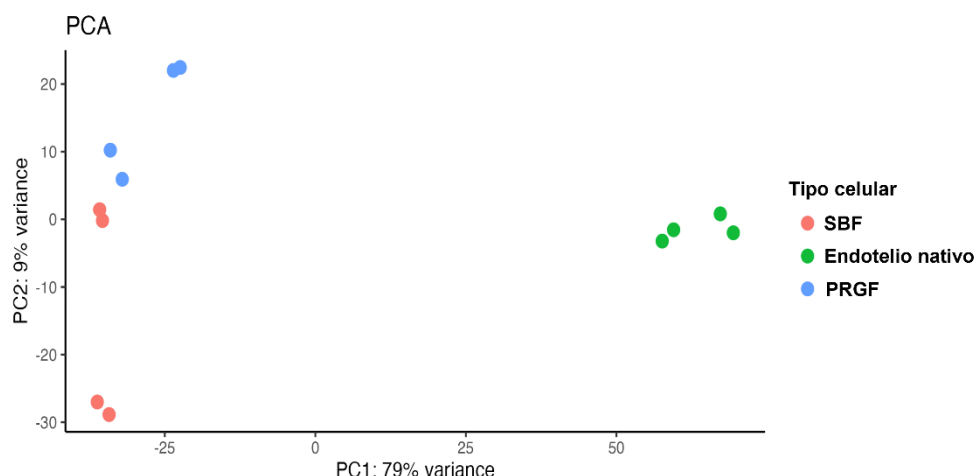
Además, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los cuatro genes utilizados como marcadores específicos de las CECs (*TJP1*: ZO-1, *ATP1A1*: Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPasa, *GJA1*: conexina-43 y *VIM*: vimentina). Estos resultados se representaron gráficamente con ayuda de un Diagrama de Volcán (Figura 12).



**Figura 12.** Diagrama de Volcán (Volcano Plot) que representa en rojo los DEG entre los tres grupos de CECs: CECs cultivadas con PRGF, CECs cultivadas con SBF, y CECs en el endotelio nativo tomadas de datos públicos. El eje Y representa el cambio de foldchange en base de log<sub>2</sub> de la expresión génica, y en el eje X el p-valor. Las líneas horizontales corresponden a log<sub>2</sub> foldchange < - 1,5 y > 1,5; la línea vertical corresponde a -log<sub>10</sub> (0,05), donde 0,05 es el umbral para el p-valor. Los cuadros de texto representan la posición de los cuatro genes funcionales (TJP1: ZO-1, ATP1A1: Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa, GJA1: conexina-43 y VIM: vimentina). n = 4 para cada grupo. DEGs: Genes expresados diferencialmente; CECs: Células Endoteliales Corneales; PRGF: Plasma Rico en factores de Crecimiento; SBF: Suero Bovino Fetal; ZO-1: zonula occludens-1.

## Resultados

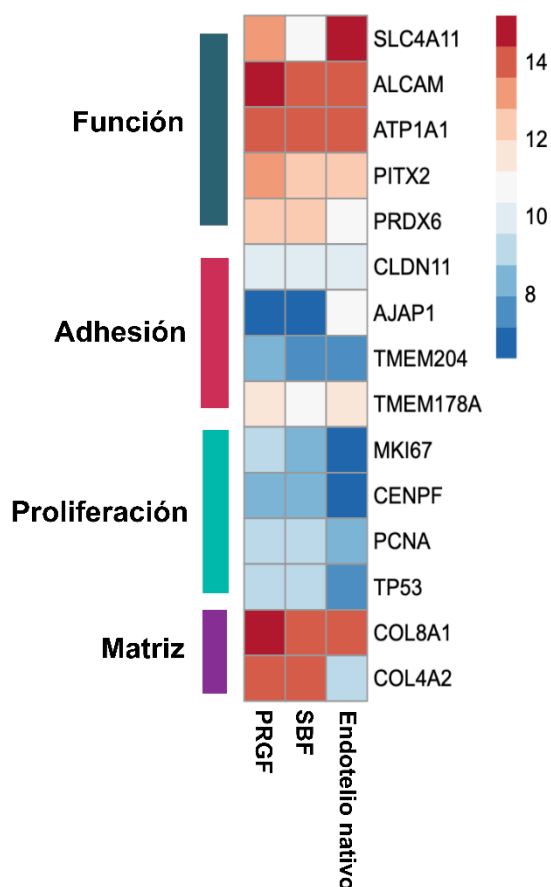
Además, se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA, *Principal Component Analysis*) en los datos de RNA-seq (Figura 13). Los datos de expresión génica obtenidos mediante tecnología de RNA-seq mostraron las muestras posicionadas en dos grupos distintos. El primer grupo estaba formado por CECs en el endotelio nativo y el segundo estaba formado por CECs cultivadas en medio de cultivo suplementado con PRGF o SBF, constituyendo esta variación el primer componente principal (PC1: 79%). El segundo componente principal representa la variación entre las CECs cultivadas en medio suplementado con PRGF o SBF (PC2: 9%).



En cuanto a los genes asociados con la capacidad de adhesión celular, Se observaron diferencias leves en la expresión relativa del gen *AJAP1*, siendo la expresión de este gen en las CECs cultivadas con SBF más baja que en las CECs del endotelio nativo.

En lo que respecta a los genes relacionados con la proliferación celular, en general, todos mostraron una expresión relativa menor en las CECs del endotelio nativo con respecto a las CECs de los cultivos realizados con SBF o PRGF.

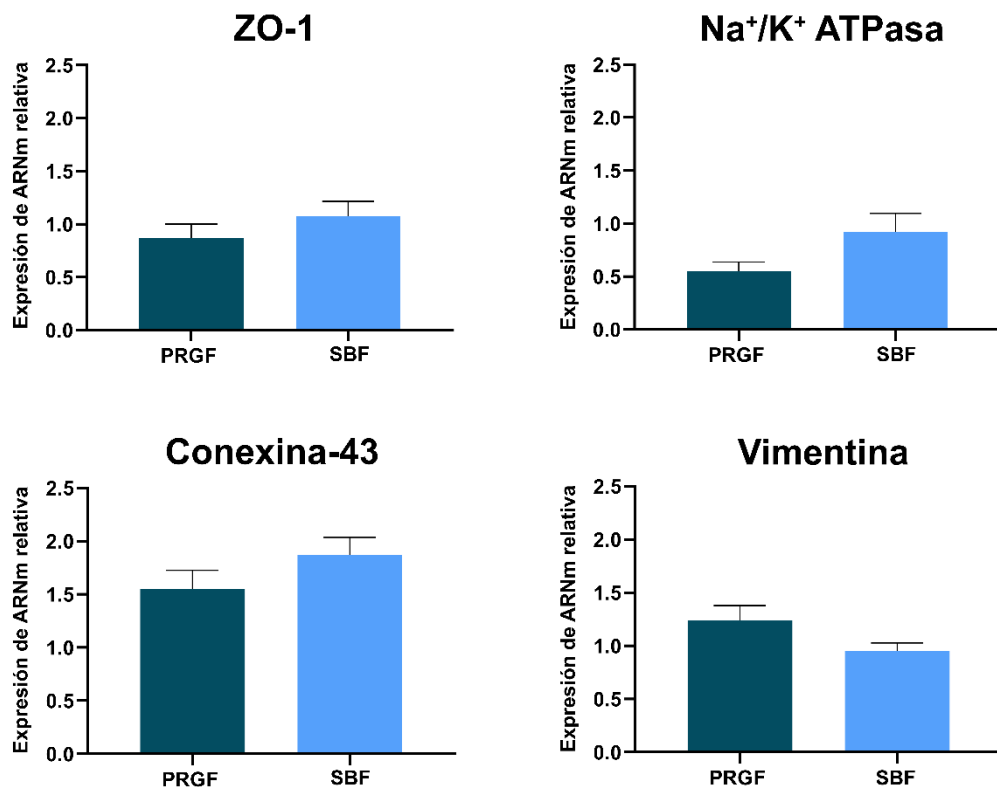
Finalmente, en los genes de matriz extracelular estudiados, se observó una expresión relativa ligeramente más alta en el gen *COL8A1* en las CECs de los cultivos realizado con PRGF en comparación con los otros dos grupos experimentales. Por último, las CECs del endotelio nativo exhibieron una expresión relativa inferior en el gen *COL4A2* que las CECs de los cultivos realizados con SBF o PRGF.



**Figura 14.** Heatmap representando los 15 genes seleccionados como de interés en los 3 grupos de CECs: CECs cultivadas con PRGF, CECs cultivadas con SBF, y CECs en el endotelio nativo tomadas de datos públicos. CECs: Células Endoteliales Corneales; PRGF: Plasma Rico en Factores de Crecimiento; SBF: Suero Bovino Fetal.

### 1.2.7. Aislamiento de ARN y PCR cuantitativa (qPCR)

La qPCR para los genes que codifican las proteínas de unión estrecha ZO-1 y conexina-43, la proteína funcional Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa y la proteína estructural vimentina no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los cultivos de CECs obtenidas utilizando medio de cultivo suplementado con PRGF o SBF (Figura 15).



**Figura 15.** Resultados de qPCR de los cultivos de CECs en P0 obtenidos con un medio de cultivo suplementado con PRGF o SBF. Los datos se muestran como la media  $\pm$  ESM ( $n = 7$  para cada grupo). La distribución normal de los valores se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos definidos se comprobaron mediante pruebas paramétricas (prueba t-student). qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; CECs: Células Endoteliales Corneales; PRGF: Plasma Rico en Factores de crecimiento; SBF: Suero Bovino Fetal; ESM: Error Estándar de la Media.

## 2. Estudio de la funcionalidad de los cultivos de Células Endoteliales Corneales (CECs)

### 2.1. Estudio de la funcionalidad *in vitro* de los cultivos de Células Endoteliales Corneales (CECs)

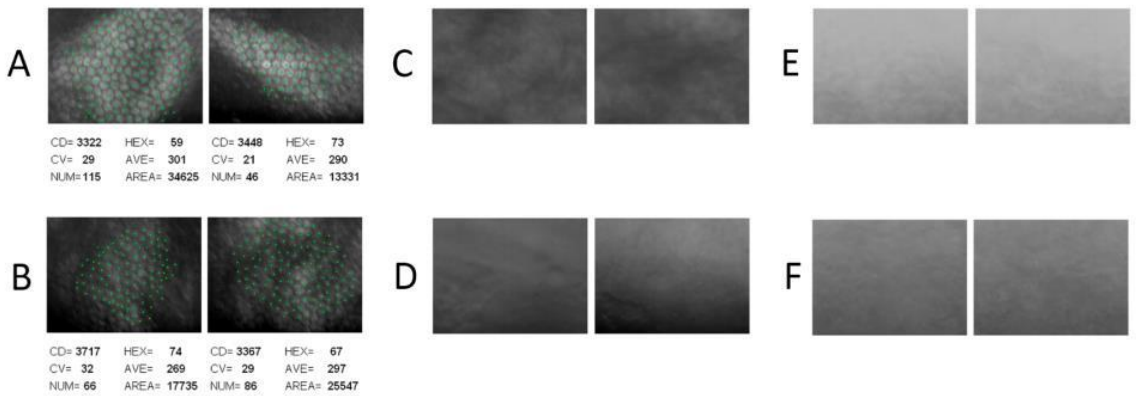
Se obtuvo un valor medio de la actividad ATPasa total de  $7,2673 \times 10^{-5} \pm 3,3000 \times 10^{-5}$  (U/10<sup>4</sup> células) en los cultivos de CECs obtenidas con un medio de cultivo libre de factores xenogénicos. Además, el valor medio de la actividad bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa fue de  $1,83973 \times 10^{-6} \pm 1 \times 10^{-6}$  (U/10<sup>4</sup> células).

### 2.2. Estudio de la funcionalidad de los cultivos de Células Endoteliales Corneales (CECs) en un modelo organotípico *ex vivo* de disfunción endotelial

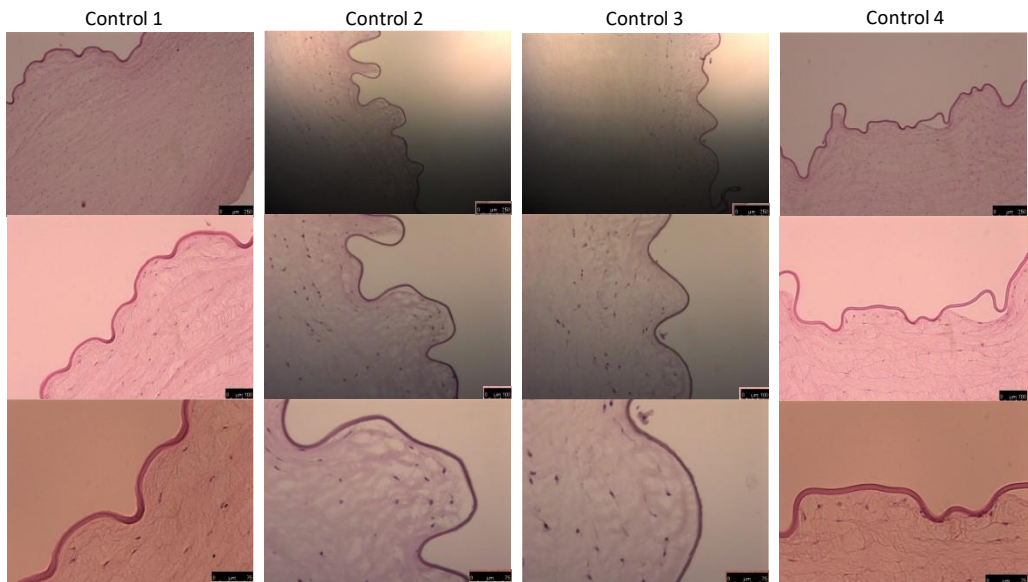
#### 2.2.1. *Creación de los modelos organotípicos ex vivo de disfunción endotelial*

Los resultados obtenidos mediante técnicas de microscopía especular mostraron que el raspado de las CECs de conejo con una hemosteta genera un modelo de disfunción endotelial *ex vivo* eficaz, ya que elimina las CECs en el momento del raspado. Del mismo modo, no se encontraron CECs de conejo en las córneas a las que se había realizado una descemetorrexia, constituyendo también este modelo organotípico, un modelo eficaz de disfunción endotelial (Figura 16).

Los resultados obtenidos mediante técnicas histológicas corroboraron que el procedimiento de raspado es efectivo, al lograr la eliminación de las CECs de conejo, preservando la integridad de la membrana de Descemet (Figura 17). De igual manera, la histología de las córneas control del modelo organotípico *ex vivo* de descemetorrexia, no presentaron, tras el periodo de órgano-cultivo, CECs en la cara interna de las córneas de conejo o humanas (Figura 18 y Figura 19).



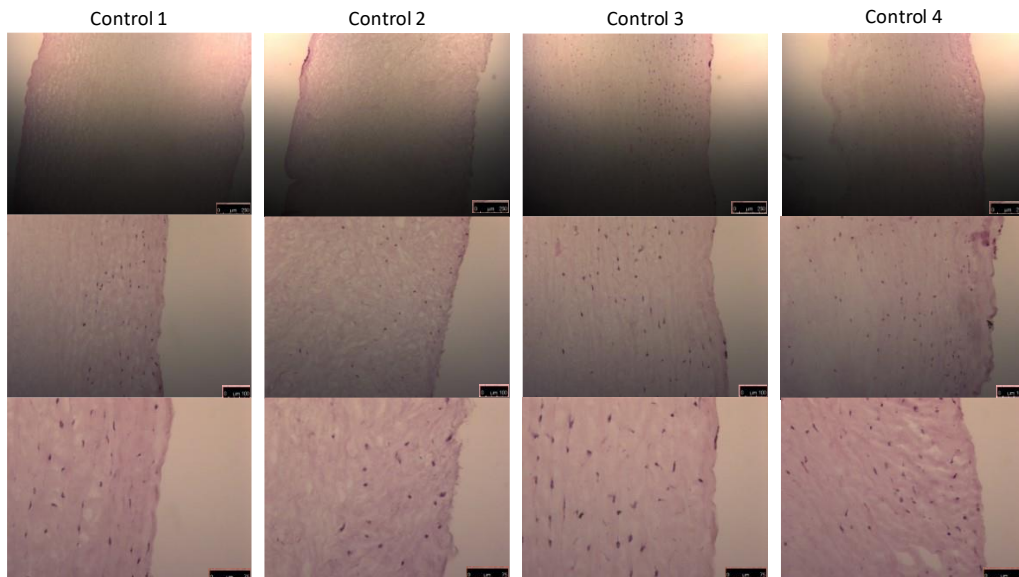
**Figura 16.** Microscopia especular de las córneas de conejo antes (A), a las dos horas (C) y a los 7 días del raspado (E); o antes (B), a las dos horas (D) y a los 7 días de la descemetorrexia (F).



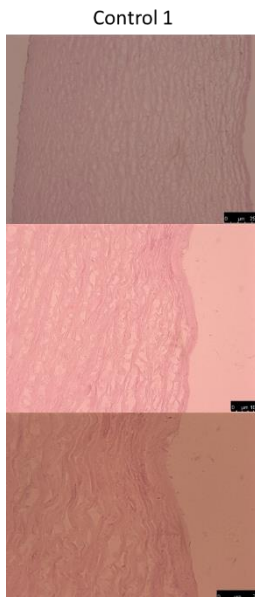
**Figura 17.** Hematoxilina-Eosina de los 4 modelos organotípicos de conejo a los que se realizó un raspado, confirmando la ausencia de CECs, pero manteniendo íntegra la membrana de Descemet. CECs: Células Endoteliales Corneales.



## Resultados



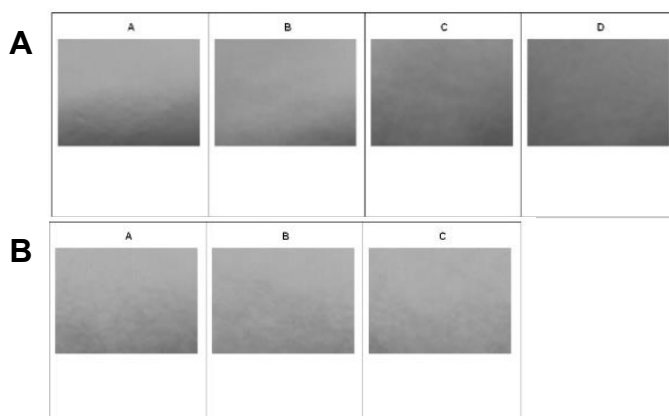
**Figura 18.** Hematoxilina-Eosina de los 4 modelos organotípicos de conejo a los que se realizó una descemetorrexia, confirmando la ausencia de endotelio corneal.



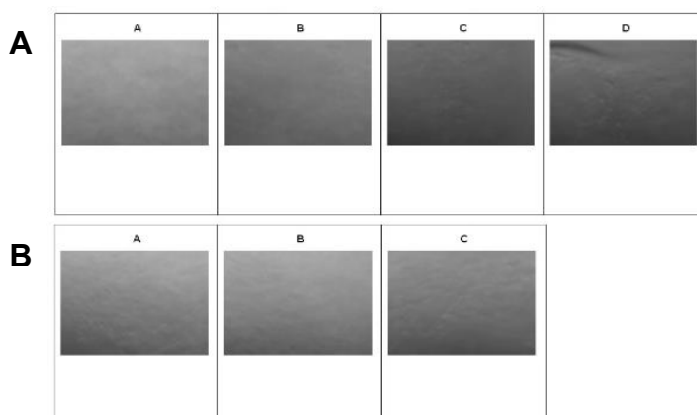
**Figura 19.** Hematoxilina-Eosina de un modelo organotípico humano al que se realizó una descemetorrexia, confirmando la ausencia de endotelio corneal.

### 2.2.2. Tratamiento de los modelos organotípicos ex vivo de disfunción endotelial con cultivos de Células Endoteliales Corneales (CECs)

Tras la siembra de las diferentes suspensiones de CECs en los modelos de lesión generados y el periodo de órgano-cultivo, la microscopía especular no resultó una técnica concluyente para poder valorar el éxito de la terapia desarrollada, debido posiblemente a la formación de un edema corneal durante el periodo de órgano-cultivo, que dificultó la correcta visualización de las CECs de conejo y humanas sembradas sobre los modelos (Figura 20 y Figura 21).



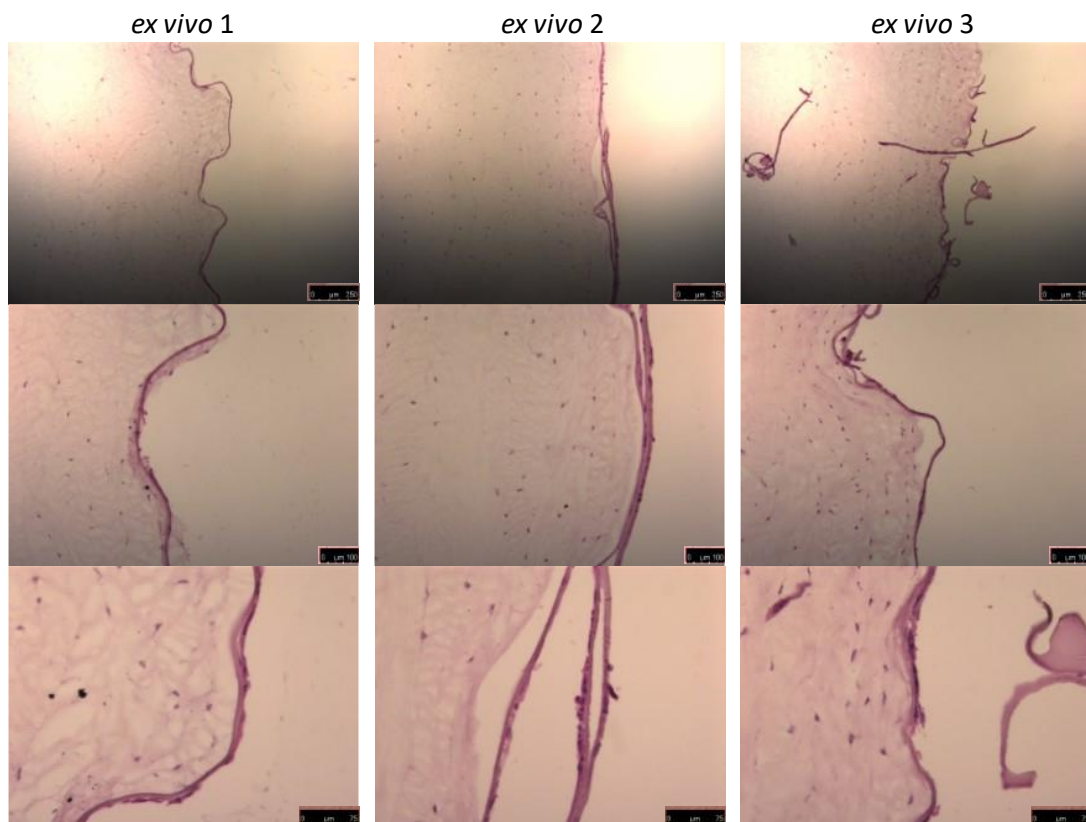
**Figura 20.** Microscopía especular de los modelos organotípicos ex vivo de conejo raspados (A) o con una descemetorrexia (B) y tratados con CECs de conejo. CECs: Células Endoteliales Corneales.



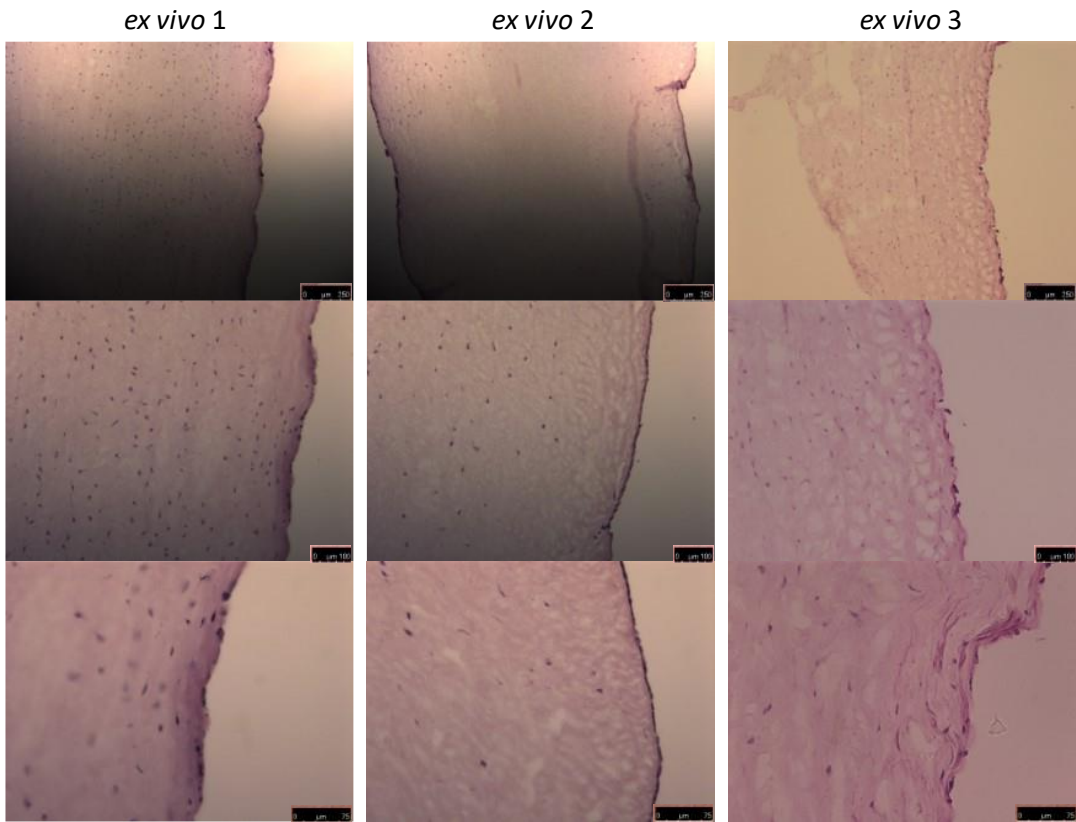
**Figura 21.** Microscopía especular de los modelos organotípicos ex vivo de conejo raspados (A) o con una descemetorrexia (B) y tratados con CECs humanas. CECs: Células Endoteliales Corneales.

## Resultados

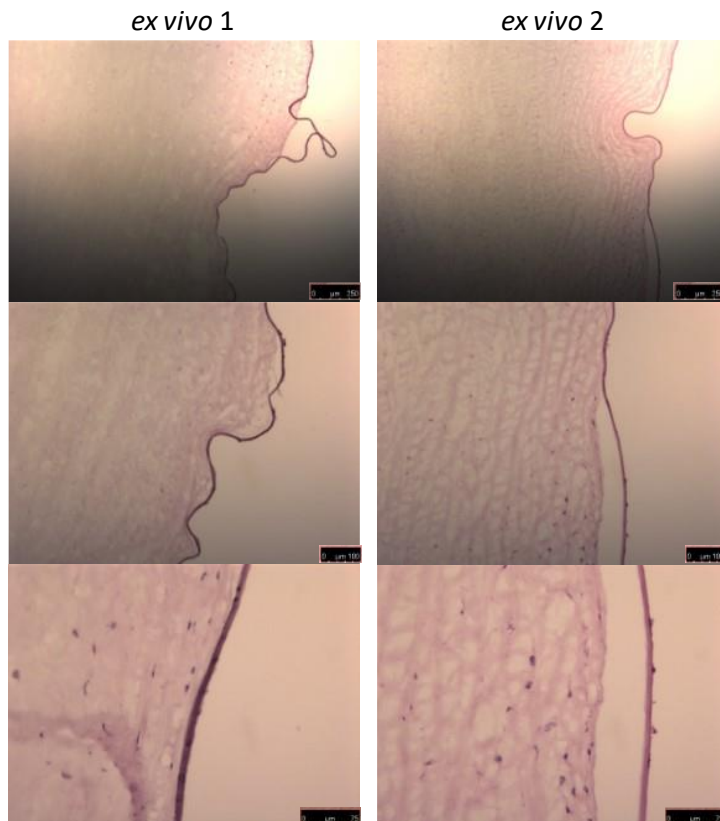
Sin embargo, las técnicas histológicas sí que resultaron concluyentes. Se pudo observar que en los modelos organotípicos *ex vivo* de conejo, generados con un raspado o con una descemeterrexia, los cultivos de CECs de conejo fueron capaces de adherirse y proliferar (Figura 22 y Figura 23, respectivamente). En el caso de las CECs humanas, estas no fueron capaces de adherirse en la cara interna de los modelos corneales (Figura 24 y Figura 25, respectivamente).



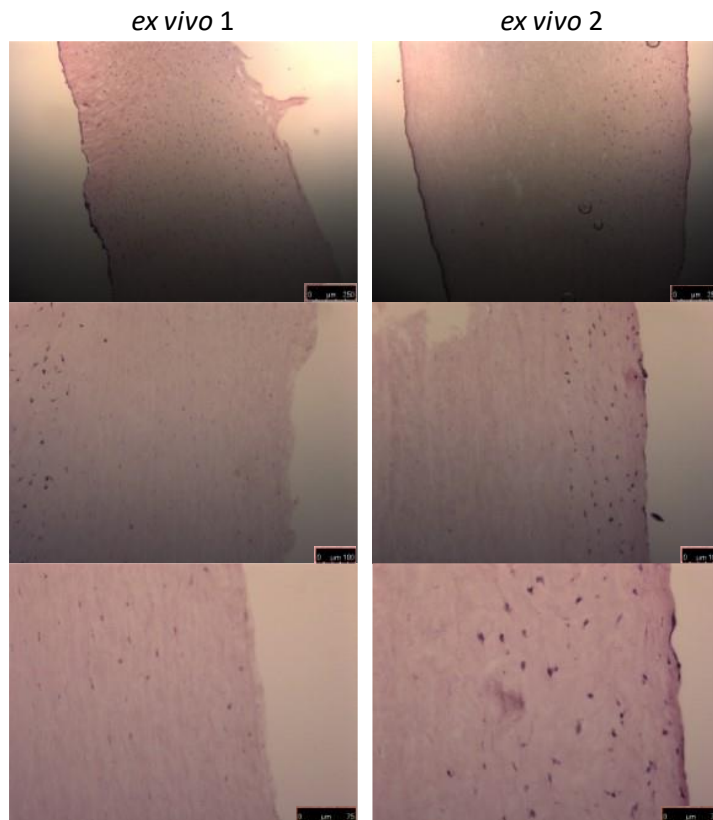
**Figura 22.** Hematoxilina-Eosina de los 3 modelos organotípicos *ex vivo* de conejo a los que se realizó un raspado y que se trataron con cultivos de CECs de conejo CECs: Células Endoteliales Corneales.



**Figura 23.** Hematoxilina-Eosina de los 3 modelos organotípicos ex vivo de conejo a los que se realizó una descemetorraxis y que se trataron con cultivos de CECs de conejo. CECs: Células Endoteliales Corneales.



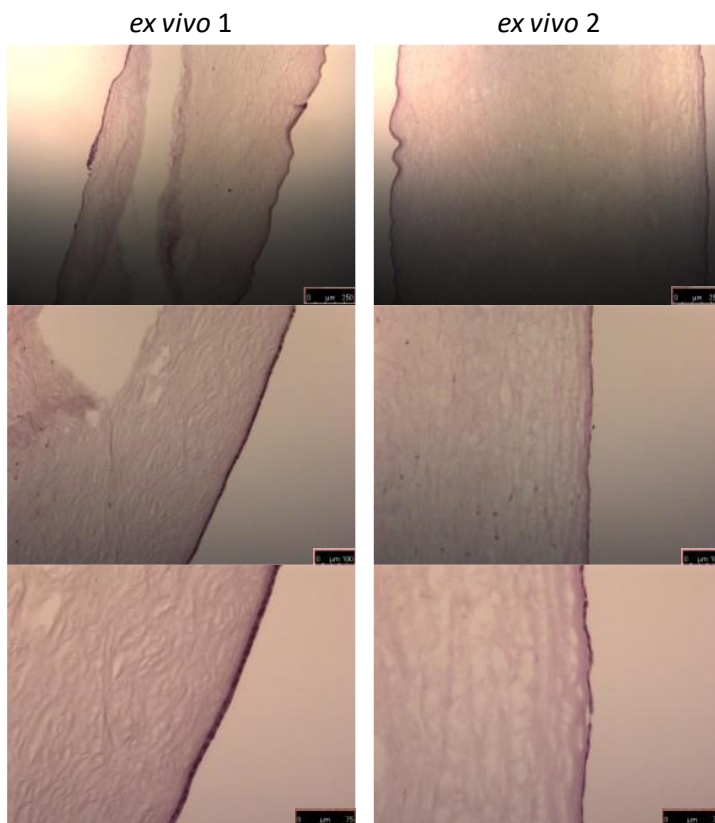
**Figura 24.** Hematoxilina-Eosina de los 2 modelos organotípicos ex vivo de conejo a los que se realizó un raspado y que se trataron con cultivos de CECs humanas. CECs: Células Endoteliales Corneales.



**Figura 25.** Hematoxilina-Eosina de los 2 modelos organotípicos *ex vivo* de conejo a los que se realizó una descemetorrexia y que se trataron con cultivos de CECs humanas. CECs: Células Endoteliales Corneales.

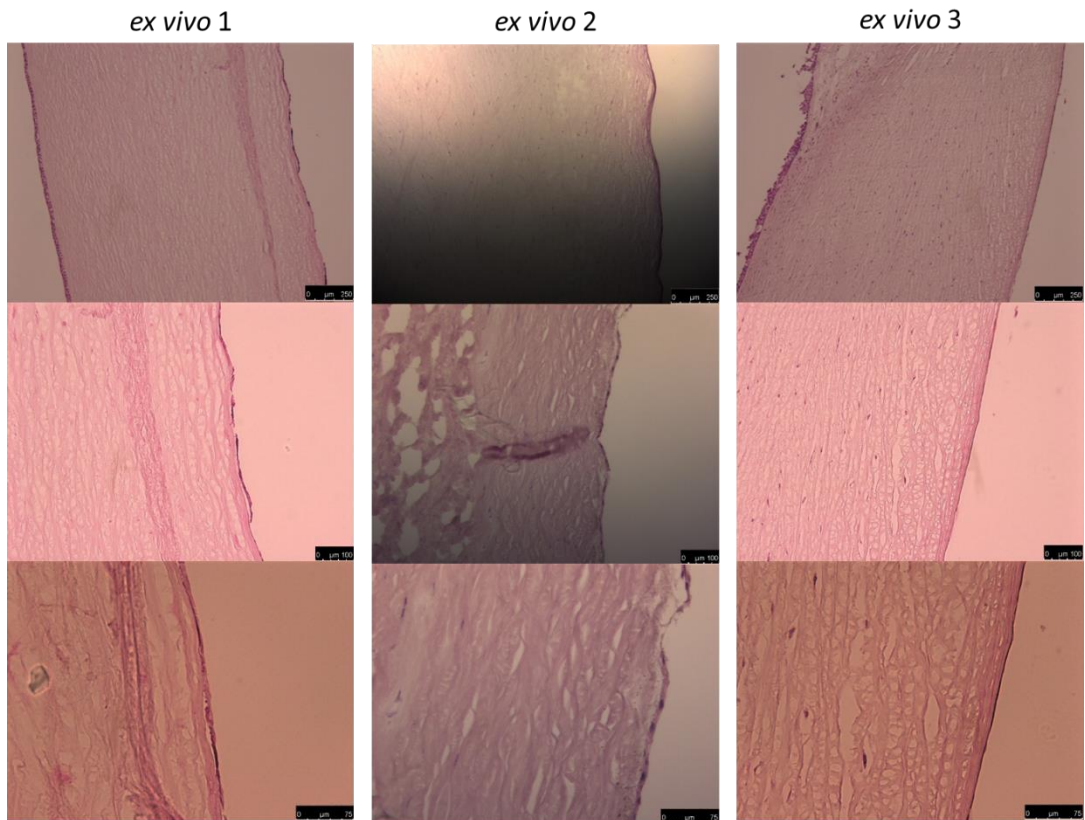
En el caso de los modelos organotípicos *ex vivo* humanos a los que se realizó una descemetorrexia, se pudo observar que tanto los cultivos de CECs de conejo (Figura 26) como los cultivos de CECs humanas (Figura 27) fueron capaces de adherirse y proliferar sobre el estroma corneal. Si bien, se encontró un mayor número de CECs de conejo que de CECs humanas lo que indica una mayor capacidad de las CECs de conejo para adherirse y proliferar.

Resultados



**Figura 26.** Hematoxilina-Eosina de los 2 modelos organotípicos ex vivo humanos a los que se realizó una descemetorrexia y que se trataron con cultivos de CECs de conejo. CECs: Células Endoteliales Corneales.



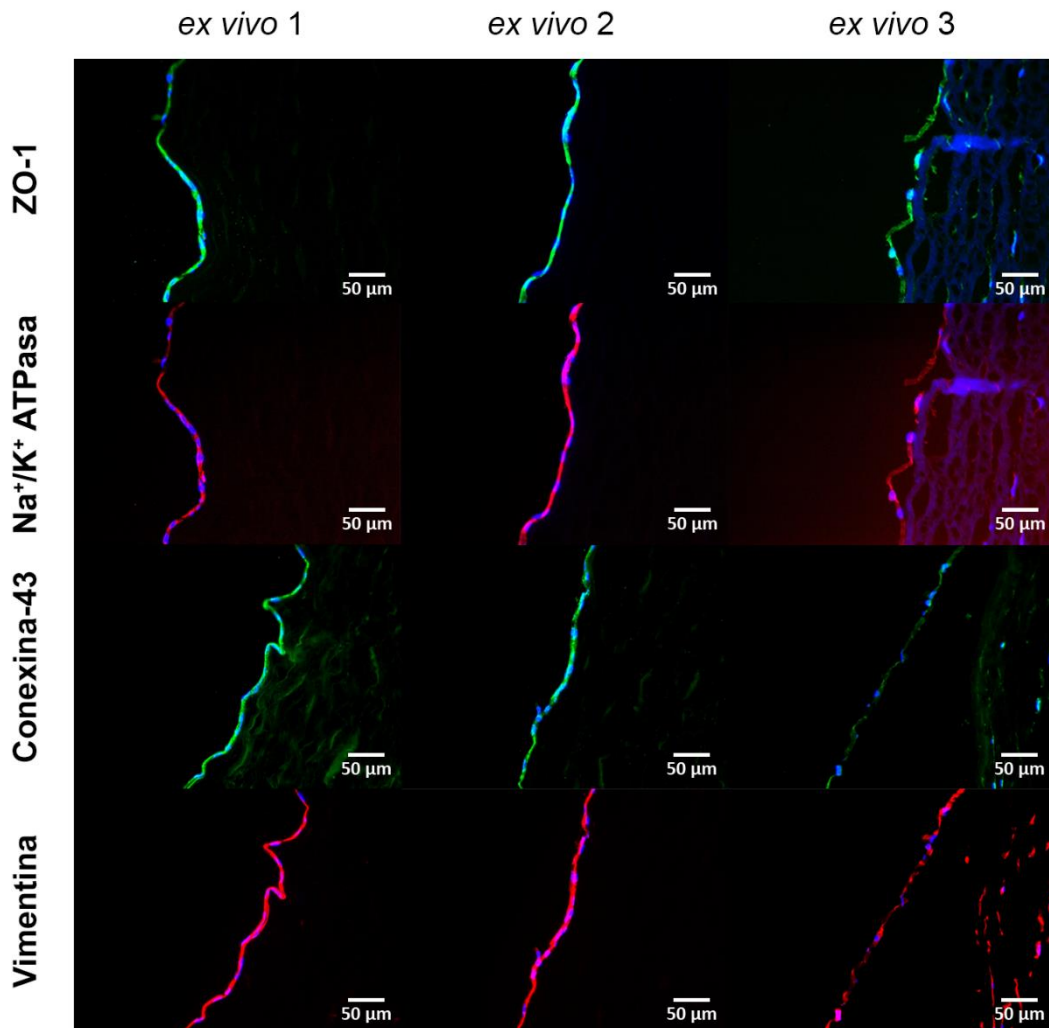


**Figura 27.** Hematoxilina-Eosina de los 3 modelos organotípicos ex vivo humanos a los que se realizó una descemtorrexis y que se trataron con cultivos de CECs humanas. CECs: Células Endoteliales Corneales.

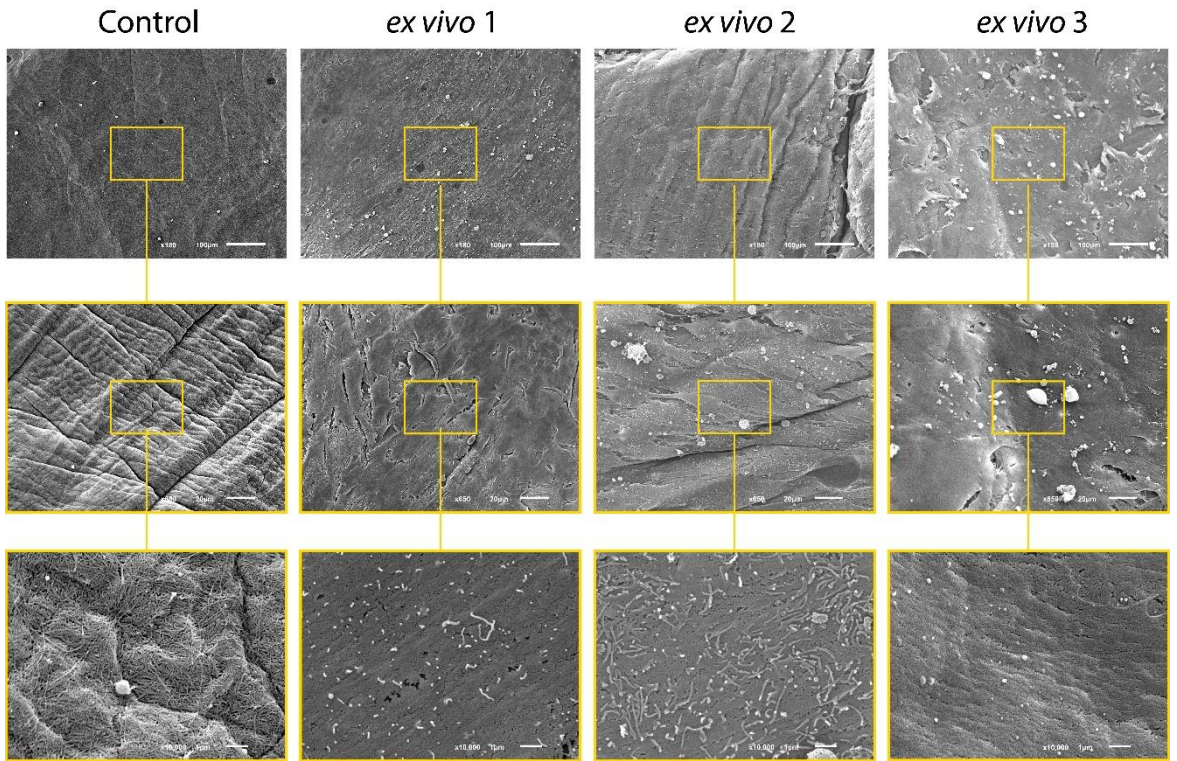
En los modelos organotípicos humanos tratados con CECs humanas, las técnicas de inmunofluorescencia mostraron una monocapa de CECs con tinción positiva para los 4 marcadores de funcionalidad estudiados (Figura 28).

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido revelaron que el modelo organotípico humano al que se realizó una descemtorrexis (Figura 29) presentaba una superficie notablemente más rugosa en comparación con los tres modelos organotípicos tratados con CECs humanas cultivadas, pudiéndose apreciar incluso las fibras de colágeno presentes en el estroma corneal, en las imágenes de más alta magnificación (10.000X).





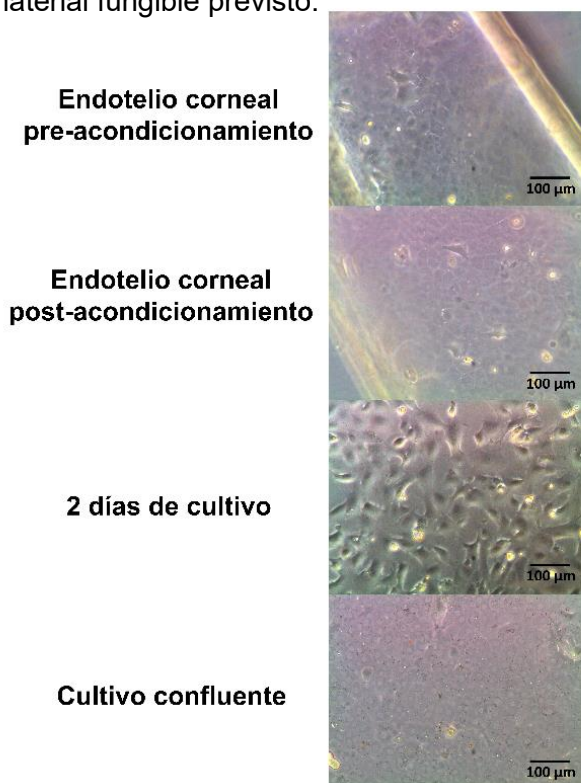
**Figura 28.** Inmunofluorescencia de los 3 modelos organotípicos ex vivo humanos a los que se realizó una descemetorrexia y que se trataron con cultivos de CECs humanas. Los núcleos se muestran teñidos con DAPI en azul CECs: Células Endoteliales Corneales; ZO-1: zónula occludens-1; DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol.



**Figura 29.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido de los modelos organotípicos ex vivo humanos, a los que se realizó una descemetorrexia, que no se trataron (control) y que se trataron con cultivos de CECs humanas. CECs: Células Endoteliales Corneales.

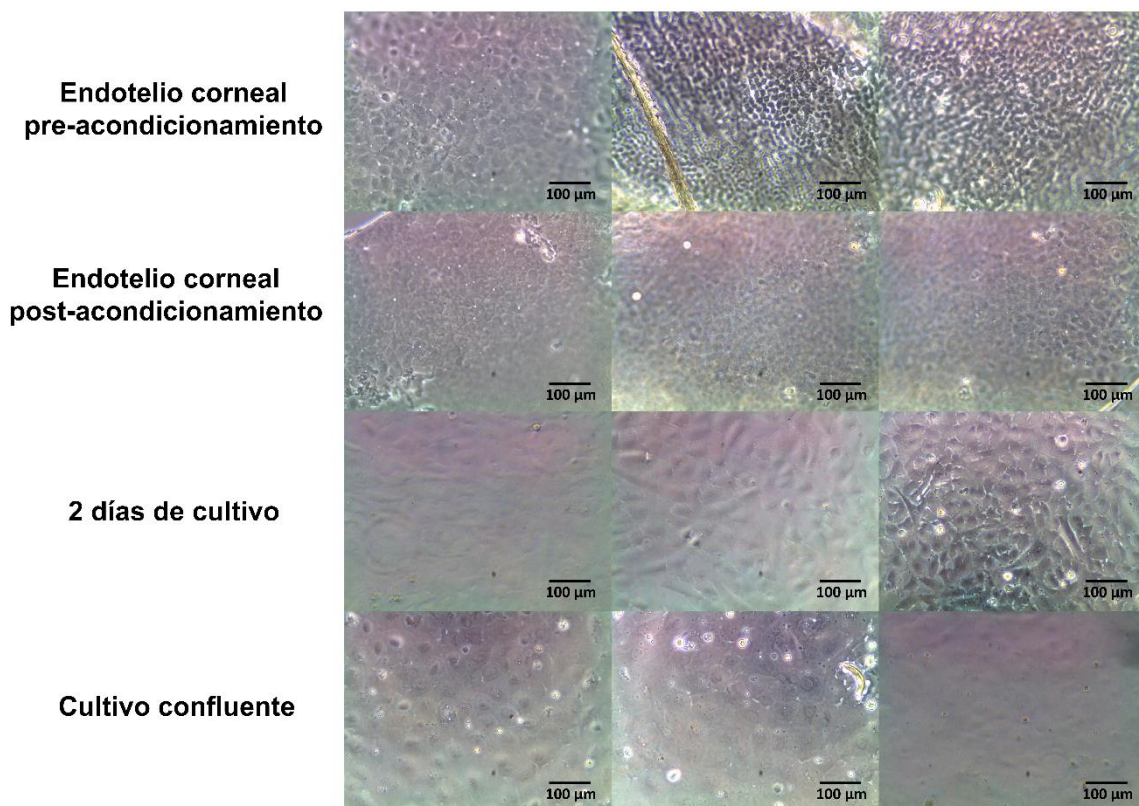
### 3. Traslación de la terapia celular desarrollada a las Normas de Correcta Fabricación (NCF)

Se realizó la producción de un primer lote del medicamento desarrollado (Figura 30) en el sistema cerrado de presión positiva ubicado en el Instituto Oftalmológico Fernández-Vega (IOFV), siguiendo la Guía de Fabricación redactada. En este primer lote se puso de manifiesto que era viable la realización del procedimiento, siendo necesario únicamente ajustar la cantidad del material fungible previsto.



**Figura 30.** Microscopía de contraste de fases del primer lote de producción del medicamento realizado en el interior del sistema cerrado de presión positiva. En la primera línea, CECs en el endotelio nativo antes del acondicionamiento; en la segunda línea, CECs en el endotelio corneal después del periodo de acondicionamiento. En la tercera línea, CECs después de 48 horas desde su siembra y, por último, en la cuarta línea, CECs cuando alcanzaron la confluencia. CECs: Células Endoteliales Corneales.

A continuación, se realizaron 3 lotes del medicamento desarrollado (Figura 31) en las mismas condiciones especificadas en el PNT de Producción de CECs y en la Guía de Fabricación.



**Figura 31.** Microscopía de contraste de fases de los tres lotes de producción del medicamento realizado en el interior del sistema cerrado de presión positiva. En la primera línea, CECs adheridas a la membrana de Descemet antes de la etapa de acondicionamiento; en la segunda línea, CECs en el endotelio corneal después del periodo de acondicionamiento. En la tercera línea, CECs después de 48 horas desde su siembra y, por último, en la cuarta línea, CECs confluentes. CECs: Células Endoteliales Corneales.

En los tres lotes realizados, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos a nivel experimental, pudiéndose observar que las CECs mostraban una morfología hexagonal en el endotelio corneal tras la fase de acondicionamiento. Tras la digestión enzimática, las CECs se podían observar adheridas al plástico de cultivo con una apariencia indiferenciada (células pequeñas y redondeadas). A los 10 días, se había formado una monocapa de CECs que paulatinamente fueron adquiriendo una morfología hexagonal. Tras 20-30 días de cultivo se obtuvieron cultivos de CECs compactas y hexagonales.



## Resultados

Por otro lado, en los 3 lotes fabricados para poner a punto el sistema de producción en la instalación, el recuento de partículas viables y no viables, así como el resto de los parámetros monitorizados, se mantuvieron dentro de los límites permitidos. En los 3 lotes producidos, se realizaron fotos a los cultivos primarios que constataron la morfología óptima de los cultivos realizados. Los resultados obtenidos en los parámetros monitorizados se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Resultados de las producciones realizadas en el sistema cerrado de presión positiva.

LOTE	PARÁMETROS DE CONTROL DE PROCESO			PARÁMETROS DE CONTROL DE PRODUCTO	
	Parámetros físicos	Partículas viables	Partículas no viables	Calidad	Esterilidad*
1	Apto	Negativo	0	Apto	Sin crecimiento
2	Apto	Negativo	0	Apto	Sin crecimiento
3	Apto	Negativo	0	Apto	Sin crecimiento

\* No se realizó el análisis de micoplasma y endotoxinas.



## Discusión

*“Saber que sabemos lo que sabemos, y saber que no sabemos lo que no sabemos, eso es el verdadero conocimiento”*

- Nicolaus Copernicus



La visión es considerada el sentido más importante por la mayor parte de la población, proporcionando alrededor del 80% de la información que recibimos del entorno<sup>277</sup>. La buena salud visual no solo afecta la autonomía y la calidad de vida de las personas, sino que también tiene un impacto significativo en los sistemas de salud pública y economía global, donde los trastornos visuales no tratados representan una carga económica considerable debido a la pérdida de productividad y los costos asociados a la atención médica<sup>38</sup>. Las enfermedades oculares, desde las refractivas hasta las degenerativas, disminuyen la calidad de vida individual, contribuyendo también, a las tasas de depresión, aislamiento social y discapacidad<sup>39</sup>.

La investigación en oftalmología y ciencias visuales ha avanzado significativamente en las últimas décadas, ofreciendo nuevas estrategias de diagnóstico, tratamiento y rehabilitación para diversas patologías oculares<sup>278,279</sup>, ayudando, por tanto, a mejorar la salud visual y bienestar general. Sin embargo, a pesar de estos avances, persisten desafíos, un ejemplo de ello es el tratamiento de las enfermedades corneales que requiere de innovación continua y aplicaciones terapéuticas avanzadas para superar las limitaciones actuales<sup>115</sup>.

La disfunción endotelial corneal impacta significativamente en la salud ocular global. El 70% de las enfermedades corneales son debidas a enfermedades que afectan al endotelio corneal, como la queratopatía bullosa post-quirúrgica o las distrofias corneales<sup>280</sup>, siendo la distrofia endotelial de Fuchs (ORPHA98974) la más común de todas ellas. De manera que las insuficiencias endoteliales corneales constituyen la principal indicación para el trasplante corneal en todo el mundo, siendo el 62% y el 56% de todos los trasplantes realizados en los EE. UU. y en España en 2022, respectivamente<sup>113,114</sup>.

Las insuficiencias endoteliales corneales tienen su origen en una disminución en el número o en la función de las Células Endoteliales Corneales (CECs), las cuales forman una monocapa celular en la parte interna de la córnea, manteniendo la transparencia corneal a través de una función barrera y una función de bomba metabólicamente activa<sup>281</sup>. De manera que cualquier pérdida o daño de estas células resulta en un edema corneal y una pérdida de la visión.

Debido a que las CECs tienen una capacidad limitada de proliferar *in vivo*<sup>107,282,283</sup>, el tratamiento estándar de la insuficiencia endotelial es el trasplante corneal. Tradicionalmente, la Queratoplastia Penetrante (PK, *Penetrating Keratoplasty*) era el tratamiento de referencia de las disfunciones endoteliales. Sin embargo, técnicas más recientes como la Queratoplastia



Endotelial Automatizada con «pelado» de Membrana de Descemet (DSAEK, *Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty*) y la Queratoplastia Endotelial de Membrana de Descemet (DMEK, *Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty*) han emergido ofreciendo mejoras notables en la agudeza visual y tasas menores de rechazo<sup>284</sup>.

Sin embargo, estas técnicas no mitigan la demanda de tejidos de calidad para trasplantes<sup>285</sup>, exacerbada por el envejecimiento poblacional y por obstáculos culturales y logísticos<sup>286</sup>, que conducen a un desequilibrio entre el tejido donado y el necesario para trasplante. El desfase entre la necesidad y la disponibilidad de tejidos ha aumentado las listas de espera, dejando a una gran proporción de la población mundial sin acceso a tratamientos esenciales. De este modo, aproximadamente el 53% de la población mundial no tiene acceso a un trasplante corneal<sup>115</sup>.

En este contexto de escasez de tejidos, la búsqueda de terapias alternativas a los tratamientos quirúrgicos tradicionales queda justificada, pudiendo las nuevas terapias disminuir la necesidad de donantes y aumentar la oferta de tratamientos disponibles, reduciendo la lista de espera para recibir un trasplante.

En los últimos años se han desarrollado varias terapias para el tratamiento de la disfunción endotelial. Estas terapias van desde el tratamiento médico a base de colirios que aumentan la proliferación celular<sup>189,287–290</sup>, hasta el desarrollo de endotelios artificiales mediante técnicas de ingeniería tisular<sup>172</sup> pasando por las técnicas de terapia celular que emplean la inyección de CECs en la cámara anterior, asociada esta última<sup>260,291</sup> o no<sup>261</sup> al uso del inhibidor de la ruta de la Rho-quinasa (ROCK, *Rho-associated Protein Kinase*).

La mayoría de estas terapias que se encuentran en desarrollo creciente, requieren de la utilización de cultivos *in vitro* de CECs. La expansión *in vitro* de CECs presenta dificultades, ya que las CECs se encuentran retenidas en la fase G1 del ciclo celular en condiciones fisiológicas<sup>204</sup>. La dificultad de su expansión se evidencia en las numerosas técnicas y medios de cultivo que se han utilizado a lo largo de los años<sup>179</sup>. La mayoría de las formulaciones utilizadas en los medios de cultivo han incorporado suplementos xenogénicos<sup>292</sup> lo que incrementa la posibilidad de respuestas del sistema inmunológico a proteínas animales residuales y posibilita la presencia de patógenos animales<sup>198</sup>. Para evitar estas limitaciones, la adopción de un medio de cultivo libre de factores xenogénicos surge como una alternativa más segura para el cultivo de las CECs.

Por otro lado, la gran mayoría de los estudios realizados hasta la fecha, utilizan para llevar a cabo la expansión celular, córneas procedentes de donantes relativamente jóvenes y con una densidad endotelial superior a las 2.500 células/mm<sup>2</sup> <sup>181,265,291</sup>. Un tipo de tejido que actualmente sólo sería posible utilizar en España como herramienta terapéutica, en técnicas de ingeniería tisular o terapia celular, si ha sido descartado para su utilización en trasplante. Este tejido se sumaría a los anillos endoteliales que se descartan habitualmente tras la realización de cualquier tipo de trasplante y que han demostrado que pueden dar lugar a cultivos de CECs<sup>210</sup>.

En este trabajo de investigación se ha desarrollado una terapia que pretende ser una alternativa al tratamiento quirúrgico convencional de las disfunciones endoteliales, empleando una suspensión de CECs, obtenidas a partir de tejidos descartados para trasplante y cultivadas con un medio de cultivo libre de factores xenogénicos, para su inyección en cámara anterior.

Inicialmente, se ha evaluado si los diferentes tipos de tejidos descartados para trasplante que pueden ser procesados para la obtención de cultivos de CECs son igual de eficientes a la hora de obtener cultivos confluentes y funcionales. De este modo, se sometieron a evaluación las tres fuentes de tejido endotelial que pueden ser descartados para trasplante: los anillos endoteliales sobrantes de cualquier tipo de cirugía ("Anillo Endotelial"); los endotelios completos de bajo recuento endotelial y/o con presencia de guttas o pliegues que se descartan para utilizar en la cirugía tipo DMEK ("No DMEK"); los endotelios de alto recuento endotelial en los que se produce una rotura del endotelio cuando se prepara para su utilización en una cirugía tipo DMEK "No Trasplante"; y además, se utilizó como grupo control de las CECs nativas, endotelios corneales no cultivados.

Los tejidos se procesaron mediante disección mecánica, estando el tejido endotelial acondicionándose durante un periodo de 2 a 7 días antes de su digestión enzimática. El periodo de acondicionamiento en el medio de cultivo provocó que las CECs mejoraran su morfología, posiblemente debido a los cambios que el medio de cultivo produce en el metabolismo celular. El periodo de acondicionamiento también ayudó a que las CECs senescentes que hubiera en el tejido (debido al estrés producido durante la disección mecánica del mismo) se desprendieran.

En este primer estudio, se utilizó un medio de cultivo convencional que incluye suplementos xenogénicos, que ha demostrado ser efectivo para la obtención de cultivos confluentes de CECs a partir de los tres tipos de tejidos descartados, en estudios previos realizados por el equipo investigador<sup>251,252</sup>. Sin embargo, en estos estudios no se había comparado si los tres tipos de

tejidos descartados eran igual de eficaces a la hora de obtener cultivos de CECs.

De este modo, mediante microscopía de contraste de fases se observó que los 3 tipos de tejidos descartados han sido capaces de generar cultivos confluentes de CECs manteniendo la misma morfología hexagonal de las CECs en el endotelio corneal nativo. Además, las técnicas de inmunocitoquímica revelaron que los cultivos de CECs obtenidos a partir de los tres tipos de tejidos procesados fueron positivos para las proteínas zónula ocludens-1 (ZO-1), Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa, connexina-43 y vimentina, proteínas cruciales para la función biológica desempeñada por el endotelio<sup>292</sup>, lo que sugiere que las CECs cultivadas mantienen el fenotipo de las CECs en el endotelio nativo.

Además, el estudio de la Resistencia Eléctrica Transendotelial (TER, *Transendothelial Electrical Resistance*), que demuestra la existencia de la función barrera endotelial y el paso de electrolitos a través de esta, no mostró diferencias estadísticamente significativas en los cultivos de CECs obtenidos a partir de los tres tipos de tejidos procesados: “No DMEK” ( $50 \pm 6 \Omega\text{cm}^2$ ), “Anillos Endoteliales” ( $36 \pm 3 \Omega\text{cm}^2$ ) y “No Trasplante” ( $35 \pm 2 \Omega\text{cm}^2$ ). Encontrando valores similares a los valores fisiológicos descritos para las CECs en el endotelio nativo ( $15\text{-}25 \Omega\text{cm}^2$ )<sup>86</sup>, pero ligeramente superiores a los descritos en cultivos de CECs humanas en estudios previos<sup>293</sup>. Estos resultados confirman que los cultivos de CECs obtenidos presentan la función característica del endotelio corneal, una función barrera que permanece permeable, conocida como “barrera con fugas” (*leaky barrier*)<sup>294</sup>.

En este estudio, un anillo endotelial o un endotelio completo fueron procesados y sembrados sobre 1 o 2 pocillos de una placa de cultivo de 48 pocillos, respectivamente, a pesar de que numerosos estudios han evidenciado que las CECs del endotelio periférico tienen una mayor capacidad proliferativa que las CECs del endotelio corneal<sup>210</sup>. Esto fue debido a que los endotelios completos recibidos tenían una mayor cantidad de tejido y por tanto un mayor número de CECs, pero también a que sufrían una manipulación más cuidadosa que los anillos endoteliales corneales.

Como era de esperar, el análisis de la densidad de CECs de las córneas que fueron procesadas para la obtención de CECs, mostró diferencias entre los tejidos descartados por su mala calidad y/o bajo recuento endotelial y los tejidos que no son trasplantados por motivos diferentes a la calidad y densidad de sus CECs, o los anillos descartados tras la preparación del injerto endotelial central.

Por otro lado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la media de edad de los donantes de los tejidos procesados en los diferentes grupos experimentales, siendo esta elevada (“No DMEK”: 67 años, “Anillos Endoteliales”: 58 años y “No Trasplante”: 60 años) en comparación a la descrita en otros estudios<sup>188</sup>. Esto ha podido condicionar la expansión limitada obtenida en este trabajo de investigación (P0), ya que en algunos estudios se describe que una edad de los donantes superior a los 45 años dificulta el mantenimiento del fenotipo de los cultivos de las CECs y por tanto su subcultivo<sup>183</sup>.

Una vez se demostró que las diferentes fuentes de tejido descartado daban lugar a la obtención de cultivos primarios de CECs similares, posibilitando un aprovechamiento máximo del tejido descartado. Este hecho permitió no hacer distinción entre estas fuentes tisulares en los estudios posteriores, en los que se refinó la metodología de cultivo de las CECs mediante la modificación del medio de cultivo; se probó su funcionalidad *in vitro* y *ex vivo*; y se adaptó la metodología de cultivo desarrollada a las Normas de Correcta Fabricación (NCF).

La modificación del medio de cultivo consistió en una optimización y simplificación del mismo, al utilizar el Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF, *Plasma Rich in Growth Factors*) como único suplemento de factores tróficos, eliminando los componentes xenogénicos, que pueden desencadenar la reacción del sistema inmunitario a las proteínas animales residuales<sup>198</sup>.

El PRGF es uno de los hemo-derivados humanos más estandarizados. Se trata de un tipo de plasma rico en plaquetas consistente en plasma enriquecido en proteínas y factores de crecimiento que estimulan y aceleran la regeneración tisular<sup>295,296</sup> y que ha demostrado ser efectivo para la expansión de diferentes estirpes celulares<sup>297-299</sup> proporcionando un medio rico en factores de crecimiento sin la necesidad de usar Suero Bovino Fetal (SBF) u otros xenocomponentes. Por otro lado, el PRGF presenta ventajas con respecto a otros medios de cultivo basados en hemo-derivados que han resultado efectivos para el cultivo de las CECs, ya que el PRGF autólogo ha sido aprobado para su uso clínico por la Comunidad Europea y la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU.<sup>299</sup>, y se emplea habitualmente en forma de colirio para tratar la patología de la superficie ocular<sup>300-304</sup>. Todo lo cual repercute, en que, de ser efectivo para el cultivo de las CECs, los cultivos serían más fáciles de realizar, seguros, económicos y trasladables a la práctica clínica.

Para demostrar la eficacia del nuevo medio de cultivo basado en el PRGF en el cultivo de las CECs, se comparó este medio de cultivo con el medio de

cultivo convencional, caracterizándose las CECs de los cultivos obtenidos mediante microscopía de contraste de fases, microscopía de inmunofluorescencia, TER, qPCR, análisis morfométrico y análisis de RNAseq.

Se pudo observar mediante microscopía de contraste de fases que, con ambos medios de cultivo, las CECs en el endotelio nativo mejoraban su morfología tras el periodo de acondicionamiento, y que, tras la digestión enzimática del tejido endotelial, las CECs se adherían a las 48 horas a la placa de cultivo, formando una monocapa confluyente de células de morfología hexagonal a los 20-30 días de cultivo. Además, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, ni en la edad media de los donantes, ni en la densidad de CECs de las córneas que fueron procesadas para la obtención de los cultivos de CECs.

Para analizar el fenotipo de los cultivos realizados, se realizó una inmunofluorescencia de las proteínas ZO-1, conexina-43, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa y vimentina, proteínas que han sido ampliamente descritas como marcadores de fenotipo endotelial corneal en la literatura<sup>212,214,305,306</sup>. El análisis inmunocitoquímico reveló en las CECs obtenidas con ambos medios de cultivo, una tinción positiva para las proteínas ZO-1 y conexina-43, proteínas asociadas a las uniones estrechas y, por tanto, responsables de la función barrera endotelial<sup>307,308</sup>. Además, se observó una tinción positiva para la proteína Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa, una proteína integral de membrana responsable principalmente de la función bomba metabólica<sup>309</sup>, y para la vimentina, una proteína estructural útil para observar el citoesqueleto y necesaria para el mantenimiento del fenotipo endotelial<sup>310</sup>. La tinción de las proteínas ZO-1, conexina-43 y Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa delimitó claramente los bordes celulares, mientras que los filamentos intermedios de vimentina presentaban una fuerte tinción en todo el citoplasma celular.

Además, se midió la TER de los cultivos de CECs obtenidos con ambos medios de cultivo para corroborar la presencia de la función barrera y el paso de electrolitos a través de la monocapa de CECs. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de la TER de los cultivos de CECs obtenidos con un medio de cultivo convencional ( $39,78 \pm 2,83 \Omega\text{cm}^2$ ) y los de los cultivos obtenidos con un medio de cultivo libre de factores xenogénicos ( $39,20 \pm 4,09 \Omega\text{cm}^2$ ). Obteniéndose valores ligeramente superiores, al publicado en estudios previos para los cultivos de CECs humanas<sup>293</sup> y a los descritos para el endotelio nativo<sup>86</sup>. Por tanto, la preservación de la función barrera del endotelio que se muestra a través de los valores de la TER de los cultivos de CECs obtenidos con ambos medios de cultivo, resulta coherente con la tinción positiva obtenida en las pruebas

de inmunofluorescencia para las proteínas ZO-1 y conexina-43, proteínas implicadas en las uniones intercelulares y en el establecimiento de una monocapa celular. Pero también, con la tinción positiva observada para la proteína  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa, proteína transportadora de iones.

Para demostrar si alguno de los dos medios de cultivo utilizados para la obtención de cultivos de CECs favorecía más el crecimiento y/o la morfología celular, se analizó la densidad y el área celular con el programa ImageJ. Las fotografías de inmunofluorescencia de las proteínas ZO-1 y  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa se utilizaron para calcular la densidad y el área celular debido a que en ellas se visualizaba con más claridad los límites de las CECs. El índice de circularidad de las CECs obtenidas con el medio de cultivo libre en factores xenogénicos ( $0,835 \pm 0,01$ ), reveló un valor significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) al de las CECs de los cultivos obtenidos con el medio de cultivo convencional ( $0,801 \pm 0,01$ ). Teniendo en cuenta que la circularidad de un hexágono perfecto tiene un valor de 0,907, estos resultados indican que las CECs obtenidas con el medio de cultivo libre de factores xenogénicos muestran una morfología más hexagonal que las CECs obtenidas con el medio de cultivo convencional, siendo los valores de circularidad, en ambos casos, similares a los publicados en estudios previos<sup>200</sup>.

Para una completa caracterización de las CECs obtenidas con los diferentes medios de cultivo utilizados, se realizó un estudio de secuenciación del ARN de las CECs de los cultivos obtenidos y se comparó con los datos del estudio de Tokuda y colaboradores<sup>276</sup> del endotelio corneal nativo. Este estudio fue utilizado como control debido a la similitud de sus donantes con los de nuestro estudio, quienes también eran donantes caucásicos, con una edad media de 61 años. Además, todas las córneas del estudio de Tokuda y colaboradores se almacenaron en un medio de conservación del tejido corneal, antes de la extracción del ARN, similar al utilizado en nuestro estudio y se realizó un procesamiento similar para la obtención de las bibliotecas de ARN.

Los resultados de RNA-seq para la ZO-1, la conexina-43, la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa y la vimentina, mostraron niveles de expresión similares entre los 3 grupos de CECs estudiadas: las CECs de endotelio nativo y las CECs de los cultivos obtenidos con el medio de cultivo convencional o con el medio de cultivo libre de factores xenogénicos. Estos resultados demuestran que, en las CECs de los cultivos obtenidos con ambos medios de cultivo, los genes se están expresando y las proteínas están traducidas, lo que se evidencia por la positividad observada en las técnicas de inmunofluorescencia.

Sin embargo, a pesar del nivel de expresión similar en los marcadores de fenotipo endotelial corneal seleccionados, se encontró un gran número de Genes Diferencialmente Expresados (DEGs, *Differentially Expressed Genes*) entre las CECs de los cultivos realizados con los dos medios de cultivo estudiados y las CECs del endotelio nativo. De este modo, las diferencias entre las CECs del endotelio nativo y las CECs de los cultivos representan la mayor parte de la variación entre las muestras, como se puede interpretar en el Análisis del Componente principal (PCA, *Principal Component Analysis*). Estos resultados concuerdan con otros estudios de RNA-seq donde se encontró que el cultivo de cualquier tipo celular afecta a la expresión génica, encontrándose DEGs con respecto a las células en el tejido nativo<sup>311-314</sup>. Además, en el caso de las CECs se ha demostrado que el cultivo afecta a su expresión génica de una manera progresiva, aumentando las diferencias conforme aumenta el número de divisiones celulares *in vitro*<sup>183,207</sup>.

Los resultados del *Heatmap*, mostraron patrones interesantes en la expresión de genes clave relacionados con la función, adhesión, proliferación y matriz extracelular de las CECs en el endotelio nativo y en los cultivos realizados con los medios de cultivo estudiados. En lo que se refiere a los genes relacionados con la función celular, se pudo observar que el gen *SLC4A11*, marcador de la funcionalidad del endotelio corneal<sup>315,316</sup>, mostró una expresión más alta en las CECs del endotelio nativo que en las CECs de los cultivos, siendo la diferencia menos evidente en el caso de las CECs de los cultivos realizados con el medio de cultivo libre de factores xenogénicos. Además, las CECs de los cultivos realizados con el medio de cultivo suplementado con PRGF presentaron niveles de expresión del gen *ALCAM* más elevados que las CECs de los cultivos realizados con el medio de cultivo convencional, lo que sugiere que el medio de cultivo enriquecido con PRGF podría promover una mayor retención del fenotipo endotelial en las CECs cultivadas, al tratarse el gen *ALCAM*, de un marcador utilizado para identificar el endotelio maduro<sup>317,318</sup>.

En cuanto a la capacidad de adhesión celular, el gen *AJAP1* mostró una expresión relativamente más baja en las CECs de los cultivos realizados con el medio de cultivo convencional y con el medio de cultivo libre en factores xenogénicos en comparación a las CECs en el endotelio nativo, que, sin embargo, no parece influir en la capacidad de adhesión de las CECs cultivadas, ya que, en ambos casos, las CECs fueron capaces de adherirse a las placas de cultivo.

Por otro lado, se pudo observar que, en general, todos los genes relacionados con la proliferación celular se expresaron en menor medida en

las CECs del endotelio nativo en comparación con las CECs de los cultivos realizados con ambos medios de cultivo. Hecho que muestra que el cultivo celular induce la proliferación celular, sacando a las CECs de su estado de quiescencia.

Por último, en lo que se refiere a los genes relacionados con la matriz extracelular, el gen *COL4A2* mostró una expresión superior en las CECs cultivadas a la encontrada en las CECs del endotelio nativo. Esto podría explicarse debido a la ausencia de membrana de Descemet en los pocillos en los que se realiza el cultivo de las CECs. Como se ha descrito anteriormente, las CECs son las encargadas de producir materia extracelular, de manera que la membrana de Descemet aumenta en grosor a lo largo de la vida del individuo, habiendo sido descrito que cuando las CECs no se encuentran sobre esta membrana la producción de matriz puede verse estimulada<sup>319</sup>.

Finalmente, los resultados del análisis genético de las CECs mediante RNA-seq fueron comprobados mediante la realización de una qPCR, por ser la qPCR una técnica anterior, considerada de fiabilidad más contrastada. Los resultados de la qPCR para los cuatro genes seleccionados como marcadores característicos de las CECs, nuevamente no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos, lo que apoya y valida los resultados del RNA-seq.

Una vez demostrado que el PRGF es una fuente de factores de crecimiento que permite la obtención de cultivos de CECs a partir de tejidos descartados, los cuales preservan el genotipo y el fenotipo de las CECs nativas. El siguiente paso fue demostrar la funcionalidad de los cultivos obtenidos con la metodología propuesta.

Como primera aproximación, se estudió la existencia de la función bomba metabólica por ser la principal función de estas células, junto con la función barrera, demostrada con la medida de la TER. Para verificar la existencia de una función bomba metabólica activa, se midió la actividad  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa por ser de todas las bombas metabólicas presentes en la membrana de las CECs la más importante y la más caracterizada<sup>92,320</sup>. Se obtuvo un valor medio de  $1,84 \times 10^{-6}$  U/ $10^4$  células, un valor ligeramente superior al obtenido en otros estudios ( $1,52 \times 10^{-6}$  U/ $10^4$  células)<sup>218</sup>, que constata que la función bomba metabólica se encuentra preservada en las CECs cultivadas utilizando el medio de cultivo libre de factores xenogénicos.

En un segundo estudio, se evaluó la funcionalidad de los cultivos de CECs, estudiando su capacidad para restituir el endotelio corneal. Para ello, se utilizaron modelos organotípicos *ex vivo* de patología endotelial, realizados



con córneas tanto humanas como de conejo, que posteriormente eran tratadas con los cultivos de CECs obtenidos con la metodología desarrollada. A pesar de que las CECs de conejo son muy diferentes a las humanas, ya que tienen capacidad de proliferar tanto *in vivo* como *in vitro*<sup>321</sup>, la utilización de córneas de conejo permitió realizar dos modelos de enfermedad endotelial, uno en el que la membrana de Descemet estaba preservada (raspado de las CECs) y otro en el que ésta se eliminaba (descemetorrexis). Esto permitió estudiar la necesidad de que exista una membrana de Descemet integra que propicie la adhesión de las CECs, a la hora de utilizar los cultivos de CECs en una futura terapia. Esta evaluación no se hubiera podido realizar utilizando únicamente córneas humanas, ya que la mayoría de las córneas completas que se descartan, son las que han sido utilizadas tras la obtención del injerto endotelial para su utilización en una cirugía tipo DMEK y que por tanto carecen de membrana de Descemet.

Debido a la ya mencionada capacidad proliferativa de las CECs de conejo *in vitro*. Para poder estudiar la necesidad de la existencia de una membrana de Descemet integra para la adhesión y proliferación de los cultivos de CECs, las córneas de conejo desprovistas de CECs (modelo de raspado) o desprovistas de membrana de Descemet y CECs (modelo de descemetorrexis), se mantuvieron 7 días en órgano-cultivo sin ser sembradas con CECs. Tras este periodo de órgano-cultivo, el estudio histológico y mediante microscopia especular de las córneas, demostró que los modelos de daño endotelial eran efectivos en ambos casos, ya que eran capaces de eliminar eficazmente las CECs.

Cuando estos modelos fueron sembrados con CECs de conejo cultivadas, el estudio histológico mostró a las CECs de conejo adheridas a la cara interna de la córnea, consiguiendo reepitelizar el endotelio corneal al completo, tanto en el modelo de daño endotelial que mantenía la membrana de Descemet preservada (modelo de raspado), como en el caso del modelo en el que está estaba ausente (modelo de descemetorrexis). En cambio, en el caso de las CECs humanas sembradas sobre los modelos organotípicos de conejo, el estudio histológico reveló pequeños grupos de células dispersos en la cara interna de la córnea, en ambos modelos de daño endotelial.

La diferente capacidad de adhesión y proliferación de las CECs de conejo y humano, a la hora de reepitelizar los modelos de daño endotelial realizados con córneas de conejo, podría ser debido a la menor capacidad proliferativa de las CECs humanas y a las diferencias existentes entre las proteínas humanas y de conejo. En concreto, el colágeno, proteína mayoritaria de la córnea, difiere ligeramente en la composición de aminoácidos y la

secuencia de las cadenas polipeptídicas en humano y en conejo, pudiendo dar lugar a reacciones inmunológicas<sup>322</sup>, que pueden haber afectado a la capacidad de las CECs humanas de adherirse a los modelos organotípicos de conejo.

En el caso del modelo organotípico *ex vivo* realizado con córneas humanas a las que se realizó una descemetorrexis, tanto los cultivos de CECs de conejo, como los cultivos de CECs humanas, fueron capaces de adherirse y proliferar sobre el estroma corneal, reepitelizando la superficie interna de la córnea. Si bien se encontró un mayor número de CECs de conejo que humanas, lo cual puede explicarse por la mayor capacidad proliferativa de las CECs de conejo. Sin embargo, las CECs humanas formaron una monocapa, que, en las imágenes de inmunofluorescencia, mostró tinción positiva para los 4 marcadores de funcionalidad estudiados: ZO-1, conexina-43, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa y vimentina; y en las imágenes de microscopía electrónica de barrido, mostró que la reepitelización fue completa, observándose CECs con una morfología poligonal.

Los resultados obtenidos con los modelos organotípicos realizados, tanto en conejo como en humano, parecen demostrar que no es necesaria la existencia de una membrana de Descemet integra a la hora de que la terapia desarrollada pudiera ser efectiva, lo cual está en consonancia con estudios previos en los que se demostró que está no era necesaria para la adhesión y la proliferación de las CECs<sup>179</sup>. Si bien, el periodo de seguimiento de 7 días quizá debería ser aumentado, en estudios posteriores, para evaluar la repercusión de la existencia de la membrana de Descemet en la eficacia de la terapia, a más largo plazo.

En este estudio, en cada modelo organotípico realizado, se sembraron las CECs obtenidas en un área de cultivo de 1,10 cm<sup>2</sup>, lo que supone aproximadamente 68.000 CECs por cada modelo realizado. Un número de CECs en el límite inferior del publicado en estudios previos, donde se han utilizado densidades de siembra de entre 50.000-700.000 CECs<sup>228,232-234</sup> 174, pero que resultó efectivo para reconstituir el endotelio corneal en los modelos organotípicos, corroborando la funcionalidad de las CECs obtenidas con la metodología de cultivo desarrollada.

La traslación clínica de la metodología de cultivo desarrollada conlleva su adaptación a las Normas de Correcta Fabricación (NCF), al ser catalogadas las terapias que incluyen el cultivo celular como Medicamentos de Terapia Avanzada (MTA), teniendo que realizarse en una instalación y bajo un sistema de calidad farmacéutico.

En este sentido, se llevó a cabo la fabricación de los lotes de CECs siguiendo la metodología desarrollada, en el sistema de presión positiva que se encuentra ubicado en las instalaciones del Instituto Oftalmológico Fernández-Vega (IOFV), el cual cumple con las NCF ya que el ambiente de trabajo es ISO 4 (grado exigible para la producción de los medicamentos), tiene presión positiva (disminuye los riesgos de contaminación), tiene flujo laminar sin turbulencias (las turbulencias aumentan la probabilidad de contaminación) y tiene unos parámetros físicos dentro de los límites establecidos.

Además, las producciones se realizaron dentro del sistema de calidad farmacéutico desarrollado de acuerdo con la parte IV de las NCF y adaptado a las condiciones y características de esta instalación, el cual se encuentra implantado en la institución desde el año 2020<sup>323</sup>.

Para ello, se redactó una Guía de Fabricación, en la que se describió cada una de las etapas de la producción, así como los controles de calidad del proceso y del producto. Los controles de calidad del proceso hacen referencia a los controles implantados en el sistema de calidad farmacéutico y que son comunes a todas las producciones que se realicen en la instalación, como el que el recuento de partículas viables o no viables, cumplan con la normativa vigente<sup>272</sup>, o el que los parámetros físicos se encuentren dentro de los límites establecidos. En cuanto a los controles de calidad del producto, se establecieron inicialmente la morfología de las CECs en el cultivo primario, la cual debe ser hexagonal y uniforme en todo el cultivo; el que el cultivo primario sea confluyente, para garantizar la presencia de la función barrera; y la esterilidad del producto final, para garantizar la seguridad del MTA producido. Si bien, dentro de la mejora continua que debe existir en los sistemas de calidad, se tiene previsto implantar un número de CECs mínimas en el cultivo primario, la comprobación de la presencia de los marcadores fenotípicos de funcionalidad ZO-1 y Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa (siempre que se procese un endotelio completo que permita el cultivo de dos pocillos de una placa de 48 pocillos) y la comprobación en el producto final de la ausencia de micoplasma, endotoxinas y contaminación microbiológica mediante BactAlert, en vez de tioglicolato, una vez que se haya realizado el test de promoción del crecimiento en el medio de cultivo desarrollado.

Las producciones realizadas hasta el momento en la instalación y bajo el sistema de calidad implantado, confirman la reproducibilidad del proceso de fabricación, demostrando que el proceso cumple con los controles establecidos y que el producto final cumple con los controles de calidad definidos. De esta manera los cultivos primarios de CECs mostraron la

morfología hexagonal característica de las CECs y alcanzaron la confluencia. Además, se demostró la esterilidad del producto final mediante la inoculación del medio de cultivo en contacto con el MTA, antes de su etapa de acondicionamiento, en tioglicolato, un medio de cultivo no selectivo, que permite el crecimiento de microorganismos aerobios, anaerobios y microaerófilos.

Para que un MTA pueda ser utilizado en la práctica clínica, debe cumplir el Reglamento (CE) n.º 1394/2007 del Parlamento Europeo y del Consejo<sup>268</sup> y la Guía de las NCF<sup>272</sup> pudiendo ser fabricado con una autorización de comercialización o bajo el paraguas de la denominada exención hospitalaria, que permite *“la fabricación de medicamentos de forma no rutinaria, preparados ocasionalmente, de acuerdo con normas de calidad específicas, usados dentro del mismo Estado miembro en un hospital, bajo la exclusiva responsabilidad profesional de un facultativo para hacer frente a una prescripción médica individual de un producto a medida para un paciente concreto”*. Este sería el caso de la terapia propuesta en este estudio, ya que para obtener el cultivo de CECs que se emplearían en el tratamiento de un paciente, se utilizaría el PRGF del propio paciente.

Sin embargo, al no encontrarse la terapia desarrollada en este estudio dentro de las consideradas como consolidadas: el trasplante autólogo de condrocitos, el implante de queratinocitos para tratamiento de quemados o el tratamiento de lesiones corneales con células troncales limboconiales<sup>270</sup>, la traslación clínica de la terapia desarrollada requerirá de la realización de un ensayo clínico cumpliendo con la regulación marcada por el RD 1090/2015 y el Reglamento N° 536/2014 del Parlamento Europeo<sup>324,325</sup>, que regulan los ensayos clínicos con medicamentos de uso humano. Por tanto, para la llegada del MTA desarrollado a los pacientes aún queda parte del camino por realizar que consiste en la fabricación satisfactoria de las tres producciones de validación, la aprobación de un ensayo clínico y que los resultados obtenidos en el mismo demuestren la seguridad y eficacia del tratamiento.

Como se ha discutido, el trabajo de investigación ha conseguido los objetivos planteados, sin embargo, no deja de tener limitaciones. La primera de ellas es que, aunque se han obtenido cultivos de CECs que preservan el genotipo, fenotipo y función de la CECs nativas a partir de tejidos descartados, no podemos hablar de que hayamos realizado una verdadera expansión celular, ya que de un anillo endotelial obtenemos un único cultivo de CECs. Y aunque de los endotelios completos somos capaces de obtener dos cultivos de CECs, este tipo de tejido se descarta en menor cantidad. Sin embargo, teniendo en cuenta que el injerto endotelial que se trasplanta en

una cirugía tipo DMEK tiene 53.429 mm<sup>2</sup> y una densidad media de CECs de 2.500 células/mm<sup>2</sup>, en este tipo de cirugía se trasplantan aproximadamente 133.572 CECs, una cantidad que se corresponde con la obtenida en este estudio a partir de un endotelio corneal completo o dos anillos endoteliales. Esta expansión celular, aunque pueda parecer escasa en comparación a la utilizada en los ensayos clínicos realizados hasta la fecha, es importante puesto que en 2022 en España se desestimaron por causas relacionadas con el donante o con el procesamiento 574 y 1.283 córneas, respectivamente. De estas córneas, una parte de las desechadas por causas relacionadas con el donante no habrían podido ser utilizadas para la obtención de CECs trasplantables, no obstante, sí se hubieran podido utilizar la mayoría de las descartadas por causas relacionadas con el procesamiento, pudiendo haber sido utilizadas en métodos alternativos a los trasplantes como el planteado en este estudio, y reduciendo así, la lista de espera del trasplante endotelial.

Además, a lo largo del estudio de investigación se ha hablado de un “medio de cultivo libre de factores xenogénicos” y no de una “metodología de cultivo libre de factores xenogénicos”. Esto es debido a que, en este estudio, para la obtención de los cultivos de CECs se ha utilizado FNC Coating Mix<sup>®</sup> comercial para el tratamiento de las placas antes de la siembra. Un tratamiento que ha consistido en añadir en un pocillo 200 µL de FNC Coating Mix<sup>®</sup>, dejarlo actuar durante 30 segundos y retirarlo antes de sembrar las CECs. A pesar de este breve tratamiento, no podemos hablar de metodología libre de factores xenogénicos puesto que el FNC Coating Mix<sup>®</sup> comercial es una mezcla de albúmina, colágeno y fibronectina de origen bovino. Pese a esto, el hecho de que el FNC Coating Mix<sup>®</sup> comercial no haya sido utilizado en los estudios ex vivo, y que las CECs hayan sido capaces de reepitelizar los modelos organotípicos, abre la puerta a estudios posteriores en los que intentar eliminar su uso, o intentar su reemplazo por el tratamiento de la placa de cultivo con el colágeno tipo I humano extraído de hueso descartado, cuyo protocolo de extracción ha sido puesto a punto por el equipo investigador<sup>252</sup>.

Por otro lado, en este estudio de investigación, la funcionalidad de la metodología de cultivo no ha sido probada en un modelo animal de enfermedad, algo que previsiblemente será exigido por las autoridades reguladoras antes de la realización de un ensayo clínico. Las mismas autoridades reguladoras que con la entrada en vigor del Real Decreto 53/2013 promueven la protección de los animales utilizados en experimentación, implementando el principio de las tres erres (reemplazo, reducción y refinamiento) y exigiendo que en las solicitudes de autorización de un protocolo de experimentación con animales se explique si el método

ya ha sido probado en animales y si no hay alternativas. Esas mismas autoridades exigen la realización de estudios preclínicos en animales que demuestren la eficacia de la terapia, aunque ya haya ensayos clínicos similares realizados en humanos, o se haya demostrado su funcionalidad en un modelo organotípico relevante desde el punto de vista clínico, como es el caso de este estudio, al haberse utilizado un modelo organotípico humano que ha sido tratado con CECs humanas. Debido a esto el protocolo ético para la realización del estudio *in vivo* está solicitado y aceptado para su futura realización en caso necesario.

Por último, en los MTA, al igual que en el resto de los medicamentos, uno de los controles de calidad exigidos que demuestra la ausencia de bacterias y hongos (BactAlert), así como la ausencia de endotoxinas y micoplasmas es el control microbiológico de la esterilidad en el producto final. Para poder hacerlo, previamente se debe demostrar que ninguno de los componentes presentes en el producto final interfiere con el método de detección elegido. Para ello es necesario llevar a cabo el ensayo de promoción de crecimiento, de acuerdo con lo indicado en el capítulo 2.6.1 de la Farmacopea Europea. En este trabajo de investigación, motivos económicos, pero sobre todo logísticos, han impedido la realización del ensayo de promoción del crecimiento y en consecuencia el ensayo de esterilidad, en sentido estricto, del producto final. Esto es debido a que, a pesar de que el volumen del medio de cultivo en contacto con las CECs que debe ser enviado a analizar en las muestras de rutina del producto final es de 0,2 mL; 0,4 mL y 0,5 mL para la realización del BactAlert, micoplasmas y endotoxinas, respectivamente, el volumen necesario para la realización del ensayo de promoción de crecimiento es de 3 mL, 4 mL y 1 mL para la realización del BactAlert, micoplasmas y endotoxinas, respectivamente. Un volumen muy superior al utilizado en el pocillo de una placa de 48 pocillos, que requeriría de un número mayor de cultivos para hacer las diferentes réplicas del ensayo de validación de la promoción del crecimiento. Sin embargo, sí se ha realizado el análisis de la esterilidad del producto final con tioglicolato, un medio de cultivo no selectivo que permite el crecimiento de cualquier tipo de microorganismos. Los resultados obtenidos, en los que no se ha observado crecimiento microbiológico, permiten garantizar la esterilidad del producto final y el hecho de haber realizado controles positivos y negativos a los tubos de tioglicolato, con resultados positivos y negativos respectivamente, respaldan este resultado. Por otro lado, el hecho de haber realizado el ensayo de promoción del crecimiento al medio de cultivo libre en factores xenogénicos que se utiliza para la fabricación de otro MTA desarrollado por el grupo de investigación, (un medio de cultivo muy similar al utilizado para el cultivo de CECs, ya que consiste en DMEM:F12 y PRGF al 10%) parece indicar que el test tendrá resultados positivos, pudiendo implementarse la

## Discusión

realización del BActAlert y el ensayo de micoplasma y endotoxinas en los controles de rutina una vez superado el escollo logístico.



## Perspectivas de futuro

“La recompensa por el trabajo bien hecho es la  
oportunidad de hacer más”

- Jonas Salk



Perspectivas de futuro

Este proyecto de investigación tiene múltiples posibilidades de continuación, la primera y más evidente, la realización de un ensayo que estudie la funcionalidad de las CECs inyectadas en cámara anterior en un modelo *in vivo* de disfunción endotelial. La estrecha colaboración de nuestro grupo de investigación con el IOFV da lugar a la oportunidad de la realización de estas cirugías por parte de un cirujano, capaz de realizar y evaluar el éxito de la terapia, pudiendo aportar, además, opciones de mejora. Actualmente ya se ha aprobado el comité ético necesario para este ensayo y se está tratando de coordinar un equipo para llevarlo a cabo.

En segundo lugar, sería la realización del test de promoción de crecimiento al medio de cultivo que permita implantar el test de esterilidad que marca farmacopea europea en el producto final. En este sentido ya se tiene el presupuesto pedido para poder realizarlo, y se está diseñando cómo poder llevarlo a cabo con el laboratorio acreditado para la realización de este tipo de control.

En tercer lugar, los resultados de este estudio en el que se ha conseguido obtener CECs viables a partir de tejido endotelial descartado, abre la puerta a utilizar otro tipo de tejido descartado, para obtener estirpes celulares alternativas a las CECs, como las células de la cápsula anterior del cristalino, que permitan aumentar la disponibilidad del tejido endotelial artificial. Esta estirpe celular ha sido elegida en base a que comparte características importantes con las CECs como el que tienen el mismo origen embrionario, se encuentran en un estado no proliferativo en su nicho celular, tienen una morfología similar, y además, comparten marcadores de funcionalidad, ya que ambas estirpes celulares mantienen la transparencia de la córnea, en el caso de las CECs; y del cristalino, en el caso de las células epiteliales de la cápsula del cristalino, a través de una función de transporte de fluidos. No obstante, las células de la cápsula del cristalino son conocidas por dar lugar a opacidades en el segmento anterior. La transición endotelio-mesenquimal es, por tanto, delicada en estas células, lo que ha conducido a los investigadores a ser cautos en su estudio como sustituto del endotelio corneal. Quizá un medio basado en el PRGF, como el utilizado en nuestro estudio, combinado con una técnica de administración por inyección en cámara anterior sean capaces de solventar estos problemas.

Por último, a pesar de que se ha desarrollado una herramienta terapéutica con resultados prometedores, el camino para que ésta pueda implementarse en la práctica clínica es largo. Por lo que este estudio de investigación que se ha realizado para dar respuesta a la pregunta ¿es posible simplificar la herramienta terapéutica desarrollada hasta el momento para el tratamiento de las insuficiencias endoteliales, eliminando el uso del soporte y cultivando

las CECs humanas en un medio de cultivo libre de factores xenogénicos? Finaliza, en base a los resultados obtenidos, con otra pregunta de investigación, ¿es posible desarrollar un tratamiento de las disfunciones endoteliales, a partir de tejidos descartados, que evite la consideración de MTA por obtener las CECs sin el uso de enzimas y sin una fase de cultivo? De ser demostrado, la terapia no tendría la consideración de MTA, de acuerdo a la legislación vigente, ya que las células realizarían la misma función en el receptor y en el donante; y no se realizaría ningún procedimiento distinto de las manipulaciones no sustanciales enumeradas en el anexo I del Reglamento (CE) N° 1394/2007 con lo que la terapia propuesta sería equiparable a un trasplante convencional, pudiendo ser su traslación a la práctica clínica rápida y sencilla.



# Conclusiones

“Todas las verdades son fáciles de entender una vez descubiertas, la cuestión es descubrirlas”

- Galileo Galilei

## Conclusiones

1. Cultures of Corneal Endothelial Cells (CECs) have been obtained from the different types of endothelial tissue discarded for transplantation, using a conventional culture medium that includes xenogeneic factors.
2. The standard culture medium of CECs including xenogeneic factors has been optimized and simplified by using Plasma Rich in Growth Factors (PRGF). The use of PRGF as the sole trophic factor supplement allows CECs to be cultured from discarded tissue. This preserves the genotype, phenotype and function of native CECs in in vitro studies.
3. In an ex vivo organotypic model of endothelial dysfunction, CECs cultured in xenogeneic factor-free medium were able to adhere, proliferate, re-epithelialize, and form a cell monolayer with positive staining for the functional markers studied.
4. The methodology for obtaining cultures of CECs from discarded tissues has been transferred to Good Manufacturing Practice (GMP) for human drugs, allowing its future application to the clinical practice.

## Conclusiones



## Bibliografía

*"Un experto es una persona que ha cometido todos los errores que se pueden cometer en un campo muy limitado"*

- Niels Bohr



## Bibliografía

1. Sutherland, S. Eye, brain and vision. *Nature* **362**, 419–420 (1993).
2. Sivak, J. G. CLINICAL ANATOMY OF THE EYE. *Optometry and Vision Science* **67**, 153 (1990).
3. Atchison, D. *Optics of the Human Eye*. (CRC Press, Boca Raton, 2023). doi:10.1201/9781003128601.
4. Salmon, J. F. *Kanski. Oftalmología clínica: Un enfoque sistemático*. (Elsevier Health Sciences, 2021).
5. Gordon, R. A. & Donzis, P. B. Refractive Development of the Human Eye. *Archives of Ophthalmology* **103**, 785–789 (1985).
6. Nishida, T. Neurotrophic mediators and corneal wound healing. *Ocul Surf* **3**, 194–202 (2005).
7. Dyrland, T. F. *et al.* Human Cornea Proteome: Identification and Quantitation of the Proteins of the Three Main Layers Including Epithelium, Stroma, and Endothelium. *J Proteome Res* **11**, 4231–4239 (2012).
8. Dua, H. S., Faraj, L. A., Said, D. G., Gray, T. & Lowe, J. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology* **120**, 1778–1785 (2013).
9. Krachmer, J. H., Mannis, M. J. & Holland, E. J. *Cornea E-Book*. (Elsevier Health Sciences, 2010).
10. Pfister, R. R. The normal surface of corneal epithelium: a scanning electron microscopic study. *Invest Ophthalmol* **12**, 654–668 (1973).

## Bibliografía

11. Gipson, I. K., Spurr-Michaud, S. J. & Tisdale, A. S. Hemidesmosomes and anchoring fibril collagen appear synchronously during development and wound healing. *Dev Biol* **126**, 253–262 (1988).
12. Dua, H. S., Gomes, J. A. & Singh, A. Corneal epithelial wound healing. *Br J Ophthalmol* **78**, 401–408 (1994).
13. Wilson, S. E. Corneal wound healing. *Experimental Eye Research* **197**, 108089 (2020).
14. Hanna, C., Bicknell, D. S. & O'Brien, J. E. Cell turnover in the adult human eye. *Arch Ophthalmol* **65**, 695–698 (1961).
15. Tseng, S. C. Concept and application of limbal stem cells. *Eye (Lond)* **3 ( Pt 2)**, 141–157 (1989).
16. Thoft, R. A. & Friend, J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **24**, 1442–1443 (1983).
17. Wilson, S. E. & Hong, J. W. Bowman's layer structure and function: critical or dispensable to corneal function? A hypothesis. *Cornea* **19**, 417–420 (2000).
18. Wilson, S. E. Bowman's layer in the cornea— structure and function and regeneration. *Exp Eye Res* **195**, 108033 (2020).
19. Wilson, S. E. The Cornea: No Difference in the Wound Healing Response to Injury Related to Whether, or Not, There's a Bowman's Layer. *Biomolecules* **13**, 771 (2023).
20. Espana, E. M. & Birk, D. E. Composition, structure and function of the corneal stroma. *Experimental Eye Research* **198**, 108137 (2020).

21. Fitch, J. M., Gross, J., Mayne, R., Johnson-Wint, B. & Linsenmayer, T. F. Organization of collagen types I and V in the embryonic chicken cornea: monoclonal antibody studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 2791–2795 (1984).
22. Yue, B. Y., Sugar, J. & Schrode, K. Collagen staining in corneal tissues. *Curr Eye Res* **5**, 559–564 (1986).
23. Kern, P., Menasche, M. & Robert, L. Relative rates of biosynthesis of collagen type I, type V and type VI in calf cornea. *Biochem J* **274 ( Pt 2)**, 615–617 (1991).
24. Meek, K. M. & Boote, C. The organization of collagen in the corneal stroma. *Experimental Eye Research* **78**, 503–512 (2004).
25. Müller, L. J., Pels, E., Schurmans, L. R. H. M. & Vrensen, G. F. J. M. A new three-dimensional model of the organization of proteoglycans and collagen fibrils in the human corneal stroma. *Experimental Eye Research* **78**, 493–501 (2004).
26. Quantock, A. J. & Young, R. D. Development of the corneal stroma, and the collagen–proteoglycan associations that help define its structure and function. *Developmental Dynamics* **237**, 2607–2621 (2008).
27. West-Mays, J. A. & Dwivedi, D. J. The keratocyte: Corneal stromal cell with variable repair phenotypes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **38**, 1625–1631 (2006).
28. Snell, R. S. & Lemp, M. A. *Clinical Anatomy of the Eye*. (John Wiley & Sons, 2013).

## Bibliografia

29. Johnson, D. H., Bourne, W. M. & Campbell, R. J. The Ultrastructure of Descemet's Membrane: I. Changes With Age in Normal Corneas. *Archives of Ophthalmology* **100**, 1942–1947 (1982).
30. Saikia, P., Medeiros, C. S., Thangavadivel, S. & Wilson, S. E. Basement membranes in the cornea and other organs that commonly develop fibrosis. *Cell Tissue Res* **374**, 439–453 (2018).
31. Labermeier, U. & Kenney, M. C. The presence of EC collagen and type IV collagen in bovine Descemet's membranes. *Biochem Biophys Res Commun* **116**, 619–625 (1983).
32. Fitch, J. M., Birk, D. E., Linsenmayer, C. & Linsenmayer, T. F. The spatial organization of Descemet's membrane-associated type IV collagen in the avian cornea. *J Cell Biol* **110**, 1457–1468 (1990).
33. Linsenmayer, T. F. *et al.* Development and roles of collagenous matrices in the embryonic avian cornea. *Prog Retin Eye Res* **17**, 231–265 (1998).
34. de Oliveira, R. C. & Wilson, S. E. Descemet's membrane development, structure, function and regeneration. *Exp Eye Res* **197**, 108090 (2020).
35. Yurchenco, P. D. & Patton, B. L. Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly. *Curr Pharm Des* **15**, 1277–1294 (2009).
36. Gordon, S. R. Fibronectin antibody labels corneal stromal collagen fibrils in situ along their length and circumference and demonstrates distinct staining along the cell and stromal interfaces of Descemet's membrane. *Curr Eye Res* **39**, 312–316 (2014).

37. Beuerman, R. W. & Schimmelpfennig, B. Sensory denervation of the rabbit cornea affects epithelial properties. *Exp Neurol* **69**, 196–201 (1980).
38. Bourne, W. M., Nelson, L. R. & Hodge, D. O. Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **38**, 779–782 (1997).
39. Fraser, S., Bunce, C., Wormald, R. & Brunner, E. Deprivation and late presentation of glaucoma: case-control study. *BMJ* **322**, 639–643 (2001).
40. Al-Aqaba, M. A., Fares, U., Suleman, H., Lowe, J. & Dua, H. S. Architecture and distribution of human corneal nerves. *Br J Ophthalmol* **94**, 784–789 (2010).
41. Müller, L. J., Pels, L. & Vrensen, G. F. Ultrastructural organization of human corneal nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**, 476–488 (1996).
42. Müller, L. J., Marfurt, C. F., Kruse, F. & Tervo, T. M. T. Corneal nerves: structure, contents and function. *Experimental Eye Research* **76**, 521–542 (2003).
43. Tervo, K. *et al.* Substance P-immunoreactive nerves in the human cornea and iris. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **23**, 671–674 (1982).
44. Toivanen, M., Tervo, T., Partanen, M., Vannas, A. & Hervonen, A. Histochemical demonstration of adrenergic nerves in the stroma of human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **28**, 398–400 (1987).
45. Ueda, S., del Cerro, M., LoCascio, J. A. & Aquavella, J. V. Peptidergic and catecholaminergic fibers in the human corneal epithelium. An immunohistochemical and electron microscopic study. *Acta Ophthalmol Suppl* (1985) **192**, 80–90 (1989).

## Bibliografía

46. Tervo, K., Latvala, T. M. & Tervo, T. M. Recovery of corneal innervation following photorefractive keratoablation. *Arch Ophthalmol* **112**, 1466–1470 (1994).
47. Baker, K. S., Anderson, S. C., Romanowski, E. G., Thoft, R. A. & SundarRaj, N. Trigeminal ganglion neurons affect corneal epithelial phenotype. Influence on type VII collagen expression in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **34**, 137–144 (1993).
48. Garcia-Hirschfeld, J., Lopez-Briones, L. G. & Belmonte, C. Neurotrophic Influences on Corneal Epithelial Cells. *Experimental Eye Research* **59**, 597–605 (1994).
49. Chan, K. Y. & Haschke, R. H. Isolation and culture of corneal cells and their interactions with dissociated trigeminal neurons. *Experimental Eye Research* **35**, 137–156 (1982).
50. Emoto, I. & Beuerman, R. W. Stimulation of neurite growth by epithelial implants into corneal stroma. *Neuroscience Letters* **82**, 140–144 (1987).
51. Cursiefen, C. Immune privilege and angiogenic privilege of the cornea. *Chem Immunol Allergy* **92**, 50–57 (2007).
52. Azar, D. T. CORNEAL ANGIOGENIC PRIVILEGE: ANGIOGENIC AND ANTIANGIOGENIC FACTORS IN CORNEAL AVASCULARITY, VASCULOGENESIS, AND WOUND HEALING (AN AMERICAN OPHTHALMOLOGICAL SOCIETY THESIS). *Trans Am Ophthalmol Soc* **104**, 264–302 (2006).

53. Ambati, B. K. *et al.* Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature* **443**, 993–997 (2006).
54. Albuquerque, R. J. C. *et al.* Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. *Nat Med* **15**, 1023–1030 (2009).
55. Cursiefen, C. *et al.* Nonvascular VEGF receptor 3 expression by corneal epithelium maintains avascularity and vision. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11405–11410 (2006).
56. Cursiefen, C. *et al.* Roles of thrombospondin-1 and -2 in regulating corneal and iris angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 1117–1124 (2004).
57. Goyal, S. *et al.* Evidence of corneal lymphangiogenesis in dry eye disease: a potential link to adaptive immunity? *Arch Ophthalmol* **128**, 819–824 (2010).
58. Hos, D. & Cursiefen, C. Lymphatic vessels in the development of tissue and organ rejection. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **214**, 119–141 (2014).
59. Hos, D. *et al.* Transient Ingrowth of Lymphatic Vessels into the Physiologically Avascular Cornea Regulates Corneal Edema and Transparency. *Sci Rep* **7**, 7227 (2017).
60. Hadrian, K. & Cursiefen, C. The role of lymphatic vessels in corneal fluid homeostasis and wound healing. *J Ophthalmic Inflamm Infect* **14**, 4 (2024).
61. Lee, H.-K., Lee, S.-M. & Lee, D.-I. Corneal Lymphangiogenesis: Current Pathophysiological Understandings and Its Functional Role in Ocular Surface Disease. *Int J Mol Sci* **22**, 11628 (2021).



## Bibliografía

62. Torres, R. M., Merayo-Llodes, J., Jaramillo, M. A. & Galvis, V. Biomecánica de la córnea. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología* **80**, 215–223 (2005).
63. Pinheiro, M. N. *et al.* Corneal integrity after refractive surgery. Effects of radial keratotomy and mini-radial keratotomy. *Ophthalmology* **102**, 297–301 (1995).
64. Comaish, I. F. & Lawless, M. A. Progressive post-LASIK keratectasia: biomechanical instability or chronic disease process? *J Cataract Refract Surg* **28**, 2206–2213 (2002).
65. Wang, J. Q., Zeng, Y. J. & Li, X. Y. Influence of some operational variables on the radial keratotomy operation. *Br J Ophthalmol* **84**, 651–653 (2000).
66. Maurice, D. M. The structure and transparency of the cornea. *J Physiol* **136**, 263–286 (1957).
67. Meek, K. M., Blamires, T., Elliott, G. F., Gyi, T. J. & Nave, C. The organisation of collagen fibrils in the human corneal stroma: a synchrotron X-ray diffraction study. *Curr Eye Res* **6**, 841–846 (1987).
68. Shin, T. J., Vito, R. P., Johnson, L. W. & McCarey, B. E. The distribution of strain in the human cornea. *J Biomech* **30**, 497–503 (1997).
69. Jayasuriya, A. C. *et al.* A study of piezoelectric and mechanical anisotropies of the human cornea. *Biosens Bioelectron* **18**, 381–387 (2003).
70. Müller, L. J., Pels, E. & Vrensen, G. F. The specific architecture of the anterior stroma accounts for maintenance of corneal curvature. *Br J Ophthalmol* **85**, 437–443 (2001).

71. Hollman, K. W. *et al.* Strain imaging of corneal tissue with an ultrasound elasticity microscope. *Cornea* **21**, 68–73 (2002).
72. Marchant, J. K., Zhang, G. & Birk, D. E. Association of type XII collagen with regions of increased stability and keratocyte density in the cornea. *Exp Eye Res* **75**, 683–694 (2002).
73. DelMonte, D. W. & Kim, T. Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg* **37**, 588–598 (2011).
74. Sayers, Z. *et al.* Synchrotron x-ray diffraction study of corneal stroma. *J Mol Biol* **160**, 593–607 (1982).
75. Worthington, C. R. The structure of cornea. *Q Rev Biophys* **17**, 423–451 (1984).
76. Hart, R. W. & Farrell, R. A. Light scattering in the cornea. *J Opt Soc Am* **59**, 766–774 (1969).
77. Benedek, G. B. Theory of transparency of the eye. *Appl Opt* **10**, 459–473 (1971).
78. Feuk, T. On the transparency of the stroma in the mammalian cornea. *IEEE Trans Biomed Eng* **17**, 186–190 (1970).
79. Dutch, J., Quantock, A. J., Smith, V. A. & Meek, K. M. Light Transmission in the Human Cornea as a Function of Position across the Ocular Surface: Theoretical and Experimental Aspects. *Biophys J* **95**, 5092–5099 (2008).
80. Clinical Anatomy and Physiology of the Visual Sy - 9780323711685 | Elsevier Health. *MEA Elsevier Health* <https://www.mea.elsevierhealth.com/clinical-anatomy-and-physiology-of-the-visual-system-9780323711685.html>.
81. *Cornea, 2nd Edition Vol. 1: Fundamentals, Diagnosis and Management.* (Elsevier Mosby, 2005).

## Bibliografía

82. Colina, J. A. D. de la. *Complicaciones de las lentes de contacto*. (Ediciones Díaz de Santos, 1998).
83. Vaiciulienė, R. & Jasinskas, V. Corneal endothelial status in different grades of late spontaneous in-the-bag IOL dislocation. *Int Ophthalmol* **41**, 1625–1634 (2021).
84. Ibrahim, N., Hifny, A., Elhanbaly, R., El-Desoky, S. M. M. & Gaber, W. Morphogenetic events influencing corneal maturation, development, and transparency: Light and electron microscopic study. *Microsc Res Tech* **86**, 539–555 (2023).
85. Beuerman, R. W. & Pedroza, L. Ultrastructure of the human cornea. *Microsc Res Tech* **33**, 320–335 (1996).
86. Srinivas, S. P. Dynamic regulation of barrier integrity of the corneal endothelium. *Optom Vis Sci* **87**, E239-254 (2010).
87. Hogan, M. J., Alvarado, J. A. & Weddell, J. E. *Histology of the Human Eye: An Atlas and Textbook*. (Saunders, 1971).
88. Hirsch, M., Renard, G., Faure, J. P. & Pouliquen, Y. Study of the ultrastructure of the rabbit corneal endothelium by the freeze-fracture technique: apical and lateral junctions. *Exp Eye Res* **25**, 277–288 (1977).
89. Tuft, S. J. & Coster, D. J. The corneal endothelium. *Eye (Lond)* **4** ( Pt 3), 389–424 (1990).
90. Yee, R. W., Matsuda, M., Schultz, R. O. & Edelhauser, H. F. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Curr Eye Res* **4**, 671–678 (1985).

91. Taurone, S. *et al.* Age related changes seen in human cornea in formalin fixed sections and on biomicroscopy in living subjects: A comparison. *Clin Anat* **33**, 245–256 (2020).
92. Bonanno, J. A. Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump. *Exp Eye Res* **95**, 2–7 (2012).
93. Gupta, P. K. *et al.* The corneal endothelium: clinical review of endothelial cell health and function. *J Cataract Refract Surg* **47**, 1218–1226 (2021).
94. Hedbys, B. O., Mishima, S. & Maurice, D. M. The inhibition pressure of the corneal stroma. *Exp Eye Res* **2**, 99–111 (1963).
95. Goebbels, M. & Spitznas, M. Endothelial barrier function after phacoemulsification: a comparison between diabetic and non-diabetic patients. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **229**, 254–257 (1991).
96. Mishima, S. & Maurice, D. M. The effect of normal evaporation on the eye. *Exp Eye Res* **1**, 46–52 (1961).
97. Langham, M. E. & Taylor, I. S. Factors affecting the hydration of the cornea in the excised eye and the living animal. *Br J Ophthalmol* **40**, 321–340 (1956).
98. Gehrsitz, L., Gruber, L. & Harris, J. E. The hydration of the cornea. II. The effect of the intraocular pressure. *Am J Ophthalmol* **42**, 325–329 (1956).
99. Maurice, D. M. The location of the fluid pump in the cornea. *J Physiol* **221**, 43–54 (1972).
100. Zhang, J. *et al.* Successful culture of human transition zone cells. *Clin Exp Ophthalmol* **48**, 689–700 (2020).

## Bibliografía

101. Edelhauser, H. F. The balance between corneal transparency and edema: the Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**, 1754–1767 (2006).
102. Laule, A., Cable, M. K., Hoffman, C. E. & Hanna, C. Endothelial cell population changes of human cornea during life. *Arch Ophthalmol* **96**, 2031–2035 (1978).
103. Mishima, S. Clinical investigations on the corneal endothelium-XXXVIII Edward Jackson Memorial Lecture. *Am J Ophthalmol* **93**, 1–29 (1982).
104. Zheng, T., Le, Q., Hong, J. & Xu, J. Comparison of human corneal cell density by age and corneal location: an in vivo confocal microscopy study. *BMC Ophthalmol* **16**, 109 (2016).
105. Murphy, C., Alvarado, J., Juster, R. & Maglio, M. Prenatal and postnatal cellularity of the human corneal endothelium. A quantitative histologic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **25**, 312–322 (1984).
106. Hollingsworth, J., Perez-Gomez, I., Mutalib, H. A. & Efron, N. A population study of the normal cornea using an in vivo, slit-scanning confocal microscope. *Optom Vis Sci* **78**, 706–711 (2001).
107. Joyce, N. C. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res* **22**, 359–389 (2003).
108. Van den Bogerd, B., Dhuhghaill, S. N., Koppen, C., Tassignon, M.-J. & Zakaria, N. A review of the evidence for in vivo corneal endothelial regeneration. *Surv Ophthalmol* **63**, 149–165 (2018).
109. Hoffer, K. J. Corneal decomposition after corneal endothelium cell count. *Am J Ophthalmol* **87**, 252–253 (1979).

110. Waring, G. O., Bourne, W. M., Edelhauser, H. F. & Kenyon, K. R. The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function. *Ophthalmology* **89**, 531–590 (1982).
111. Flaxman, S. R. *et al.* Global causes of blindness and distance vision impairment 1990–2020: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health* **5**, e1221–e1234 (2017).
112. Bourne, R. *et al.* Trends in prevalence of blindness and distance and near vision impairment over 30 years: an analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet Global Health* **9**, e130–e143 (2021).
113. Statistical Report. *EBAA*  
<https://restoresight.org/members/publications/statistical-report/>.
114. Organización Nacional de Trasplantes. Memoria de Actividad de Donación e Implante de Trejidos 2022. (2023).
115. Gain, P. *et al.* Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking. *JAMA Ophthalmol* **134**, 167–173 (2016).
116. Thuret, G. *et al.* One threat, different answers: the impact of COVID-19 pandemic on cornea donation and donor selection across Europe. *British Journal of Ophthalmology* **106**, 312–318 (2022).
117. Organización Nacional de Trasplantes. Plan Nacional de Córneas. (2016).
118. Jefatura del Estado. *Ley 30/1979, de 27 de Octubre, Sobre Extracción y Trasplante de Órganos*. vol. BOE-A-1979-26445 25742–25743 (1979).
119. Zirm, E. K. Eine erfolgreiche totale Keratoplastik (A successful total keratoplasty). 1906. *Refract Corneal Surg* **5**, 258–261 (1989).

## Bibliografía

120. Castroviejo, R. Keratoplasty: An Historical and Experimental Study, Including A New Method Part I. *American Journal of Ophthalmology* **15**, 825–838 (1932).
121. Castroviejo, R. Keratoplasty: An historical and experimental study, including a new method, Part II. *American Journal of Ophthalmology* **15**, 905–916 (1932).
122. Mannis, M. J., Zadnik, K., Miller, M. R. & Marquez, M. Preoperative risk factors for surface disease after penetrating keratoplasty. *Cornea* **16**, 7–11 (1997).
123. Meyer, R. F. & Bobb, K. C. Corneal epithelium in penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol* **90**, 142–147 (1980).
124. Christo, C. G., van Rooij, J., Geerards, A. J., Remeijer, L. & Beekhuis, W. H. Suture-related complications following keratoplasty: a 5-year retrospective study. *Cornea* **20**, 816–819 (2001).
125. Forstot, S. L., Abel, R. & Binder, P. S. Bacterial endophthalmitis following suture removal after penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol* **80**, 509–512 (1975).
126. Price, F. W., Whitson, W. E., Ahad, K. A. & Tavakkoli, H. Suprachoroidal hemorrhage in penetrating keratoplasty. *Ophthalmic Surg* **25**, 521–525 (1994).
127. Purcell, J. J., Krachmer, J. H., Doughman, D. J. & Bourne, W. M. Expulsive hemorrhage in penetrating keratoplasty. *Ophthalmology* **89**, 41–43 (1982).

128. Mannis, M. J. *et al.* The Effect of Donor Age on Penetrating Keratoplasty for Endothelial Disease: Graft Survival after 10 Years in the Cornea Donor Study. *Ophthalmology* **120**, 2419–2427 (2013).
129. Thompson, R. W., Price, M. O., Bowers, P. J. & Price, F. W. Long-term graft survival after penetrating keratoplasty. *Ophthalmology* **110**, 1396–1402 (2003).
130. Melles, G. R. *et al.* A surgical technique for posterior lamellar keratoplasty. *Cornea* **17**, 618–626 (1998).
131. Melles, G. R., Lander, F., Beekhuis, W. H., Remeijer, L. & Binder, P. S. Posterior lamellar keratoplasty for a case of pseudophakic bullous keratopathy. *Am J Ophthalmol* **127**, 340–341 (1999).
132. Terry, M. A. & Ousley, P. J. Deep lamellar endothelial keratoplasty in the first United States patients: early clinical results. *Cornea* **20**, 239–243 (2001).
133. Dunker, S. L. *et al.* Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty versus Ultrathin Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty: A Multicenter Randomized Controlled Clinical Trial. *Ophthalmology* **127**, 1152–1159 (2020).
134. Birbal, R. S. *et al.* Five-Year Graft Survival and Clinical Outcomes of 500 Consecutive Cases After Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. *Cornea* **39**, 290 (2020).
135. Hos, D. *et al.* Immune reactions after modern lamellar (DALK, DSAEK, DMEK) versus conventional penetrating corneal transplantation. *Progress in Retinal and Eye Research* **73**, 100768 (2019).



## Bibliográfia

136. Heindl, L. M., Hofmann-Rummelt, C., Schlötzer-Schrehardt, U., Kruse, F. E. & Cursiefen, C. Histologic analysis of descemet stripping in posterior lamellar keratoplasty. *Arch Ophthalmol* **126**, 461–464 (2008).
137. Melles, G. R. J., Wijdh, R. H. J. & Nieuwendaal, C. P. A technique to excise the descemet membrane from a recipient cornea (descemetorhexis). *Cornea* **23**, 286–288 (2004).
138. Ahmed, K. A. *et al.* Host and graft thickness after Descemet stripping endothelial keratoplasty for Fuchs endothelial dystrophy. *Am J Ophthalmol* **150**, 490-497.e2 (2010).
139. Melles, G. R. J., Ong, T. S., Ververs, B. & van der Wees, J. Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK). *Cornea* **25**, 987–990 (2006).
140. Shinton, A. J. *et al.* Impact of graft thickness on visual acuity after Descemet's stripping endothelial keratoplasty. *Br J Ophthalmol* **96**, 246–249 (2012).
141. Dapena, I., Ham, L. & Melles, G. R. J. Endothelial keratoplasty: DSEK/DSAEK or DMEK--the thinner the better? *Curr Opin Ophthalmol* **20**, 299–307 (2009).
142. Dunker, S. L. *et al.* Practice patterns of corneal transplantation in Europe: first report by the European Cornea and Cell Transplantation Registry. *Journal of Cataract & Refractive Surgery* **47**, 865 (2021).
143. Ong, H. S., Ang, M. & Mehta, J. Evolution of therapies for the corneal endothelium: past, present and future approaches. *Br J Ophthalmol* **105**, 454–467 (2021).

144. Lie, J. T., Lam, F. C., Beek, E. A. G., Wees, J. van der & Melles, G. R. Graft preparation for hemi-Descemet membrane endothelial keratoplasty (hemi-DMEK). *British Journal of Ophthalmology* **100**, 420–424 (2016).
145. Zygoura, V. *et al.* Quarter-Descemet membrane endothelial keratoplasty (Quarter-DMEK) for Fuchs endothelial corneal dystrophy: 6 months clinical outcome. *British Journal of Ophthalmology* **102**, 1425–1430 (2018).
146. Arbelaez, J. G., Price, M. O. & Price, F. W. Long-term follow-up and complications of stripping descemet membrane without placement of graft in eyes with Fuchs endothelial dystrophy. *Cornea* **33**, 1295–1299 (2014).
147. Borkar, D. S., Veldman, P. & Colby, K. A. Treatment of Fuchs Endothelial Dystrophy by Descemet Stripping Without Endothelial Keratoplasty. *Cornea* **35**, 1267–1273 (2016).
148. Shah, R. D., Randleman, J. B. & Grossniklaus, H. E. Spontaneous Corneal Clearing after Descemet's Stripping without Endothelial Replacement. *Ophthalmology* **119**, 256–260 (2012).
149. Heinzlmann, S., Böhringer, D., Maier, P. C. & Reinhard, T. Correlation between visual acuity and interface reflectivity measured by pentacam following DSAEK. *Acta Ophthalmol* **92**, e1-4 (2014).
150. McLaren, J. W. & Patel, S. V. Modeling the effect of forward scatter and aberrations on visual acuity after endothelial keratoplasty. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**, 5545–5551 (2012).

## Bibliográfia

151. Dirisamer, M. *et al.* Identifying causes for poor visual outcome after DSEK/DSAEK following secondary DMEK in the same eye. *Acta Ophthalmol* **91**, 131–139 (2013).
152. Tan, D. T. H., Dart, J. K. G., Holland, E. J. & Kinoshita, S. Corneal transplantation. *Lancet* **379**, 1749–1761 (2012).
153. Patel, S. V. Graft survival and endothelial outcomes in the new era of endothelial keratoplasty. *Exp Eye Res* **95**, 40–47 (2012).
154. Brockmann, T. *et al.* Clinicopathology of graft detachment after Descemet's membrane endothelial keratoplasty. *Acta Ophthalmol* **92**, e556-561 (2014).
155. Brockmann, T. *et al.* Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty for Graft Failure After Descemet Stripping Endothelial Keratoplasty: Clinical Results and Histopathologic Findings. *JAMA Ophthalmol* **133**, 813–819 (2015).
156. Deng, S. X. *et al.* Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty: Safety and Outcomes: A Report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* **125**, 295–310 (2018).
157. Brockmann, T. *et al.* Predictive Factors for Clinical Outcomes after Primary Descemet's Membrane Endothelial Keratoplasty for Fuchs' Endothelial Dystrophy. *Curr Eye Res* **44**, 147–153 (2019).
158. Konomi, K., Zhu, C., Harris, D. & Joyce, N. C. Comparison of the proliferative capacity of human corneal endothelial cells from the central and peripheral areas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 4086–4091 (2005).

159. Mimura, T. & Joyce, N. C. Replication competence and senescence in central and peripheral human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**, 1387–1396 (2006).
160. Yam, G. H.-F. *et al.* Characterization of Human Transition Zone Reveals a Putative Progenitor-Enriched Niche of Corneal Endothelium. *Cells* **8**, 1244 (2019).
161. Català, P. *et al.* Approaches for corneal endothelium regenerative medicine. *Prog Retin Eye Res* **87**, 100987 (2022).
162. Roy, O., Beaulieu Leclerc, V., Bourget, J.-M., Thériault, M. & Proulx, S. Understanding the Process of Corneal Endothelial Morphological Change In Vitro. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **56**, 1228–1237 (2015).
163. Baum, J. L., Niedra, R., Davis, C. & Yue, B. Y. J. T. Mass Culture of Human Corneal Endothelial Cells. *Archives of Ophthalmology* **97**, 1136–1140 (1979).
164. Tripathi, R. C. & Tripathi, B. J. Human trabecular endothelium, corneal endothelium, keratocytes, and scleral fibroblasts in primary cell culture. A comparative study of growth characteristics, morphology, and phagocytic activity by light and scanning electron microscopy. *Experimental Eye Research* **35**, 611–624 (1982).
165. Yue, B. Y., Sugar, J., Gilboy, J. E. & Elvart, J. L. Growth of human corneal endothelial cells in culture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **30**, 248–253 (1989).

## Bibliografía

166. Fabricant, R. N., Alpar, A. J., Centifanto, Y. M. & Kaufman, H. E. Epidermal Growth Factor Receptors on Corneal Endothelium. *Archives of Ophthalmology* **99**, 305–308 (1981).
167. Engelmann, K., Böhnke, M. & Friedl, P. Isolation and long-term cultivation of human corneal endothelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **29**, 1656–1662 (1988).
168. Engelmann, K. & Friedl, P. Optimization of culture conditions for human corneal endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* **25**, 1065–1072 (1989).
169. Engelmann, K. & Friedl, P. Growth of human corneal endothelial cells in a serum-reduced medium. *Cornea* **14**, 62–70 (1995).
170. Amano, S., Mimura, T., Yamagami, S., Osakabe, Y. & Miyata, K. Properties of Corneas Reconstructed with Cultured Human Corneal Endothelial Cells and Human Corneal Stroma. *Jpn J Ophthalmol* **49**, 448–452 (2005).
171. Mimura, T. *et al.* Transplantation of corneas reconstructed with cultured adult human corneal endothelial cells in nude rats. *Experimental Eye Research* **79**, 231–237 (2004).
172. Mimura, T. *et al.* Cultured Human Corneal Endothelial Cell Transplantation with a Collagen Sheet in a Rabbit Model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **45**, 2992–2997 (2004).
173. Mimura, T., Yokoo, S., Araie, M., Amano, S. & Yamagami, S. Treatment of Rabbit Bullous Keratopathy with Precursors Derived from Cultured Human Corneal Endothelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **46**, 3637–3644 (2005).

174. Chen, K. H., Azar, D. & Joyce, N. C. Transplantation of adult human corneal endothelium ex vivo: a morphologic study. *Cornea* **20**, 731–737 (2001).
175. Joyce, N. C. & Zhu, C. “Chris. Human Corneal Endothelial Cell Proliferation: Potential for Use in Regenerative Medicine. *Cornea* **23**, S8 (2004).
176. Li, W. *et al.* A Novel Method of Isolation, Preservation, and Expansion of Human Corneal Endothelial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **48**, 614–620 (2007).
177. Peh, G. S. L., Toh, K.-P., Wu, F.-Y., Tan, D. T. & Mehta, J. S. Cultivation of human corneal endothelial cells isolated from paired donor corneas. *PLoS One* **6**, e28310 (2011).
178. Zhu, C. & Joyce, N. C. Proliferative response of corneal endothelial cells from young and older donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 1743–1751 (2004).
179. Smeringaiova, I., Utheim, T. P. & Jirsova, K. Ex vivo expansion and characterization of human corneal endothelium for transplantation: a review. *Stem Cell Res Ther* **12**, 554 (2021).
180. Jäckel, T., Knels, L., Valtink, M., Funk, R. H. W. & Engelmann, K. Serum-free corneal organ culture medium (SFM) but not conventional minimal essential organ culture medium (MEM) protects human corneal endothelial cells from apoptotic and necrotic cell death. *Br J Ophthalmol* **95**, 123–130 (2011).
181. Peh, G. S. L. *et al.* Propagation of human corneal endothelial cells: a novel dual media approach. *Cell Transplant* **24**, 287–304 (2015).

## Bibliográfia

182. Bartakova, A., Kuzmenko, O., Alvarez-Delfin, K., Kunzevitzky, N. J. & Goldberg, J. L. A Cell Culture Approach to Optimized Human Corneal Endothelial Cell Function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **59**, 1617–1629 (2018).
183. Frausto, R. F. *et al.* Phenotypic and functional characterization of corneal endothelial cells during in vitro expansion. *Sci Rep* **10**, 7402 (2020).
184. Parekh, M. *et al.* Passaging capability of human corneal endothelial cells derived from old donors with and without accelerating cell attachment. *Experimental Eye Research* **189**, 107814 (2019).
185. Parekh, M. *et al.* Human corneal endothelial cells from older donors can be cultured and passaged on cell-derived extracellular matrix. *Acta Ophthalmologica* **99**, e512–e522 (2021).
186. Shima, N., Kimoto, M., Yamaguchi, M. & Yamagami, S. Increased Proliferation and Replicative Lifespan of Isolated Human Corneal Endothelial Cells with l-Ascorbic acid 2-phosphate. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **52**, 8711–8717 (2011).
187. Okumura, N. *et al.* Inhibition of TGF- $\beta$  Signaling Enables Human Corneal Endothelial Cell Expansion In Vitro for Use in Regenerative Medicine. *PLOS ONE* **8**, e58000 (2013).
188. Kinoshita, S. *et al.* Injection of Cultured Cells with a ROCK Inhibitor for Bullous Keratopathy. *N. Engl. J. Med.* **378**, 995–1003 (2018).
189. Peh, G. S. L. *et al.* The effects of Rho-associated kinase inhibitor Y-27632 on primary human corneal endothelial cells propagated using a dual media approach. *Sci Rep* **5**, 9167 (2015).

190. Pipparelli, A. *et al.* ROCK Inhibitor Enhances Adhesion and Wound Healing of Human Corneal Endothelial Cells. *PLOS ONE* **8**, e62095 (2013).
191. Vianna, L. M. M. *et al.* Use of human serum for human corneal endothelial cell culture. *Br J Ophthalmol* **99**, 267–271 (2015).
192. Thieme, D., Reuland, L., Lindl, T., Kruse, F. & Fuchsluger, T. Optimized human platelet lysate as novel basis for a serum-, xeno-, and additive-free corneal endothelial cell and tissue culture. *J Tissue Eng Regen Med* **12**, 557–564 (2018).
193. Mishan, M. A. *et al.* Potential Effect of Human Platelet Lysate on in vitro Expansion of Human Corneal Endothelial Cells Compared with Y-27632 ROCK Inhibitor. *J Ophthalmic Vis Res* **16**, 349–356 (2021).
194. Wang, T.-J. *et al.* Comparison of three human platelet lysates used as supplements for in vitro expansion of corneal endothelium cells. *Transfus Apher Sci* **56**, 769–773 (2017).
195. Petsoglou, C. *et al.* Effects of human platelet lysate on the growth of cultured human corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* **208**, 108613 (2021).
196. Feizi, S. *et al.* Effect of amniotic fluid on the in vitro culture of human corneal endothelial cells. *Experimental Eye Research* **122**, 132–140 (2014).
197. Nakahara, M. *et al.* Corneal Endothelial Expansion Promoted by Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived Conditioned Medium. *PLOS ONE* **8**, e69009 (2013).



## Bibliográfia

198. Sundin, M. *et al.* No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica* **92**, 1208–1215 (2007).
199. EMA. Use of bovine serum in the manufacture human biological medicinal products - Scientific guideline. *European Medicines Agency* <https://www.ema.europa.eu/en/use-bovine-serum-manufacture-human-biological-medicinal-products-scientific-guideline> (2018).
200. Peh, G. S. L. *et al.* Optimization of human corneal endothelial cell culture: density dependency of successful cultures in vitro. *BMC Res Notes* **6**, 176 (2013).
201. Choi, J. S. *et al.* Factors affecting successful isolation of human corneal endothelial cells for clinical use. *Cell Transplant* **23**, 845–854 (2014).
202. Miyata, K. *et al.* Effect of Donor Age on Morphologic Variation of Cultured Human Corneal Endothelial Cells. *Cornea* **20**, 59 (2001).
203. He, J., Kakazu, A. H., Bazan, N. G. & Bazan, H. E. P. Aspirin-Triggered Lipoxin A4 (15-epi-LXA4) Increases the Endothelial Viability of Human Corneas Stored in Optisol-GS. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* **27**, 235–241 (2011).
204. Joyce, N. C., Zhu, C. C. & Harris, D. L. Relationship among Oxidative Stress, DNA Damage, and Proliferative Capacity in Human Corneal Endothelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **50**, 2116–2122 (2009).

205. Joyce, N. C., Harris, D. L. & Zhu, C. C. Age-Related Gene Response of Human Corneal Endothelium to Oxidative Stress and DNA Damage. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **52**, 1641–1649 (2011).
206. Chng, Z. *et al.* High Throughput Gene Expression Analysis Identifies Reliable Expression Markers of Human Corneal Endothelial Cells. *PLOS ONE* **8**, e67546 (2013).
207. Frausto, R. F., Le, D. J. & Aldave, A. J. Transcriptomic Analysis of Cultured Corneal Endothelial Cells as a Validation for Their Use in Cell Replacement Therapy. *Cell Transplant* **25**, 1159–1176 (2016).
208. Parekh, M., Ahmad, S., Ruzza, A. & Ferrari, S. Human Corneal Endothelial Cell Cultivation From Old Donor Corneas With Forced Attachment. *Sci Rep* **7**, 142 (2017).
209. Parekh, M. *et al.* Effects of corneal preservation conditions on human corneal endothelial cell culture. *Experimental Eye Research* **179**, 93–101 (2019).
210. Parekh, M. *et al.* Culturing Discarded Peripheral Human Corneal Endothelial Cells From the Tissues Deemed for Preloaded DMEK Transplants. *Cornea* **38**, 1175–1181 (2019).
211. Parekh, M. *et al.* Increasing Donor Endothelial Cell Pool by Culturing Cells from Discarded Pieces of Human Donor Corneas for Regenerative Treatments. *J Ophthalmol* **2019**, 2525384 (2019).

## Bibliografía

212. Van den Bogerd, B. *et al.* Corneal Endothelial Cells Over the Past Decade: Are We Missing the Mark(er)? *Translational Vision Science & Technology* **8**, 13 (2019).
213. Okumura, N. *et al.* Cell Surface Markers of Functional Phenotypic Corneal Endothelial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **55**, 7610–7618 (2014).
214. He, Z. *et al.* 3D map of the human corneal endothelial cell. *Sci Rep* **6**, 29047 (2016).
215. Zucco, F. *et al.* An inter-laboratory study to evaluate the effects of medium composition on the differentiation and barrier function of Caco-2 cell lines. *Altern Lab Anim* **33**, 603–618 (2005).
216. Srinivasan, B. *et al.* TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom* **20**, 107–126 (2015).
217. Fischbarg, J. & Lim, J. J. Role of cations, anions and carbonic anhydrase in fluid transport across rabbit corneal endothelium. *The Journal of Physiology* **241**, 647–675 (1974).
218. Montalvo-Parra, M. D. *et al.* Experimental design of a culture approach for corneal endothelial cells of New Zealand white rabbit. *Heliyon* **6**, e05178 (2020).
219. Loiseau, A., Raïche-Marcoux, G., Maranda, C., Bertrand, N. & Boisselier, E. Animal Models in Eye Research: Focus on Corneal Pathologies. *Int J Mol Sci* **24**, 16661 (2023).

220. Park, S. *et al.* Animal models of corneal endothelial dysfunction to facilitate development of novel therapies. *Ann Transl Med* **9**, 1271 (2021).
221. Bostan, C. *et al.* In Vivo Functionality of a Corneal Endothelium Transplanted by Cell-Injection Therapy in a Feline Model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **57**, 1620–1634 (2016).
222. Faye, P. A. *et al.* Focus on cell therapy to treat corneal endothelial diseases. *Experimental Eye Research* **204**, 108462 (2021).
223. Koizumi, N., Okumura, N. & Kinoshita, S. Development of new therapeutic modalities for corneal endothelial disease focused on the proliferation of corneal endothelial cells using animal models. *Experimental Eye Research* **95**, 60–67 (2012).
224. Rolev, K., Coussons, P., King, L. & Rajan, M. Experimental models of corneal endothelial cell therapy and translational challenges to clinical practice. *Exp Eye Res* **188**, 107794 (2019).
225. Ministerio de la Presidencia. *Real Decreto 53/2013, de 1 de Febrero, Por El Que Se Establecen Las Normas Básicas Aplicables Para La Protección de Los Animales Utilizados En Experimentación y Otros Fines Científicos, Incluyendo La Docencia.* vol. BOE-A-2013-1337 11370–11421 (2013).
226. Joyce, N. C., Harris, D. L., Markov, V., Zhang, Z. & Saitta, B. Potential of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells to heal damaged corneal endothelium. *Mol Vis* **18**, 547–564 (2012).
227. Guindolet, D. *et al.* Storage of Porcine Cornea in an Innovative Bioreactor. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **58**, 5907–5917 (2017).

## Bibliográfia

228. Aboalchamat, B., Engelmann, K., Böhnke, M., Eggli, P. & Bednarz, J. Morphological and Functional Analysis of Immortalized Human Corneal Endothelial Cells after Transplantation. *Experimental Eye Research* **69**, 547–553 (1999).
229. Rolev, K., O'Donovan, D. G., Coussons, P., King, L. & Rajan, M. S. Feasibility Study of Human Corneal Endothelial Cell Transplantation Using an In Vitro Human Corneal Model. *Cornea* **37**, 778 (2018).
230. Schlötzer-Schrehardt, U. *et al.* Potential Functional Restoration of Corneal Endothelial Cells in Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy by ROCK Inhibitor (Ripasudil). *Am J Ophthalmol* **224**, 185–199 (2021).
231. Patel, S. V., Bachman, L. A., Hann, C. R., Bahler, C. K. & Fautsch, M. P. Human Corneal Endothelial Cell Transplantation in a Human Ex Vivo Model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **50**, 2123–2131 (2009).
232. K, E., D, D., J, D. & M, B. [Endothelial cell transplantation in a model]. *Der Ophthalmologe: Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* **90**, (1993).
233. K, E., D, D. & M, B. Transplantation of adult human or porcine corneal endothelial cells onto human recipients in vitro. Part I: Cell culturing and transplantation procedure. *Cornea* **18**, (1999).
234. Böhnke, M., Eggli, P. & Engelmann, K. Transplantation of cultured adult human or porcine corneal endothelial cells onto human recipients in vitro. Part II: Evaluation in the scanning electron microscope. *Cornea* **18**, 207–213 (1999).

235. Hanson, C. *et al.* Transplanting embryonic stem cells onto damaged human corneal endothelium. *World J Stem Cells* **9**, 127–132 (2017).
236. Chen, X. *et al.* Directed Differentiation of Human Corneal Endothelial Cells From Human Embryonic Stem Cells by Using Cell-Conditioned Culture Media. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **59**, 3028–3036 (2018).
237. Chen, P. *et al.* Treatment with retinoic acid and lens epithelial cell-conditioned medium in vitro directed the differentiation of pluripotent stem cells towards corneal endothelial cell-like cells. *Experimental and Therapeutic Medicine* **9**, 351–360 (2015).
238. Ali, M., Khan, S. Y., Kabir, F., Gottsch, J. D. & Riazuddin, S. A. Comparative transcriptome analysis of hESC- and iPSC-derived corneal endothelial cells. *Experimental Eye Research* **176**, 252–257 (2018).
239. Patel, S., Alió, J. L. & Pérez-Santonja, J. J. Refractive Index Change in Bovine and Human Corneal Stroma before and after LASIK: A Study of Untreated and Re-treated Corneas Implicating Stromal Hydration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **45**, 3523–3530 (2004).
240. Lee, E. J., Kasper, F. K. & Mikos, A. G. Biomaterials for tissue engineering. *Ann Biomed Eng* **42**, 323–337 (2014).
241. Ruberti, J. W., Sinha Roy, A. & Roberts, C. J. Corneal biomechanics and biomaterials. *Annu Rev Biomed Eng* **13**, 269–295 (2011).
242. Vázquez Moreno, N. Tesis doctoral: Desarrollo de endotelio corneal mediante Ingeniería Tisular para empleo en trasplante. (2013).

## Bibliografía

243. Peh, G. S. L. *et al.* Regulatory Compliant Tissue-Engineered Human Corneal Endothelial Grafts Restore Corneal Function of Rabbits with Bullous Keratopathy. *Sci Rep* **7**, 14149 (2017).
244. Honda, N., Mimura, T., Usui, T. & Amano, S. Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty Using Cultured Corneal Endothelial Cells in a Rabbit Model. *Archives of Ophthalmology* **127**, 1321–1326 (2009).
245. Fan, T. *et al.* Establishment of a continuous untransfected human corneal endothelial cell line and its biocompatibility to denuded amniotic membrane. *Mol Vis* **17**, 469–480 (2011).
246. Ishino, Y. *et al.* Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 800–806 (2004).
247. Kimoto, M. *et al.* Development of a Bioengineered Corneal Endothelial Cell Sheet to Fit the Corneal Curvature. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **55**, 2337–2343 (2014).
248. Kopsachilis, N., Tsinopoulos, I., Tourtas, T., Kruse, F. E. & Luessen, U. W. Descemet's membrane substrate from human donor lens anterior capsule. *Clinical & Experimental Ophthalmology* **40**, 187–194 (2012).
249. Vázquez, N. *et al.* Keratin-chitosan membranes as scaffold for tissue engineering of human cornea. *Histol Histopathol* **30**, 813–821 (2015).
250. Spinozzi, D. *et al.* Evaluation of the Suitability of Biocompatible Carriers as Artificial Transplants Using Cultured Porcine Corneal Endothelial Cells. *Curr Eye Res* **44**, 243–249 (2019).

251. Vázquez, N. *et al.* Silk Fibroin Films for Corneal Endothelial Regeneration: Transplant in a Rabbit Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **58**, 3357–3365 (2017).
252. Vázquez, N. *et al.* Human Bone Derived Collagen for the Development of an Artificial Corneal Endothelial Graft. In Vivo Results in a Rabbit Model. *PLoS One* **11**, e0167578 (2016).
253. Chen, J. *et al.* Electrospun nanofibrous SF/P(LLA-CL) membrane: a potential substratum for endothelial keratoplasty. *International Journal of Nanomedicine* **10**, 3337–3350 (2015).
254. Hadlock, T., Singh, S., Vacanti, J. P. & McLaughlin, B. J. Ocular cell monolayers cultured on biodegradable substrates. *Tissue Eng* **5**, 187–196 (1999).
255. Astete, C. E. & Sabliov, C. M. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *J Biomater Sci Polym Ed* **17**, 247–289 (2006).
256. Ozcelik, B. *et al.* Biodegradable and Biocompatible Poly(Ethylene Glycol)-based Hydrogel Films for the Regeneration of Corneal Endothelium. *Advanced Healthcare Materials* **3**, 1496–1507 (2014).
257. Wang, T.-J., Wang, I.-J., Lu, J.-N. & Young, T.-H. Novel chitosan-polycaprolactone blends as potential scaffold and carrier for corneal endothelial transplantation. *Mol Vis* **18**, 255–264 (2012).
258. Young, T.-H., Wang, I.-J., Hu, F.-R. & Wang, T.-J. Fabrication of a bioengineered corneal endothelial cell sheet using chitosan/polycaprolactone blend membranes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **116**, 403–410 (2014).



## Bibliográfia

259. Mimura, T. *et al.* Necessary prone position time for human corneal endothelial precursor transplantation in a rabbit endothelial deficiency model. *Curr Eye Res* **32**, 617–623 (2007).
260. Okumura, N. *et al.* ROCK inhibitor converts corneal endothelial cells into a phenotype capable of regenerating in vivo endothelial tissue. *Am J Pathol* **181**, 268–277 (2012).
261. Mimura, T. *et al.* Magnetic attraction of iron-endocytosed corneal endothelial cells to Descemet's membrane. *Experimental Eye Research* **76**, 745–751 (2003).
262. Moysidis, S. N. *et al.* Magnetic field-guided cell delivery with nanoparticle-loaded human corneal endothelial cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **11**, 499–509 (2015).
263. Okumura, N., Kinoshita, S. & Koizumi, N. Cell-Based Approach for Treatment of Corneal Endothelial Dysfunction. *Cornea* **33**, S37 (2014).
264. Peh, G. S. L. *et al.* Functional Evaluation of Two Corneal Endothelial Cell-Based Therapies: Tissue-Engineered Construct and Cell Injection. *Sci Rep* **9**, 6087 (2019).
265. Okumura, N. *et al.* Feasibility of cell-based therapy combined with descemetorhexis for treating Fuchs endothelial corneal dystrophy in rabbit model. *PLoS One* **13**, e0191306 (2018).
266. Numa, K. *et al.* Five-Year Follow-up of First 11 Patients Undergoing Injection of Cultured Corneal Endothelial Cells for Corneal Endothelial Failure. *Ophthalmology* **128**, 504–514 (2021).

267. McGarry, J. Aurion Biotech Receives Approval from Japan's PMDA for New Drug Application. *Aurion Biotech* <https://aurionbiotech.com/aurion-biotech-receives-approval-from-japans-pmda-for-new-drug-application/> (2023).
268. BOE.es - DOUE-L-2007-82262 Reglamento (CE) nº 1394/2007 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 13 de noviembre de 2007, sobre medicamentos de terapia avanzada y por el que se modifican la Directiva 2001/83/CE y el Reglamento (CE) nº 726/2004. <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2007-82262>.
269. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. *Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de Julio, Por El Que Se Aprueba El Texto Refundido de La Ley de Garantías y Uso Racional de Los Medicamentos y Productos Sanitarios*. vol. BOE-A-2015-8343 62935–63030 (2015).
270. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. *Real Decreto 477/2014, de 13 de Junio, Por El Que Se Regula La Autorización de Medicamentos de Terapia Avanzada de Fabricación No Industrial*. vol. BOE-A-2014-6277 45068–45078 (2014).
271. Jefatura del Estado. *Ley 29/2006, de 26 de Julio, de Garantías y Uso Racional de Los Medicamentos y Productos Sanitarios*. vol. BOE-A-2006-13554 28122–28165 (2006).
272. Guía de Normas de Correcta Fabricación. *Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios* <https://www.aemps.gob.es/industria-farmaceutica/guia-de-normas-de-correcta-fabricacion/> (2019).

## Bibliografía

273. Research, C. for B. E. and. CMC and GMP Guidances. *FDA* (2023).
274. ICH Official web site : ICH. <https://www.ich.org/>.
275. Anitua, E. *et al.* Autologous serum and plasma rich in growth factors in ophthalmology: preclinical and clinical studies. *Acta Ophthalmol* **93**, e605-614 (2015).
276. Tokuda, Y. *et al.* Transcriptome dataset of human corneal endothelium based on ribosomal RNA-depleted RNA-Seq data. *Sci Data* **7**, 407 (2020).
277. World report on vision. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241516570>.
278. Eye examination in infants, children, and young adults by pediatricians: Organizational principles to guide and define the child health care system and/or improve the health of all children. *Ophthalmology* **110**, 860–865 (2003).
279. Grau, E., Horn, F., Nixdorff, U. & Michelson, G. OCT and IOP findings in a healthy worker cohort: results from a teleophthalmic study in occupational medicine. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **257**, 2571–2578 (2019).
280. Gupta, N. *et al.* Prevalence of corneal diseases in the rural Indian population: the Corneal Opacity Rural Epidemiological (CORE) study. *Br J Ophthalmol* **99**, 147–152 (2015).
281. Bourne, W. M. Clinical estimation of corneal endothelial pump function. *Trans Am Ophthalmol Soc* **96**, 229–239; discussion 239-242 (1998).
282. Senoo, T. & Joyce, N. C. Cell cycle kinetics in corneal endothelium from old and young donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**, 660–667 (2000).

283. Joyce, N. C., Harris, D. L. & Mello, D. M. Mechanisms of mitotic inhibition in corneal endothelium: contact inhibition and TGF-beta2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 2152–2159 (2002).
284. Moshirfar, M., Thomson, A. C. & Ronquillo, Y. Corneal Endothelial Transplantation. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2024).
285. Rajan, M. S. Surgical strategies to improve visual outcomes in corneal transplantation. *Eye (Lond)* **28**, 196–201 (2014).
286. Ruberti, J. W. & Zieske, J. D. Prelude to corneal tissue engineering - gaining control of collagen organization. *Prog Retin Eye Res* **27**, 549–577 (2008).
287. Okumura, N. *et al.* The ROCK inhibitor eye drop accelerates corneal endothelium wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **54**, 2493–2502 (2013).
288. Okumura, N. *et al.* Involvement of cyclin D and p27 in cell proliferation mediated by ROCK inhibitors Y-27632 and Y-39983 during corneal endothelium wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **55**, 318–329 (2014).
289. Okumura, N. *et al.* Enhancement of corneal endothelium wound healing by Rho-associated kinase (ROCK) inhibitor eye drops. *Br J Ophthalmol* **95**, 1006–1009 (2011).
290. Okumura, N. *et al.* Effect of the Rho Kinase Inhibitor Y-27632 on Corneal Endothelial Wound Healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **56**, 6067–6074 (2015).
291. Okumura, N. *et al.* Rho kinase inhibitor enables cell-based therapy for corneal endothelial dysfunction. *Sci Rep* **6**, 26113 (2016).

## Bibliografía

292. Wongvisavavit, R., Parekh, M., Ahmad, S. & Daniels, J. T. Challenges in corneal endothelial cell culture. *Regen Med* **16**, 871–891.
293. Thériault, M., Gendron, S. P., Brunette, I., Rochette, P. J. & Proulx, S. Function-Related Protein Expression in Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy Cells and Tissue Models. *Am J Pathol* **188**, 1703–1712 (2018).
294. Kaye, G. I., Sibley, R. C. & Hoefle, F. B. Recent studies on the nature and function of the corneal endothelial barrier. *Experimental Eye Research* **15**, 585–613 (1973).
295. Anitua, E. *et al.* High-throughput proteomic characterization of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret)-derived fibrin clot interactome. *J Tissue Eng Regen Med* **9**, E1-12 (2015).
296. Anitua, E. *et al.* Proteomic Characterization of Plasma Rich in Growth Factors and Undiluted Autologous Serum. *Int J Mol Sci* **22**, 12176 (2021).
297. Berisa-Prado, S. *et al.* Mini Cleanroom for the Manufacture of Advanced Therapy Medicinal Products (ATMP): Bioengineered Corneal Epithelium. *Pharmaceutics* **13**, 1282 (2021).
298. Anitua, E. *et al.* PRGF exerts more potent proliferative and anti-inflammatory effects than autologous serum on a cell culture inflammatory model. *Exp Eye Res* **151**, 115–121 (2016).
299. Anitua, E. *et al.* Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) reduces neuropathologic hallmarks and improves cognitive functions in an Alzheimer's disease mouse model. *Neurobiology of Aging* **35**, 1582–1595 (2014).

300. López-Plandolit, S., Morales, M.-C., Freire, V., Etxebarria, J. & Durán, J. A. Plasma rich in growth factors as a therapeutic agent for persistent corneal epithelial defects. *Cornea* **29**, 843–848 (2010).
301. López-Plandolit, S., Morales, M.-C., Freire, V., Grau, A. E. & Durán, J. A. Efficacy of plasma rich in growth factors for the treatment of dry eye. *Cornea* **30**, 1312–1317 (2011).
302. Anitua, E. *et al.* Development and Optimization of Freeze-Dried Eye Drops Derived From Plasma Rich in Growth Factors Technology. *Transl Vis Sci Technol* **9**, 35 (2020).
303. Anitua, E. *et al.* Progress in the use of plasma rich in growth factors in ophthalmology: from ocular surface to ocular fundus. *Expert Opin Biol Ther* **22**, 31–45 (2022).
304. Anitua, E. *et al.* Plasma rich in growth factors (PRGF) eye drops stimulates scarless regeneration compared to autologous serum in the ocular surface stromal fibroblasts. *Exp Eye Res* **135**, 118–126 (2015).
305. Bai, H. *et al.* The Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase  $\beta$ 1 subunit regulates epithelial tight junctions via MRCK $\alpha$ . *JCI Insight* **6**, e134881.
306. Sugi, K., Musch, M. W., Chang, E. B. & Field, M. Inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase by interferon  $\gamma$  down-regulates intestinal epithelial transport and barrier function. *Gastroenterology* **120**, 1393–1403 (2001).
307. Strauss, R. E. & Gourdie, R. G. Cx43 and the Actin Cytoskeleton: Novel Roles and Implications for Cell-Cell Junction-Based Barrier Function Regulation. *Biomolecules* **10**, 1656 (2020).

## Bibliográfia

308. Moore, K. *et al.* A synthetic connexin 43 mimetic peptide augments corneal wound healing. *Exp Eye Res* **115**, 178–188 (2013).
309. Hatou, S. Hormonal regulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-dependent ATPase activity and pump function in corneal endothelial cells. *Cornea* **30 Suppl 1**, S60–66 (2011).
310. Risen, L. A., Binder, P. S. & Nayak, S. K. Intermediate filaments and their organization in human corneal endothelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **28**, 1933–1938 (1987).
311. Januszyk, M. *et al.* Evaluating the Effect of Cell Culture on Gene Expression in Primary Tissue Samples Using Microfluidic-Based Single Cell Transcriptional Analysis. *Microarrays (Basel)* **4**, 540–550 (2015).
312. Boquest, A. C. *et al.* Isolation and Transcription Profiling of Purified Uncultured Human Stromal Stem Cells: Alteration of Gene Expression after In Vitro Cell Culture. *MBoC* **16**, 1131–1141 (2005).
313. Neumann, E. *et al.* Cell culture and passaging alters gene expression pattern and proliferation rate in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Research & Therapy* **12**, R83 (2010).
314. Zaitseva, M., Vollenhoven, B. J. & Rogers, P. A. W. In vitro culture significantly alters gene expression profiles and reduces differences between myometrial and fibroid smooth muscle cells. *Molecular Human Reproduction* **12**, 187–207 (2006).
315. Malhotra, D., Loganathan, S. K., Chiu, A. M., Lukowski, C. M. & Casey, J. R. Human Corneal Expression of SLC4A11, a Gene Mutated in Endothelial Corneal Dystrophies. *Sci Rep* **9**, 9681 (2019).

316. Ogando, D. G. & Bonanno, J. A. RNA sequencing uncovers alterations in corneal endothelial metabolism, pump and barrier functions of Slc4a11 KO mice. *Exp Eye Res* **214**, 108884 (2022).
317. Català, P., Groen, N., LaPointe, V. L. S. & Dickman, M. M. A single-cell RNA-seq analysis unravels the heterogeneity of primary cultured human corneal endothelial cells. *Sci Rep* **13**, 9361 (2023).
318. Yu, J. *et al.* Safety and efficacy of human ESC-derived corneal endothelial cells for corneal endothelial dysfunction. *Cell Biosci* **13**, 201 (2023).
319. Petrela, R. B. & Patel, S. P. The soil and the seed: the relationship between Descemet's membrane and the corneal endothelium. *Exp Eye Res* **227**, 109376 (2023).
320. Huang, B., Blanco, G., Mercer, R. W., Fleming, T. & Pepose, J. S. Human Corneal Endothelial Cell Expression of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-Adenosine Triphosphatase Isoforms. *Archives of Ophthalmology* **121**, 840–845 (2003).
321. Di, V. H., Dd, S., S, S. & Pj, B. Regenerative capacity of the corneal endothelium in rabbit and cat. *Investigative ophthalmology & visual science* **16**, (1977).
322. Bornstein, P. & Nesse, R. The comparative biochemistry of collagen: The structure of rabbit skin collagen and its relevance to immunochemical studies of collagen. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **138**, 443–450 (1970).
323. Alonso-Alonso, S. *et al.* An effective method for culturing functional human corneal endothelial cells using a xenogeneic free culture medium. *Sci Rep* **13**, 19492 (2023).



## Bibliografía

324. *Reglamento (UE) n °536/2014 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de abril de 2014 , sobre los ensayos clínicos de medicamentos de uso humano, y por el que se deroga la Directiva 2001/20/CE Texto pertinente a efectos del EEE. OJ L vol. 158 (2014).*
325. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. *Real Decreto 1090/2015, de 4 de Diciembre, Por El Que Se Regularan Los Ensayos Clínicos Con Medicamentos, Los Comités de Ética de La Investigación Con Medicamentos y El Registro Español de Estudios Clínicos.* vol. BOE-A-2015-14082 121923–121964 (2015).



## Divulgación científica

“El científico no es aquella persona que da las respuestas correctas, sino aquél quien hace las preguntas correctas”

- Claude Lévi-Strauss



**Publicaciones científicas directamente relacionadas y que avalan la tesis doctoral**

An effective method for culturing functional human corneal endothelial cells using a xenogeneic free culture medium. **Alonso-Alonso S**, Vázquez N, Chacón M, Caballero-Sánchez N, Del Olmo-Aguado S, Suárez C, Alfonso-Bartolozzi B, Fernández-Vega-Cueto L, Nagy L, Merayo-Llaves J, Meana A. Sci Rep. 2023. doi: 10.1038/s41598-023-46590-2.

## Otras publicaciones científicas realizadas durante los estudios de doctorado

- ❖ Development of an in-house reconstructed human epidermis model as an alternative method in skin corrosion assessment. Chacón M, Vázquez N, Persinal-Medina M, **Alonso-Alonso S**, Pevida M, Llamas S, Baamonde B, Quiros L, Merayo-Lloves J, Meana Á. Toxicol In Vitro. 2020 doi: 10.1016/j.tiv.2020.104779.
  
- ❖ Xeno-free approach for the expansion of human adipose derived mesenchymal stem cells for ocular therapies. Persinal-Medina M, Llamas S, Vázquez N, Chacón M, Acebes-Huerta A, Uribe E, **Alonso-Alonso S**, Fernández-Vega González C, Baamonde B, Quirós L, Merayo-Lloves J, Meana Á. Exp Eye Res. 2021 doi: 10.1016/j.exer.2020.108358.
  
- ❖ Mini Cleanroom for the Manufacture of Advanced Therapy Medicinal Products (ATMP): Bioengineered Corneal Epithelium. Berisa-Prado S, Vázquez N, Chacón M, Persinal-Medina M, **Alonso-Alonso S**, Baamonde B, Alfonso JF, Fernández-Vega-Cueto L, Merayo-Lloves J, Meana Á. Pharmaceutics. 2021 doi: 10.3390/pharmaceutics13081282.
  
- ❖ Polymerizable Skin Hydrogel for Full Thickness Wound Healing. Persinal-Medina M, Llamas S, Chacón M, Vázquez N, Pevida M, Alcalde I, **Alonso-Alonso S**, Martínez-López LM, Merayo-Lloves J, Meana Á. Int J Mol Sci. 2022 doi: 10.3390/ijms23094837.
  
- ❖ Impedance-based non-invasive assay for ocular damage prediction on in vitro 3D reconstructed human corneal epithelium. Chacón M, Sánchez M, Vázquez N, Persinal-Medina M, **Alonso-Alonso S**, Baamonde B, Alfonso JF, Fernández-Vega-Cueto L, Merayo-Lloves J, Meana Á. Bioelectrochemistry. 2022 doi: 10.1016/j.bioelechem.2022.108129.
  
- ❖ In-house performance assessment of 3D QobuR-Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) for the evaluation of eye hazard. Chacón M, Vázquez N, Persinal-Medina M, **Alonso-Alonso S**, Alcalde I, Merayo-Lloves J, Meana Á. Toxicol In Vitro. 2022 doi: 10.1016/j.tiv.2022.105390.

- ❖ A Simple, Safe, and Effective Method for Preparing Autologous Bio-Based Fibrin Glue for Ophthalmic Use Fernández-Vega-Cueto L, Persinal-Medina M, Vázquez N, Chacón M, Alfonso-Bartolozzi B, **Alonso-Alonso S**, Sánchez T, Berisa-Prado S, Martínez-López LM, Merayo-Llaves J, Meana Á. *Pharmaceutics*. 2022 doi: 10.3390/pharmaceutics14112325.
  
- ❖ Regenerative inflammation: When immune cells help to re-build tissues. Caballero-Sánchez N, **Alonso-Alonso S**, Nagy L. *FEBS J*. 2022 doi: 10.1111/febs.16693.
  
- ❖ Improved Tool for Predicting Skin Irritation on Reconstructed Human Epidermis Models Based on Electrochemical Impedance Spectroscopy. Chacón M, Vázquez N, **Alonso-Alonso S**, Persinal-Medina M, Llames S, Pevida M, Alcalde I, Merayo-Llaves J, Meana Á. *Biosensors (Basel)*. 2023 doi: 10.3390/bios13020162.

## Publicaciones en congresos directamente relacionadas con la tesis doctoral

- ❖ Corneas discarded by low endothelial count: a source of human corneal endothelial cells (hCECs). Álvaro Meana; Natalia Vázquez; **Sergio Alonso-Alonso**; Carlota Suarez-Barrio; Susana del Olmo-Aguado; Manuel Chacón; Eva García-Pérez; Mairobi Persinal-Medina; Miguel Naveiras; José F. Alfonso; Jesús Merayo-Lloves. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (2020, Baltimore, EE.UU.)
  
- ❖ Development of a new xeno-free human corneal endothelial cells culture system based on Platelet Rich in Growth Factors. **Sergio Alonso-Alonso**; Natalia Vázquez; Carlota Suarez-Barrio; Susana del Olmo-Aguado; Manuel Chacón; Eva García-Pérez; Mairobi Persinal-Medina; José F. Alfonso; Belén Alfonso; Jesús Merayo-Lloves; Álvaro Meana. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (2021, Virtual, EE.UU.)
  
- ❖ Discarded corneal endothelial tissues: a source of viable endothelial cells usable for other therapies. **Sergio Alonso-Alonso**; Natalia Vázquez; Susana del Olmo-Aguado; Manuel Chacón; Jesús Merayo-Lloves; Álvaro Meana. VII International Congress of Research in Retina and Vision (SIREV) (2021, Virtual, España)
  
- ❖ Comparison of mRNA expression in primary cultures of human anterior lens epithelium and human corneal endothelium. **Sergio Alonso-Alonso**; Natalia Vázquez; Manuel Chacón; Mairobi Persinal-Medina; Noemí Caballero-Sánchez; Laszlo Nagy; Luís Fernández-Vega-Cueto-Felgueroso; Jesús Merayo-Lloves; Álvaro Meana. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (2022, Denver, EE.UU.)
  
- ❖ Comparación de la expresión de ARNm en cultivos primarios de epitelio anterior del cristalino y del endotelio corneal humano. **Sergio Alonso-Alonso**, Natalia Vázquez, Manuel Chacón, Mairobi Persinal-Medina; Noemí Caballero-Sánchez; Laszlo Nagy; Jesús Merayo-Lloves; Álvaro Meana XI Jornadas Internacionales de Doctorado de la Universidad de Oviedo. (2022, Asturias, España)
  
- ❖ Feasibility of a Corneal Endothelial Cell Therapy using two in vitro corneal models. **Sergio Alonso-Alonso**, Natalia Vázquez, Manuel Chacón, Mairobi Persinal-Medina, Jesús Merayo-Lloves, Álvaro Meana. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (2023, Nueva Orleans, EE.UU.)

## Otras publicaciones en congresos realizadas durante los estudios de doctorado

- ❖ Cruelty-free corneal damage assay based on automatic high-throughput cell capacitance. Manuel Chacón; María Begoña González-García; Daniel Izquierdo-Bote; Manuel Sánchez; Natalia Vázquez; Silvia Berisa; Mairobi Persinal-Medina; **Sergio Alonso-Alonso**; Jesús Merayo-Lloves; Álvaro Meana. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (2020, Baltimore, EE.UU.)
  
- ❖ Xeno-free and minimally invasive approach for ocular therapies based on mesenchymal stem cells. Jesús Merayo-Lloves; Mairobi Persinal-Medina; Natalia Vázquez; Manuel Chacón; **Sergio Alonso-Alonso**; Luís Fernández-Vega-Cueto; Begoña Baamonde; José I. Blázquez; Carlos Lisa; Álvaro Meana. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (2020, Baltimore, EE.UU.)
  
- ❖ Evaluation of ocular irritancy based on cell membrane capacitance on a cruelty-free in vitro corneal model. Manuel Chacón; Natalia Vázquez; Mairobi Persinal-Medina; **Sergio Alonso-Alonso**; Ignacio Alcalde; Manuel Sánchez; Luis Fernández-Vega-Cueto; Jesús Merayo-Lloves; Álvaro Meana. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (2021, Virtual, EE.UU.)
  
- ❖ Cell membrane capacitance – A non-invasive alternative to predict ocular irritancy on reconstructed human corneal epithelia. Manuel Chacón; Natalia Vázquez; Mairobi Persinal-Medina; **Sergio Alonso-Alonso**; Ignacio Alcalde; Manuel Sánchez; Álvaro Meana. JCR Summer School on Non-Animal Approaches in Science (2021, Ispra, Italia)
  
- ❖ Ocular irritancy prediction based on non-invasive cell membrane capacitance measurement. Manuel Chacón; Natalia Vázquez; Mairobi Persinal-Medina; **Sergio Alonso-Alonso**; Jesús Merayo-Lloves; Álvaro Meana. VII International Congress of Research in Retina and Vision (SIREV) (2021, Virtual, España)
  
- ❖ Oral mucosa culture system for ocular surface treatment avoiding the use of xenogeneic components. Álvaro Meana; Mairobi Persinal-Medina; Natalia Vázquez; Manuel Chacón; **Sergio Alonso-Alonso**; Carlos Fernández-Vega-González; José I. Blázquez; Sara Llames; Jesús Merayo-Lloves. Annual Meeting



## Divulgación científica

of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (2021, Virtual, EE.UU.)

- ❖ Performance assessment of QobuR-RhCE – a cruelty-free in vitro cornea model. Manuel Chacón; Natalia Vázquez; Mairobi Persinal-Medina; **Sergio Alonso-Alonso**; Ignacio Alcalde; Jesús Merayo-Llodes; Álvaro Meana. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (2022, Denver, EE.UU.)
  
- ❖ Métodos alternativos a la experimentación animal. Manuel Chacón; Natalia Vázquez; **Sergio Alonso-Alonso**, Mairobi Medina; Álvaro Meana. Semana del Instituto Universitario Fernández-Vega. (2022, Asturias, España)
  
- ❖ Electrochemical impedance spectroscopy as an alternative to the Draize eye irritation test. Manuel Chacón, Natalia Vázquez, **Sergio Alonso-Alonso**, Mairobi Persinal-Medina, Ignacio Alcalde, Jesús Merayo-Llodes, Álvaro Meana. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (2023, Nueva Orleans, EE.UU.)
  
- ❖ Cultured oral mucosal and adipocytic msc in an alkaline chemical burn of the corneal in an experimental model. Álvaro Meana, Mairobi Persinal-Medina, Natalia Vázquez, Manuel Chacón, **Sergio Alonso-Alonso**, Sara Llames, Marta Pevida, Jesús Merayo-Llodes. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (2023, Nueva Orleans, EE.UU.)

## **Premios**

- ❖ 2021 Travel Grant Recipient. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (2021, Virtual, EE.UU.)
  
- ❖ 2022 ESACT Grant. European Society for Animal Cell Technology (ESACT)





## Financiación

*“La ciencia nunca resuelve un problema sin crear otros 10  
más”*

- George Bernard Shaw

## Financiación

## AYUDAS PROGRAMA JOVELLANOS

(IDI/2021/000171- AYUD/2021/57056)

Programa financiado por el Gobierno del Principado de Asturias (Consejería de Ciencia, Innovación y Universidad), a través de la Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología (FICYT), así como del Plan de Ciencia, Tecnología e Innovación 2018- 2022 (PCTI) y cuenta con la cofinanciación de la Unión Europea mediante el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).



## AYUDAS PARA LA REALIZACIÓN DE TESIS DOCTORALES EN RÉGIMEN DE CONCURRENCIA COMPETITIVA

(PAPI-22-PF-1)

subvencionado por el Vicerrectorado de Investigación, a través del Plan de Apoyo y Promoción de la Investigación.



Universidad de Oviedo



GOBIERNO DEL  
PRINCIPADO DE ASTURIAS

Financiación

HUNGARIAN SCIENTIFIC RESEARCH FUND

(KKP 129909)



UNIVERSITY *of*  
**DEBRECEN**

FUNDACIÓN TELEFÓNICA



**Telefónica**



## Anexos

“Un buen trago de whisky caliente antes de acostarse, no es muy científico, pero ayuda”

- Alexander Fleming







OPEN

## An effective method for culturing functional human corneal endothelial cells using a xenogeneic free culture medium

S. Alonso-Alonso<sup>1,2</sup>, N. Vázquez<sup>1,2</sup>✉, M. Chacón<sup>1,2</sup>, N. Caballero-Sánchez<sup>3,4</sup>, S. Del Olmo-Aguado<sup>1,2</sup>, C. Suárez<sup>1,2</sup>, B. Alfonso-Bartolozzi<sup>2,5</sup>, L. Fernández-Vega-Cueto<sup>2,5</sup>, L. Nagy<sup>4,6</sup>, J. Merayo-Llodes<sup>1,2</sup> & A. Meana<sup>1,2,7</sup>

Endothelial dysfunction is a leading cause of corneal blindness in developed countries and the only available treatment is the endothelial transplantation. However, the limited availability of suitable donors remains a significant challenge, driving the exploration of alternative regenerative therapies. Advanced Therapy Medicinal Products show promise but must adhere to strict regulations that prohibit the use of animal-derived substances. This study investigates a novel culture methodology using Plasma Rich in Growth Factors (PRGF) as the only source of growth factors for primary cultures of human corneal endothelial cells (CECs). CECs were obtained from discarded corneas or endothelial rings and cultured in two different media: one supplemented with xenogeneic factors and other xenogeneic-free, using PRGF. Comprehensive characterization through immunofluorescence, morphological analyses, trans-endothelial electrical resistance measurements, RNA-seq, and qPCR was conducted on the two groups. Results demonstrate that CECs cultured in the xenogeneic-free medium exhibit comparable gene expression, morphology, and functionality to those cultured in the xenogeneic medium. Notably, PRGF-expanded CECs share 46.9% of the gene expression profile with native endothelium and express all studied endothelial markers. In conclusion, PRGF provides an effective source of xenogeneic-free growth factors for the culture of CECs from discarded corneal tissue. Further studies will be necessary to demonstrate the applicability of these cultures to cell therapies that make clinical translation possible.

The corneal endothelium is a neuroectoderm-derived tissue<sup>1</sup> that is located on the posterior surface of the cornea forming a semipermeable monolayer of hexagonal and mitotically inactive cells resting over a collagen membrane called Descemet's membrane<sup>2</sup>. Corneal Endothelial Cells (CECs) constitute a physiological tight intercellular barrier with the function of maintaining the corneal stroma in an adequate level of hydration<sup>1</sup>. When the function of these cells is compromised, corneal hydration increases causing corneal edema and thus modifying the alignment of the collagen fibers present in the stroma leading to a loss of transparency<sup>3,4</sup>.

The standard treatment of corneal endothelial dysfunction is corneal transplantation either as the whole cornea (penetrating keratoplasty) or as just the endothelial layer (lamellar keratoplasty)<sup>5,6</sup>. Endothelial cell failure constitutes the primary indication for corneal transplantation worldwide, being the indication for 55% of all keratoplasties performed in the US in 2018<sup>7</sup>. However, the worldwide supply of donor corneas is low, with only

<sup>1</sup>Instituto Universitario Fernández-Vega, Fundación de Investigación Oftalmológica, Universidad de Oviedo, Avenida Doctores Fernández Vega, 33012 Oviedo, Asturias, Spain. <sup>2</sup>Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Avenida del Hospital Universitario, 33011 Oviedo, Asturias, Spain. <sup>3</sup>Doctoral School of Molecular Cell and Immunobiology. Faculty of Medicine, University of Debrecen, Nagyerdei Krt, Debrecen 4032, Hungary. <sup>4</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nuclear Receptor Research Laboratory, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Nagyerdei Krt, Debrecen 4032, Hungary. <sup>5</sup>Instituto Oftalmológico Fernández-Vega. Avenida Doctores Fernández-Vega, 33012 Oviedo, Asturias, Spain. <sup>6</sup>Department of Medicine and Biological Chemistry, Johns Hopkins University School of Medicine, and Institute for Fundamental Biomedical Research, Johns Hopkins All Children's Hospital, 6Th Ave S, St. Petersburg, FL 33701, USA. <sup>7</sup>Unidad de Ingeniería Tisular, Centro Comunitario Sangre y Tejidos de Asturias (CCST), Unidad 714 CIBERER, Calle Emilio Rodríguez Vigil, 33006 Oviedo, Asturias, Spain. ✉email: natalia.vazquez@fio.as

one cornea available per 70 patients. In addition, approximately one-third of donor corneas are discarded due to poor endothelial quality or the presence of infection<sup>8</sup>.

To overcome this shortage, researchers are exploring Advanced Therapy Medicinal Products (ATMP) as an alternative to conventional transplant procedures<sup>9,10</sup>. In this sense, the *in vitro* expansion of CECs using discarded cadaveric tissues seems an interesting approach for the development of tissue engineering<sup>11–19</sup> or cell therapy based treatments<sup>20–26</sup>. Despite the promising result of these strategies, *in vitro* expansion of CECs is highly limited due to CECs being arrested in G1 phase<sup>27</sup>.

In the last few years, different culture media have been used for the expansion of CECs<sup>28,29</sup>. These methods often involve the use of fetal bovine serum (FBS), pituitary extract, and other xenogeneic products that are, in some cases, incompatible with the Good Manufacturing Practice (GMP) required for ATMP manufacture<sup>30</sup>.

The use of human blood derivatives such as platelet-rich plasma and platelet lysate products have demonstrated their efficacy for the *in vitro* expansion of CECs<sup>31–34</sup>. One of the most standardized human blood derivatives used is the Plasma Rich in Growth Factors (PRGF) (PRGF-Endoret<sup>®</sup>, BTI, Vitoria, Spain), a type of platelet-rich plasma consisting of plasma enriched in proteins and growth factors that stimulate and accelerate tissue regeneration<sup>35,36</sup>. Autologous PRGF has been approved for clinical use by the European Community and the U.S. Food and Drug Administration<sup>37</sup>, and it is generally employed as eye drops to treat ocular surface pathology<sup>38–42</sup>.

In this study, we investigated a novel method using PRGF as the unique source of growth factors in primary cultures of CECs. Through extensive characterization, we have demonstrated that the gene expression, morphology, and functionality of CECs cultured with PRGF culture medium are similar to CECs cultured with a standard FBS culture medium containing xenogeneic factors.

## Results

### Human tissues

CECs cultures were obtained using FBS (n = 31) or PRGF (n = 31) supplemented media. The age of the corneal donors and the corneal endothelial density, measured by specular microscopy, were calculated for each group (Table 1). No statistically significant differences were found between any group when comparing corneal endothelial density, determined prior to the surgery, or the age of the corneal donors.

### Isolation and culture of CECs

In all the cultures performed, CECs enhanced their typical hexagonal morphology in the corneal endothelium after the stabilization stage. After two days of the culture, CECs were attached and began to proliferate, showing cobblestone or polygonal morphology. By day 10–15, a monolayer of CECs had formed on all the culture plates. After 20–30 days of culture, confluent compact and hexagonal CECs cultures were obtained in all the tissues processed (Fig. 1).

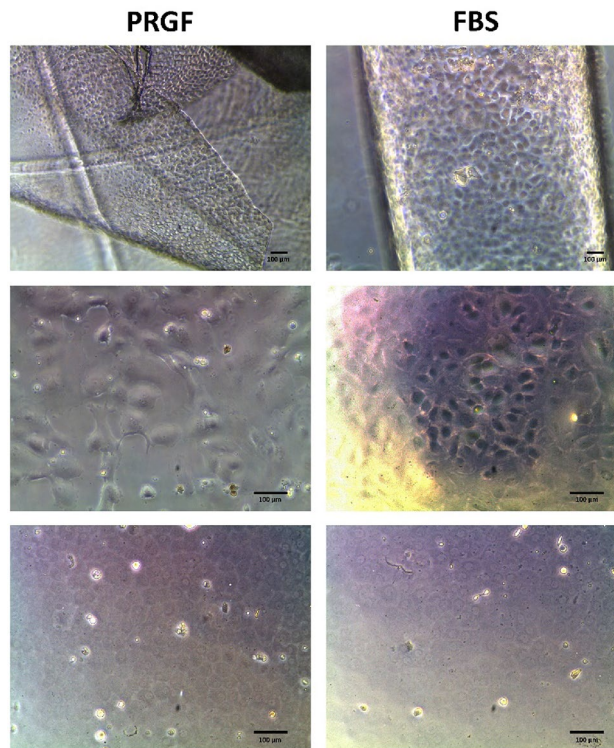
### Immunocytochemistry, cellular density, and morphometric analysis

The immunocytochemistry analysis showed that CECs cultures in PRGF or FBS-supplemented media had a positive stain for the tight junction proteins Zonula occludens-1 (ZO-1) and connexin-43, functional protein Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and structural protein vimentin (Fig. 2).

The cellular density and the morphometric analysis (Table 2) were determined by ZO-1 and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase immunofluorescence and ImageJ analysis. CECs cultured in PRGF or FBS-supplemented media had a cellular density of 615.8 cell/mm<sup>2</sup> ± 48.83 and 816.9 cell/mm<sup>2</sup> ± 191.4, respectively, with a homogenous compact cellular morphology (area: 1249 ± 89.61 μm<sup>2</sup> and 1386 ± 305.2 μm<sup>2</sup>, respectively) and hexagonal in shape as suggested by their cellular circularity (circularity index: 0.835 ± 0.01 and 0.801 ± 0.01, respectively). No statistically significant differences were found in the cellular density and area. However, the circularity index revealed a significantly higher value (p < 0.05) in the cultures supplemented with PRGF compared with ones supplemented with FBS.

	PRGF (n = 31)		FBS (n = 31)	
Age (years)	Whole Corneal Endothelia (n = 13)	Endothelial Peripheral Rings (n = 18)	Whole Corneal Endothelia (n = 19)	Endothelial Peripheral Rings (n = 12)
	63 ± 3	63 ± 2	61 ± 2	60 ± 4
	63 ± 1		61 ± 2	
Corneal Endothelial Density (cell/mm <sup>2</sup> )	Whole Corneal Endothelia (n = 13)	Endothelial Peripheral Rings (n = 18)	Whole Corneal Endothelia (n = 19)	Endothelial Peripheral Rings (n = 12)
	2322 ± 167	2706 ± 46	2564 ± 124	2775 ± 79
	2560 ± 76		2658 ± 79	

**Table 1.** The age of the corneal donors and corneal endothelial density were determined prior to the hypothetical corneal graft by specular microscopy. Data are shown as the mean ± SEM. The normal distribution of values was assessed by the Shapiro–Wilk test. Significant differences among defined groups were checked using parametric tests (t-student or ANOVA test). PRGF: Plasma Rich in Growth Factors; FBS: Fetal Bovine Serum. SEM: Standard Error of Mean.



**Figure 1.** Phase-contrast microphotographs of CECs cultured in PRGF (left) or FBS (right) supplemented media. CECs in the native endothelium after the stabilization stage (first line), after 7 days of culture in P0 (second line), and displaying their typical hexagonal corneal endothelial morphology after 20–30 days of culture in P0 (third line). CECs: Corneal Endothelial Cells; PRGF: Plasma Rich in Growth Factors; FBS: Fetal Bovine Serum.

#### Characterization of barrier function: trans-endothelial electrical resistance (TER)

CECs cultured in PRGF or FBS-supplemented media showed a TER value of  $39.20 \pm 4.09 \Omega\text{cm}^2$  and  $39.78 \pm 2.83 \Omega\text{cm}^2$  respectively. No statistically significant differences were found between groups.

#### RNA isolation and sequencing (RNAseq)

To examine the capability of CECs cultured in PRGF or FBS-supplemented media to maintain a CECs-specific gene expression profile, bulk RNAseq was performed. Moreover, the gene expression of CECs cultured in PRGF or FBS-supplemented media was compared with native endothelium public data from Tokuda et al.<sup>43</sup>. Any gene across the genome with at least a count  $\geq 1$  was defined as expressed, while for the differential expression, the thresholds were a p-value  $< 0.05$  and at least a fold change of 1.5.

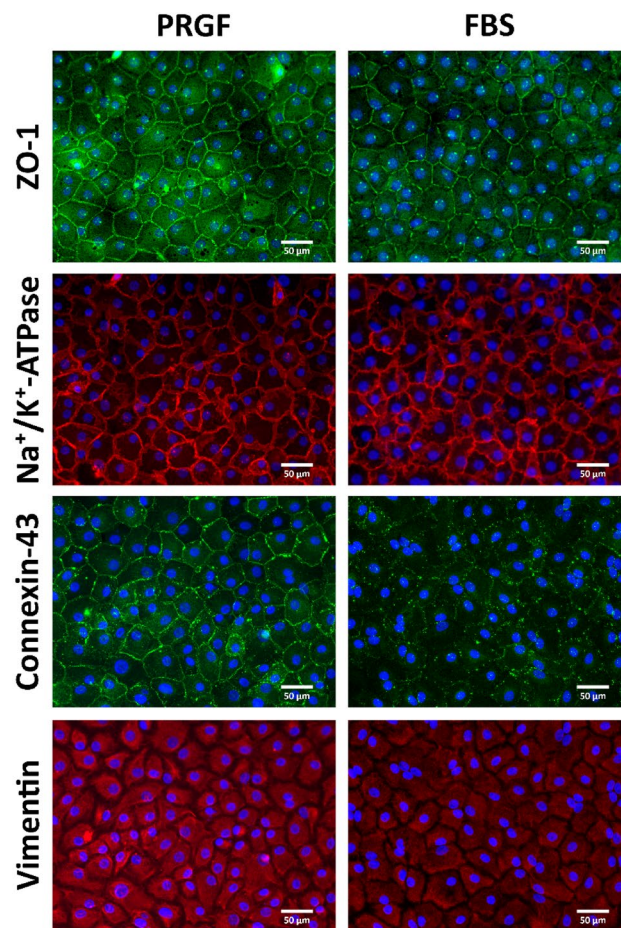
23,744 out of 24,770 (91.86%) genes were found unchanged between CECs cultured in PRGF or FBS-supplemented media. On the other hand, 11,617 (46.90%) and 11,377 (45.93%) genes were found unchanged between CECs cultured in PRGF or FBS-supplemented media compared to native endothelium, respectively (Table 3).

Moreover, a volcano plot (Fig. 3) representing the Differentially Expressed Genes (DEGs) between the groups is shown. No statistically significant differences in the four genes used as corneal endothelial markers (*TPI1*: ZO-1; *ATP1A1*:  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase; *GJA1*: connexin-43 and *VIM*: vimentin) were found.

Finally, Principal Component Analysis (PCA) was performed in RNA-seq data sets (Fig. 4). Gene expression data obtained by RNA-seq technology demonstrated the clustering of the samples into two distinct groups. One group was formed by CECs in the native endothelium, and the second was made up of CECs cultured in PRGF and FBS-supplemented media (PC1: 79%). The second principal component (PC2: 9%), represents the variance between CECs cultured in PRGF and FBS-supplemented media.

#### RNA isolation and qPCR

qPCR for the tight junction proteins ZO-1 and connexin-43, functional protein  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and structural protein vimentin showed no statistically significant differences between CECs cultured in PRGF or FBS-supplemented media (Fig. 5).



**Figure 2.** Immunofluorescence microphotographs of CECs cultured with PRGF or FBS-supplemented media in P0. CECs: Corneal Endothelial Cells; PRGF: Plasma Rich in Growth Factors; FBS: Fetal Bovine Serum. ZO-1: Zonula Occludens.

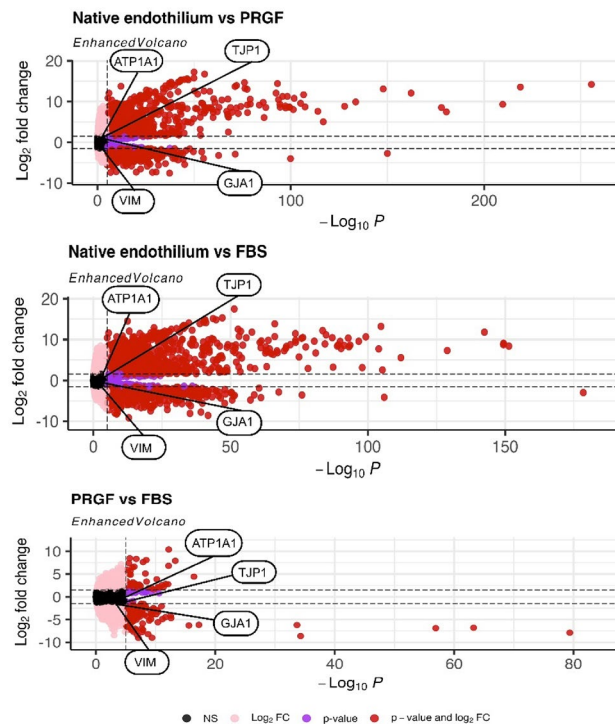
	Cellular density (cell/mm <sup>2</sup> )	Area (μm <sup>2</sup> )	Circularity index
PRGF	615.8 ± 49	1249 ± 90	0.835 ± 0.01
FBS	816.9 ± 191	1386 ± 305	0.801 ± 0.01

**Table 2.** Cellular density (cell/mm<sup>2</sup>), area (μm<sup>2</sup>), and circularity index of CECs cultured in PRGF or FBS-supplemented media in P0. Data are shown as the mean ± SEM. n = 6 for each group. The normal distribution of values was assessed by the Shapiro–Wilk test. Significant differences among defined groups were checked using parametric tests (t-student or ANOVA test). CECs: Corneal Endothelial Cells; PRGF: Plasma Rich in Growth Factors; FBS: Fetal Bovine Serum.

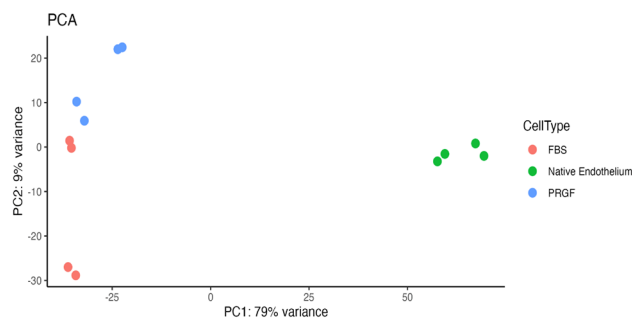
	PRGF vs FBS	Native Endothelium vs FBS	Native Endothelium vs PRGF
Unchanged	23,744	11,377	11,617
DEGs	1026	13,393	13,153
Upregulated	497	9177	9242
Downregulated	529	4216	3911

**Table 3.** Unchanged and DEGs between the 3 groups of CECs: CECs cultured in PRGF or FBS supplemented medium in P0, and CECs in the native endothelium taken from public data<sup>43</sup>. n = 4 for each group. DEGs: Differentially Expressed Genes; CECs: Corneal Endothelial Cells; PRGF: Plasma Rich in Growth Factors; FBS: Fetal Bovine Serum.





**Figure 3.** Volcano plot representing the DEGs between the three groups: CECs cultured in PRGF or FBS-supplemented media in P0 and CECs in the native endothelium public data<sup>43</sup>. The y-axis represents the  $\log_2$  fold change of the gene expression, and the x-axis the p-value. The horizontal lines correspond to  $\log_2$  foldchange  $< -1.5$  and  $> 1.5$ , and the vertical line corresponds to  $-\log_{10}(0.05)$ , where 0.05 is the threshold for the p-value. The text boxes represent the position of the four functionality genes (*TJP1*: ZO-1; *ATP1A1*:  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase; *GJA1*: connexin-43 and *VIM*: vimentin).  $n = 4$  for each group. DEGs: Differentially Expressed Genes; CECs: Corneal Endothelial Cells; PRGF: Plasma Rich in Growth Factors; FBS: Fetal Bovine Serum.

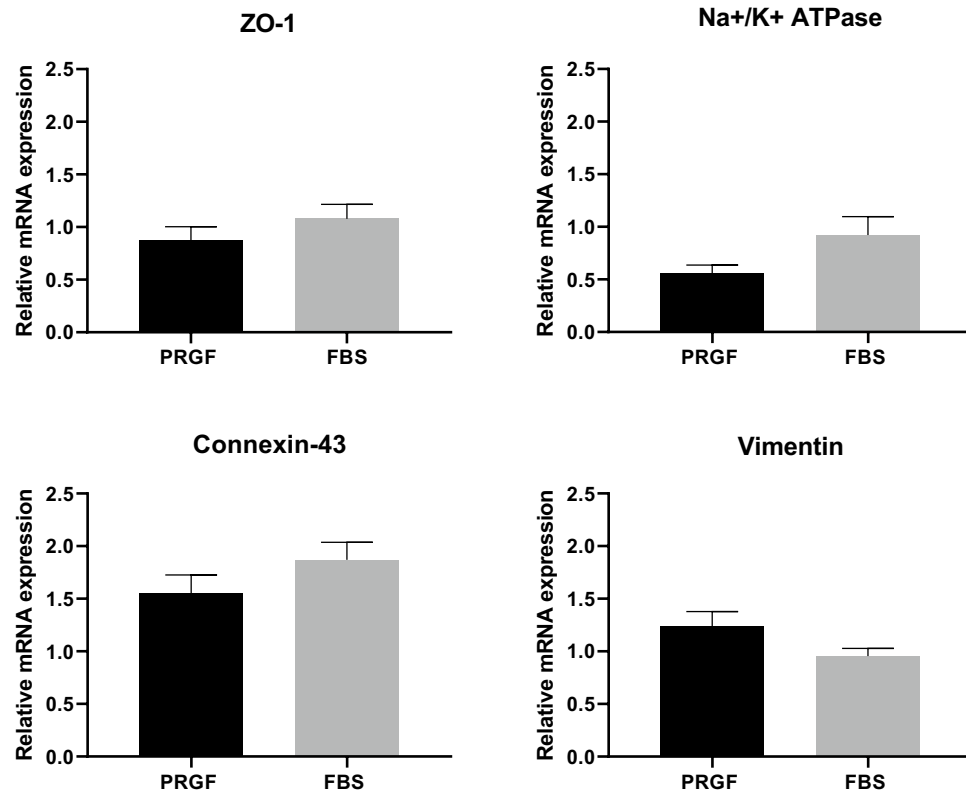


**Figure 4.** PCA results of CECs cultured in PRGF or FBS-supplemented media in P0 and native endothelium public data<sup>43</sup>.  $n = 4$  for each group. PCA: Principal Component Analysis; CECs: Corneal Endothelial Cells; PRGF: Plasma Rich in Growth Factors; FBS: Fetal Bovine Serum.

## Discussion

Nowadays, the main way to restore vision in patients with severe endothelial damage is corneal transplantation from cadaveric donors. Surgical treatment has evolved in just over 100 years from complete corneal transplantation or penetrating keratoplasty, to selective transplantation of the damaged layer, first with Descemet-Stripping Automated Endothelial Keratoplasty (DSAEK) and later with DMEK, a less invasive technique that offers better visual results. Additionally, a novel cell therapy has gained approval for treating corneal edema in Japan, and it is under preparations in the US to commence clinical trials, and further plans for clinical development are in progress within the EU. However, both the traditional keratoplasties and the newer treatments rely on donated tissue.

The Spanish corneal transplant model is one of the most active in the world, with 4142 corneas transplanted in the year 2021 (87.4 corneal transplants per million inhabitants), according to Activity Report on Tissue Donation and Transplantation from Spanish National Transplant Organisation. Despite this, the aging of the population has led, in recent years, to a gap between the need for endothelial tissue and the number of donations



**Figure 5.** qPCR results of CECs cultured in PRGF or FBS-supplemented media in P0. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM.  $n = 7$  for each group. The normal distribution of values was assessed by the Shapiro–Wilk test. Significant differences among defined groups were checked using parametric tests (t-student or ANOVA test).  $p$ -value 0.05. qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction. CECs: Corneal Endothelial Cells; PRGF: Plasma Rich in Growth Factors; FBS: Fetal Bovine Serum. SEM: Standard Error of Mean.

and to an increase in the transplant waiting list. In this framework, the expansion of CECs for its use in Tissue Engineering or Cellular Therapy techniques is shown as an alternative which would reduce the waiting list for endothelial transplantation.

CECs *in vitro* expansion involves serious difficulties since CECs are arrested in the G1 phase when they are within their biological niche in the human eye<sup>27</sup>. This difficulty is evidenced by the many different culture techniques and culture media that have been used for CECs expansion<sup>29,44</sup>. Most of these media formulations incorporate xenogeneic elements, often utilizing FBS, thereby hindering the translation of these therapies into clinical application for various reasons. These difficulties encompass potential immune system responses to residual animal proteins<sup>45</sup>. To circumvent these limitations, the adoption of a xenogeneic-free culture method for CECs emerges as a solution, effectively avoiding some of these concerns.

In this study, CECs (P0) were obtained using a standard culture medium containing xenogeneic factors and with a culture medium in which PRGF was used as the only supplement. CECs cultured in PRGF media showed similar characteristics in immunofluorescence, TER, qPCR, and RNAseq analyses to CECs cultured in standard culture medium.

CECs cultures were obtained from whole corneal endothelia from corneas discarded by Asturias Tissue Bank to be used in a transplant or from endothelial peripheral rings from corneas previously processed for DMEK surgery. After 30 days of culture, a monolayer of compact CECs displaying their typical hexagonal endothelial morphology was observed in both CECs cultures by phase-contrast microscopy and immunofluorescence. Immunohistochemical analysis revealed a positive stain for ZO-1 and connexin-43, tight junction-associated proteins responsible for establishing the endothelial barrier; Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, an integral membrane protein mainly responsible for endothelial pump function; and vimentin, a structural protein useful to establish the baseline morphology. Immunostaining of ZO-1, connexin-43, and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase clearly outlined the cell borders, which was concomitant with strong immunostaining of vimentin intermediate filaments.

ZO-1 and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase immunofluorescence photographs were used to calculate cellular density and area with ImageJ software. The circularity index revealed a significantly higher value ( $p < 0.05$ ) in the cultures supplemented with PRGF ( $0.835 \pm 0.01$ ) compared with ones supplemented with FBS ( $0.801 \pm 0.01$ ). Since hexagonal CECs will have a profile closer to 1 compared to long and spindly fibroblast-like cells<sup>46</sup>, CECs cultured in PRGF medium showed a more hexagonal morphology than CECs cultured in FBS, similar to that reported in previous studies, although with a more compact morphology<sup>46</sup>.

The leakiness of the endothelium is reflected in the very small TER of 15–25  $\Omega\cdot\text{cm}^{247}$ . In this study, the resistance barrier, showed by ZO-1 and connexin-43 immunostaining, was confirmed by TER. CECs cultured in PRGF or FBS cultured media showed a small TER ( $39.20 \pm 4.09 \Omega\text{cm}^2$  and  $39.78 \pm 2.83 \Omega\text{cm}^2$ , respectively), although higher than previously reported in human CECs cultures<sup>48</sup>.

For a complete characterization of CECs, RNA-seq was also performed in four samples of each group. RNA-seq results for the four chosen markers showed similar expression levels of corneal endothelial markers in both CECs cultures as compared with native endothelium public data<sup>43</sup>, indicating that the culture does not affect the expression of the functional corneal endothelial markers selected. Despite the similar level of expression in the selected markers, a high number of DEGs between the data from cultured CECs and native endothelium were found. The differences between native endothelium and the cultures represent most of the variation between samples, as can be seen in the PCA. These results are in agreement with other RNA-seq studies where it was found that the culture of CECs affects gene expression in a progressive manner, increasing the differences along the number of cell passages<sup>49,50</sup>. qPCR was used to validate the expression level determined by RNAseq for the four genes studied. In accordance with RNAseq results, qPCR results showed non-significant differences between CECs cultured with PRGF or FBS media in the expression of the selected markers.

Several studies have demonstrated the efficacy of platelet-rich plasma and platelet lysate products for the *in vitro* expansion of CECs<sup>31–34</sup>. The novelty of our study lies in the fact that the PRGF is obtained with a protocol in which platelets are optimally concentrated, and immune cells are removed. Since white blood cells have often been suggested as a negative factor for tissue regeneration, PRGF could be a more suitable option for CECs culture than other platelet lysates<sup>51</sup>. Furthermore, since autologous PRGF has been approved for clinical use by the European Community and the U.S. Food and Drug Administration<sup>37</sup>, this culture methodology could facilitate the translation of any Tissue Engineering or Cellular Therapy technique into clinical practice.

Spanish legislation is very strict about the type of tissue that can be used in research, allowing only the use of discarded tissue for transplantation. Thus, in this study, sclerocorneal rings and corneas discarded due to not complying with the criteria for transplant were used. This fact, together with the age of the cadaveric donors ( $\approx 60$  years), may have conditioned the limited CECs expansion obtained.

In considering the future translational potential of our methodology, it is essential to address the limited expansion observed in our study. Attempts to extend the expansion beyond the initial passages resulted in challenges, including the loss of endothelial morphology. The documented alterations<sup>50</sup> in gene expression during cell passages highlight the complex dynamics associated with extended expansion. This fact has prompted a cautious approach, aiming to retain cellular characteristics while minimizing expansion.

Parekh et al. had discussed<sup>52</sup> that during a DMEK surgery, a routine DMEK graft is 53.429  $\text{mm}^2$ ; thus, assuming that in a standard DMEK graft, the CECs density is 2500 cells/ $\text{mm}^2$ , resulting in a DMEK surgery with a total of 133,572 CECs being transplanted. These authors have also reported that it is possible to expand CECs from discarded tissues (peripheral endothelium or central endothelium) but using a methodology that includes xenogeneic factors<sup>53</sup>.

In this study, we obtained the number of cells transplanted in a normal DMEK graft from one whole corneal endothelium unsuitable for clinic use or from two peripheral endothelial rings discarded from corneas previously processed for DMEK surgery. However, we use a methodology that is inexpensive and easy to transfer to clinical practice due to xenogeneic factors being avoided in the culture medium. Although we obtained a lower total number of CECs from peripheral endothelial rings (1 confluent P48 well) than from whole corneal endothelia (2 confluent P48 wells), CECs cultured in PRGF medium from peripheral endothelial rings or from whole corneal endothelia showed similar characteristics by immunofluorescence, TER, and qPCR analysis (data not shown).

In conclusion, CECs cultures can be obtained from discarded tissues for cell therapy or tissue engineering techniques using a methodology that is inexpensive and easy to transfer to clinical practice by avoiding the use of xenogeneic factors.

## Methods

### Human tissues

Human tissue was handled according to the Declaration of Helsinki. The research was approved by Ethics Committee of the Principado de Asturias (Comité de Ética de la Investigación del Principado de Asturias; Protocol Code: 2020.050). 51 corneas of 38 donors were obtained from the local Eye Bank (Centro Comunitario de Sangre y Tejidos, Oviedo, Asturias, Spain) after informed consent was obtained from the relatives, according to the Spanish transplant law RD Ley 9/2014. All corneas used in this study were discarded for clinical use due to not complying with the criteria to be transplanted: low corneal endothelial density ( $< 2000$  cells/ $\text{mm}^2$ ); corneal guttae; corneal striae with dead cells or anomalous morphology of CECs. Furthermore, sclerocorneal rings from corneas previously processed for Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty (DMEK) surgery were also used.

All tissues were maintained at 4 °C in Eusol-C storage medium (Alchimia, Ponte S. Nicolò, Padova, Italy) for fewer than 10 days before use. The mean age of corneal donors was  $62 \pm 1.78$  years old, and the endothelial cell density of the corneas determined using a cell check specular endothelial microscope (Konan Medical, Irvine, CA, USA) was  $2588 \pm 64.93$  cells/ $\text{mm}^2$ .

### Preparation of PRGF

Blood from healthy volunteers (age range 25 – 45 years) was collected by venipuncture after informed consent was obtained from the subjects. They received an explanation of the nature and possible consequences of the study complying with the principles of the Declaration of Helsinki. The blood sample from each volunteer was processed according to the method described by Anitua et al.<sup>54</sup>. Briefly, 81 mL of human blood was collected into 9 mL tubes with 3.8% (wt/v) sodium citrate (Vacuette<sup>®</sup>, Greiner Bio-One, Madrid, Spain). Blood samples were



centrifuged at 580 rcf for 8 min at room temperature, the plasma column was pipetted, avoiding the buffy coat, and incubated with 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$  of 10% calcium chloride (B. Braun Medical, Barcelona, Spain) at 37 °C for 1 h, and finally, the released supernatants were collected by aspiration, filtered, aliquoted and stored at -20 °C until use.

### Isolation and culture of CECs

CECs were isolated using a two-step “peel-and-digest” approach. Briefly, Descemet’s membrane, along with CECs, was carefully dissected from the corneal stroma under a dissecting stereomicroscope following the Schwalbe line, and then endothelial peripheral rings or whole corneal endothelia were maintained for 2–7 days at 37 °C to stabilize the cells before culture in either following culture medium:

FBS supplemented medium: optiMEM I (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 8%v/v FBS, 0.3 mM ascorbic acid 2-phosphate, 200 mg/L calcium chloride, 0.04% chondroitin sulfate, 10 U/mL penicillin, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin, 20 ng/mL nerve growth factor (Merck, Darmstadt, Alemania), and 5 ng/mL epidermal growth factor (Austral Biologicals, San Ramon, CA, USA).

PRGF supplemented medium: optiMEM I supplemented with 10%v/v PRGF, 200 mg/L calcium chloride and 10 U/mL penicillin, and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin.

Descemet’s membrane, along with CECs, was digested with TrypLE<sup>®</sup> (Catalog number: 12605010; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 2 h at 37 °C. After that, TrypLE<sup>®</sup> was neutralized with culture medium. The detached cells were centrifuged at 400 rcf for 10 min, the supernatant was removed, and the cells were seeded on one (endothelial peripheral rings) or two (whole corneal endothelia) wells of 48-well culture plates (1.10  $\text{cm}^2$  area) previously treated with FNC coating mix<sup>®</sup> (Athena Environmental Sciences, Baltimore, MD, USA). For characterization of barrier function, CECs were seeded on 1.12  $\text{cm}^2$ , 0.4  $\mu\text{m}$  pore size Transwell<sup>®</sup> inserts in a 12-well culture plate (Corning, Corning, NY, USA).

All incubation and cultures of CECs were carried out in a humidified incubator at 37 °C with 5%  $\text{CO}_2$ , and the culture medium was changed every two–three days.

### Examination of cell cultures

Cellular growth was assessed by phase-contrast microscopy using a Leica DMIL LED phase-contrast microscope (Leica, Wetzlar, Hesse, Germany), and photos were taken with an attached EC3 camera (Leica). Once the cultures were confluent, they were used for the following studies.

### Immunocytochemistry, cellular density, and morphometric analysis

ZO-1 (1:50; Catalog number: 61–7300, Thermo Fisher Scientific),  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha 1$  subunit (1:100; Catalog number: 05–369, Merck), connexin-43 (1:100; Catalog number: C6219, Merck) and vimentin (1:100; Catalog number: M0725, Agilent DAKO, Santa Clara, CA, USA) antibodies were used in order to check CECs phenotype. Briefly, confluent CECs cultures ( $n = 11$  for each group) were fixed using ice-cold methanol (Merck) for 10 min, washed with PBS 1X solution twice for 5 min, and permeabilized in a PBS solution containing 0.3% Triton-X 100 (VWR, Radnor, PA, USA) for another 5 min (0.03% Triton-X 100 was used for ZO-1 antibody). Next, the samples were incubated with a primary antibody containing 10% normal goat serum (Catalog number: ab7481, Abcam, Cambridge, UK) at 4 °C overnight. Subsequently, the samples were incubated with corresponding secondary antibodies (1:500; Catalog number: A-11032 and A-11034, Thermo Fisher Scientific) for 2 h at room temperature. Between incubations, samples were washed 3 times with PBS for 10 min.

Immunolabeled cells were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Thermo Fisher Scientific) to allow nuclei visualization. All the samples were examined using a Leica DM6000B fluorescence microscope, and 5 photos of random fields were captured using a Leica DFC310FX camera at 200 $\times$  magnification for morphological analysis.

ImageJ software v1.52t (NIH, Bethesda, MD, USA) was used to analyze cellular density and the morphology of CECs cultures in ZO-1 and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase immunofluorescences ( $n = 6$  for each group). The total number of cells was manually counted by two independent observers in the 5 photos captured, and morphometric data of the area, perimeter and circularity were manually measured by tracing cell borders in 2 random images. Cell circularity index was calculated as  $\frac{4\pi \cdot \text{area}}{\text{perimeter}^2}$ . The mean value and Standard Error of Mean (SEM) for each group were calculated.

### Characterization of barrier function: Trans-endothelial Electrical Resistance (TER)

A pair of Ag/AgCl probes and a Millicell-ERS2 volt-ohm meter (Merck) were used, according to the manufacturer guidelines, to evaluate the TER of confluent CECs cultures. TER value ( $\Omega\text{cm}^2$ ) was calculated using the following equation:

$$\text{TER} = (R_{\text{sample}} - R_{\text{blank}}) \times \text{effective area}$$

$R_{\text{sample}}$  : resistance value of the inserts with cultured CECs.

$R_{\text{blank}}$  : resistance value of the inserts without cultured CECs.

Effective area : 1.12  $\text{cm}^2$ .

All measurements ( $n = 9$  for each group) were carried out in triplicate (three consecutive times in each culture), and the mean value and the SEM were calculated.

GENE	ID	FORWARD	REVERSE
<i>TJP1</i>	NM_001301025.3	5'-CAGCAACTTTCAGACCACCA-3'	5'-GTGCAGTTTCACTTGGCAGA-3'
<i>ATP1A1</i>	NM_000701.8	5'-TCCCAATTCACCTGTTGGGC-3'	5'-TGCACCACCACGATACTGAC-3'
<i>CX43</i>	NM_000165.5	5'-AGGAGTTCAATCACTTGGCGT-3'	5'-TACTGACAGCCACACCTTCC-3'
<i>VIM</i>	NM_003380.5	5'-CTCCCTGAACCTGAGGGAAACT-3'	5'-AGGTCACGTGATGCTGAGAAG-3'
<i>ACTB</i>	NM_001101.5	5'-ATTCCAAATATGAGATGCGTTGTT-3'	5'-GTGGACTTGGGAGGAGACTG-3'

**Table 4.** Primers used in the qPCR analysis.

### RNA isolation and sequencing (RNAseq)

To obtain transcriptome data, mRNA sequencing analysis was performed on the Illumina sequencing platform. Total RNA from confluent cultures of CECs (n = 4 for each group) was extracted using the Pico Pure™ RNA isolation kit (Catalog number: KIT0202, Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Sample quality was checked on Agilent BioAnalyzer (Catalog number: G2939BA, Agilent) using Eukaryotic Total RNA Nano Kit (Catalog number: 5067–1511, Agilent) according to the Manufacturer's protocol. The samples with RNA integrity number (RIN) value > 8 were accepted for the library preparation. The libraries were prepared from total RNA with NEBNext® Ultra™ II RNA Library Prep for Illumina (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) according to the manufacturer's protocol. Sequencing runs were executed on an Illumina NextSeq500 instrument (Illumina, San Diego, CA, USA) using single-end 75 cycles sequencing.

Native endothelium samples (DRR228774, DRR228775, DRR228778, DRR228780) FastQ files were downloaded from Sequence Read Archive (SRA). Reads were mapped to the human reference genome (GRCh38) using the default parameters of STAR v2.5.4. The quality control of the FastQ and BAM files was performed with MultiQC v1.13. Based on transcriptome alignment, as well as the genome alignment, featureCounts (Subread-v2.0.2) was used for obtaining the read counting to genes. Subsequent analysis was performed in R v4.2.2 and packages. Differential analysis was done with DESeq2 version 1.38.3.

Our data were also compared with public data from the study by Tokuda et al.<sup>43</sup> Briefly in this study the data were obtained from CorneaGen corneas with a mean age of 61.14 years, All corneas had been stored at 4 °C in storage medium (Optisol-GS; Bausch & Lomb, Rochester, NY, USA) for less than 14 days before use for the experiments. Descemet's membrane, including the corneal endothelium, was removed from the donor corneas. The corneal endothelium was then lysed in 700 µL of QIAzol lysis reagent (Qiagen, Venlo, Netherlands). Total RNA was extracted from each corneal endothelium with an RNeasy Mini Kit (Qiagen) and RNA-Seq libraries for next-generation sequencing were generated with a SMARTer Stranded Total RNA-Seq Kit v2—Pico Input Mammalian (Takara Bio Inc., Shiga, Japan).

### mRNA isolation and quantitative PCR (qPCR)

Confluent CECs (n = 7 for each group) were digested with TrypLE®. Total RNA from CECs was extracted using the Pico Pure™ RNA isolation kit from Applied Biosystems™. The purity of the RNA was then checked by the A260/A280 and A260/A230 ratios. Next, total RNA was used for linear conversion of RNA to cDNA with High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Catalog number: 4387406, Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions. Primers (Table 4) were customized using PrimerBLAST and synthesized by Merck. Gene expression was performed by relative quantification in a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using a Power SYBR Green PCR Master Mix (Catalog number: 4367659, Applied Biosystems) and the  $\Delta\Delta C_t$  method. Each sample was analyzed in triplicate for each of the experiments, and the mean value and the SEM for each group were calculated. Data were analyzed using SDS 2.3 software (Applied Biosystems).

### Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism v8.0.1 (GraphPad, San Diego, CA, USA). The normal distribution of tested values was assessed by the Shapiro–Wilk test. Significant differences among defined groups were checked using parametric tests (t-student or ANOVA test). Differential levels with  $p < 0.05$  were statistically significant, and  $p < 0.01$  was statistically very significant. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM.

### Data availability

The RNA-seq data presented in this article have been deposited in GEO under accession number GSE228460.

Received: 12 July 2023; Accepted: 2 November 2023

Published online: 09 November 2023

### References

- Tuft, S. J. & Coster, D. J. The corneal endothelium. *Eye (Lond)* **4**(Pt 3), 389–424 (1990).
- Capella, J. A. & Kaufman, H. E. Human corneal endothelium. *Doc. Ophthalmol.* **26**, 1–8 (1969).
- Barfort, P. & Maurice, D. Electrical potential and fluid transport across the corneal endothelium. *Exp. Eye Res.* **19**, 11–19 (1974).
- Feizi, S. Corneal endothelial cell dysfunction: etiologies and management. *Ther. Adv. Ophthalmol.* **10**, 2515841418815802 (2018).
- Sahay, P. et al. Shaped corneal transplantation surgery. *Br. J. Ophthalmol.* **105**, 9–16 (2021).
- McGhee, C. N. J. & Zhang, J. Conserving, restoring and replacing the human corneal endothelium in 2020: Is a clear future here today?. *Clin. Exp. Ophthalmol.* **48**, 155–157 (2020).

7. Singh, R., Gupta, N., Vanathi, M. & Tandon, R. Corneal transplantation in the modern era. *Indian J. Med. Res.* **150**, 7–22 (2019).
8. Gain, P. *et al.* Global survey of corneal transplantation and eye banking. *JAMA Ophthalmol.* **134**, 167–173 (2016).
9. Nuzzi, R., Marolo, P. & Tridico, F. From DMEK to corneal endothelial cell therapy: Technical and biological aspects. *J. Ophthalmol.* **2018**, 6482095 (2018).
10. Peh, G. S. L. *et al.* Functional evaluation of two corneal endothelial cell-based therapies: Tissue-engineered construct and cell injection. *Sci. Rep.* **9**, 6087 (2019).
11. Vázquez, N. *et al.* Silk fibroin films for corneal endothelial regeneration: Transplant in a rabbit descemet membrane endothelial keratoplasty. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **58**, 3357–3365 (2017).
12. Yoshida, J. *et al.* Transplantation of human corneal endothelial cells cultured on bio-engineered collagen vitrigel in a rabbit model of corneal endothelial dysfunction. *Curr. Eye Res.* **42**, 1420–1425 (2017).
13. Vázquez, N. *et al.* Human bone derived collagen for the development of an artificial corneal endothelial graft. In vivo results in a rabbit model. *PLoS One* **11**, e0167578 (2016).
14. Khalili, M. *et al.* Corneal endothelium tissue engineering: An evolution of signaling molecules, cells, and scaffolds toward 3D bioprinting and cell sheets. *J. Cell Physiol.* <https://doi.org/10.1002/jcp.30085> (2020).
15. Parekh, M., Van den Bogerd, B., Zakaria, N., Ponzin, D. & Ferrari, S. Fish scale-derived scaffolds for culturing human corneal endothelial cells. *Stem Cells Int.* **2018**, 8146834 (2018).
16. Bayyoud, T. *et al.* Decellularized bovine corneal posterior lamellae as carrier matrix for cultivated human corneal endothelial cells. *Curr. Eye Res.* **37**, 179–186 (2012).
17. Yoeruek, E. *et al.* Human anterior lens capsule as carrier matrix for cultivated human corneal endothelial cells. *Cornea* **28**, 416–420 (2009).
18. Zhao, J., Tian, M., Li, Y., Su, W. & Fan, T. Construction of tissue-engineered human corneal endothelium for corneal endothelial regeneration using a crosslinked amniotic membrane scaffold. *Acta Biomater.* **147**, 185–197 (2022).
19. Van den Bogerd, B., Ni Dhubbghaill, S. & Zakaria, N. Characterizing human decellularized crystalline lens capsules as a scaffold for corneal endothelial tissue engineering. *J. Tiss. Eng. Regen. Med.* **12**, e2020–e2028 (2018).
20. Kinoshita, S. *et al.* Injection of Cultured Cells with a ROCK Inhibitor for Bullous Keratopathy. *N. Engl. J. Med.* **378**, 995–1003 (2018).
21. Numa, K. *et al.* Five-year follow-up of first 11 patients undergoing injection of cultured corneal endothelial cells for corneal endothelial failure. *Ophthalmology* **128**, 504–514 (2021).
22. Ting, D. S. J., Peh, G. S. L., Adnan, K. & Mehta, J. S. Translational and regulatory challenges of corneal endothelial cell therapy: A global perspective. *Tiss. Eng. Part B Rev.* **28**, 52–62 (2022).
23. Wong, E. N. & Mehta, J. S. Cell therapy in corneal endothelial disease. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **33**, 275–281 (2022).
24. Yu, W. Y. *et al.* Progenitors for the corneal endothelium and trabecular meshwork: a potential source for personalized stem cell therapy in corneal endothelial diseases and glaucoma. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 412743 (2011).
25. Kitazawa, K., Sotozono, C. & Kinoshita, S. Current advancements in corneal cell-based therapy. *Asia Pac. J. Ophthalmol. (Phila)* **11**, 335–345 (2022).
26. Rolev, K., Coussons, P., King, L. & Rajan, M. Experimental models of corneal endothelial cell therapy and translational challenges to clinical practice. *Exp. Eye Res.* **188**, 107794 (2019).
27. Joyce, N. C. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog. Retin. Eye Res.* **22**, 359–389 (2003).
28. Català, P. *et al.* Approaches for corneal endothelium regenerative medicine. *Prog. Retin. Eye Res.* **87**, 100987 (2022).
29. Smeringaiova, I., Utheim, T. P. & Jirsova, K. Ex vivo expansion and characterization of human corneal endothelium for transplantation: A review. *Stem Cell Res. Ther.* **12**, 554 (2021).
30. EMA. Use of bovine serum in the manufacture human biological medicinal products - Scientific guideline. *European Medicines Agency* <https://www.ema.europa.eu/en/use-bovine-serum-manufacture-human-biological-medicinal-products-scientific-guide-line> (2018).
31. Thieme, D., Reuland, L., Lindl, T., Kruse, F. & Fuchsluger, T. Optimized human platelet lysate as novel basis for a serum-, xeno-, and additive-free corneal endothelial cell and tissue culture. *J. Tiss. Eng. Regen. Med.* **12**, 557–564 (2018).
32. Mishan, M. A. *et al.* Potential effect of human platelet lysate on in vitro expansion of human corneal endothelial cells compared with Y-27632 ROCK inhibitor. *J. Ophthalm. Vis. Res.* **16**, 349–356 (2021).
33. Wang, T.-J. *et al.* Comparison of three human platelet lysates used as supplements for in vitro expansion of corneal endothelium cells. *Transfus. Apher. Sci.* **56**, 769–773 (2017).
34. Petsoglou, C. *et al.* Effects of human platelet lysate on the growth of cultured human corneal endothelial cells. *Exp. Eye Res.* **208**, 108613 (2021).
35. Anitua, E. *et al.* High-throughput proteomic characterization of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret)-derived fibrin clot interactome. *J. Tiss. Eng. Regen. Med.* **9**, E1–12 (2015).
36. Anitua, E. *et al.* Proteomic characterization of plasma rich in growth factors and undiluted autologous serum. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 12176 (2021).
37. Anitua, E. *et al.* Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) reduces neuropathologic hallmarks and improves cognitive functions in an Alzheimer's disease mouse model. *Neurobiol. Aging* **35**, 1582–1595 (2014).
38. López-Plandolit, S., Morales, M.-C., Freire, V., Etxebarria, J. & Durán, J. A. Plasma rich in growth factors as a therapeutic agent for persistent corneal epithelial defects. *Cornea* **29**, 843–848 (2010).
39. López-Plandolit, S., Morales, M.-C., Freire, V., Grau, A. E. & Durán, J. A. Efficacy of plasma rich in growth factors for the treatment of dry eye. *Cornea* **30**, 1312–1317 (2011).
40. Anitua, E. *et al.* Development and optimization of freeze-dried eye drops derived from plasma rich in growth factors technology. *Transl. Vis. Sci. Technol.* **9**, 35 (2020).
41. Anitua, E. *et al.* Progress in the use of plasma rich in growth factors in ophthalmology: From ocular surface to ocular fundus. *Expert. Opin. Biol. Ther.* **22**, 31–45 (2022).
42. Anitua, E. *et al.* Plasma rich in growth factors (PRGF) eye drops stimulates scarless regeneration compared to autologous serum in the ocular surface stromal fibroblasts. *Exp. Eye Res.* **135**, 118–126 (2015).
43. Tokuda, Y. *et al.* Transcriptome dataset of human corneal endothelium based on ribosomal RNA-depleted RNA-Seq data. *Sci. Data* **7**, 407 (2020).
44. Wongvisavavit, R., Parekh, M., Ahmad, S. & Daniels, J. T. Challenges in corneal endothelial cell culture. *Regen. Med.* **16**, 871–891 (2021).
45. Sundin, M. *et al.* No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica* **92**, 1208–1215 (2007).
46. Peh, G. S. L. *et al.* Optimization of human corneal endothelial cell culture: density dependency of successful cultures in vitro. *BMC Res. Notes* **6**, 176 (2013).
47. Srinivas, S. P. Dynamic regulation of barrier integrity of the corneal endothelium. *Optom. Vis. Sci.* **87**, E239–254 (2010).
48. Thériault, M., Gendron, S. P., Brunette, I., Rochette, P. J. & Proulx, S. Function-related protein expression in fuchs endothelial corneal dystrophy cells and tissue models. *Am. J. Pathol.* **188**, 1703–1712 (2018).
49. Frausto, R. F., Le, D. J. & Aldave, A. J. Transcriptomic analysis of cultured corneal endothelial cells as a validation for their use in cell replacement therapy. *Cell Transpl.* **25**, 1159–1176 (2016).

50. Frausto, R. F. *et al.* Phenotypic and functional characterization of corneal endothelial cells during in vitro expansion. *Sci. Rep.* **10**, 7402 (2020).
51. Nishiyama, K. *et al.* Basic characteristics of plasma rich in growth factors (PRGF): Blood cell components and biological effects. *Clin. Exp. Dent. Res.* **2**, 96–103 (2016).
52. Parekh, M. *et al.* Increasing donor endothelial cell pool by culturing cells from discarded pieces of human donor corneas for regenerative treatments. *J. Ophthalmol.* **2019**, 2525384 (2019).
53. Parekh, M. *et al.* Culturing discarded peripheral human corneal endothelial cells from the tissues deemed for preloaded DMEK transplants. *Cornea* **38**, 1175–1181 (2019).
54. Anitua, E. *et al.* Autologous serum and plasma rich in growth factors in ophthalmology: Preclinical and clinical studies. *Acta Ophthalmol* **93**, e605–614 (2015).

## Acknowledgements

The authors wish to thank the staff of the tissue bank (Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias) and the nursing staff of the Instituto Oftalmológico Fernández-Vega for help with the experiments. Additionally, European Union's Horizon 2020 research and innovation program under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 860034 supported N.C.-S. Work in the laboratory of LN is supported by grants from the National Institutes of Health – National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (R01-DK115924, R01-DK124782). S.A.-A's visit to the University of Debrecen was supported by Hungarian Scientific Research Fund KKP 129909.

## Author contributions

Conceptualization: S.A.A., N.V., A.M. Methodology: S.A.A., N.V., B.A.B., A.M. Formal analysis: S.A.A., N.V., N.C.S., S.O.A., C.S., A.M. Investigation: S.A.A., N.V., M.C., N.C.S., Data curation: S.A.A., N.V., N.C.S., S.O.A., C.S. Writing—original draft preparation: S.A.A., A.M., N.V., N.C.S. Writing—review, and editing: S.A.A., N.V., M.C., N.C.S., S.O.A., C.S., B.A.B., L.F.V.C., L.N., J.M.L., A.M. Resources: L.F.V.C., L.N., J.M.L., A.M. Funding acquisition: L.F.V.C., L.N., J.M.L., A.M. Supervision: L.N., J.M.L., A.M., N.V. Software: N.C.S.

## Funding

This research was funded in part by Programa Jovellanos, Gobierno del Principado de Asturias, Fondo Europeo de desarrollo regional, Unión Europea (IDI/2021/000171-AYUD/2021/57056); Fundación Telefónica; European Union's Horizon 2020 research and innovation program under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 860034; The National Institutes of Health – National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (R01-DK115924, R01-DK124782) and Hungarian Scientific Research Fund KKP 129909.

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

## Additional information

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to N.V.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023



**UNIVERSITY of  
DEBRECEN**

**FACULTY OF MEDICINE**  
**Department of Biochemistry and Molecular Biology**  
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1. P.O.B. 400.  
Phone: +3652/416-432, email: [bmbi@med.unideb.hu](mailto:bmbi@med.unideb.hu)

---

**November 30. 2022**

**To whom it may concern:**

I hereby certify that *Mr. Sergio Alonso-Alonso* has carried out collaborative research work ousing Next Generation bulk RNA-sequencing and related bioinformatic analyses at the Nuclear Receptor Research Laboratory, in the Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Debrecen, Hungary between October 9<sup>th</sup>, 2021 and December 30<sup>th</sup>, 2021.

His devotion and contribution is much appreciated.

If there are further questions, please do not hesitate to contact my office.

Sincerely yours,

Laszlo Nagy, M.D., Ph.D.

Professor of Biochemistry and Molecular Biology

**Laszlo Nagy, M.D., Ph.D.**

Professor of Medicine  
Department of Medicine, Division of Endocrinology, Diabetes and Metabolism  
Department of Biological Chemistry  
Associate Director, Center for Metabolic Origins of Disease  
Johns Hopkins University School of Medicine

Co-Director, Institute for Fundamental Biomedical Research  
Johns Hopkins All Children's Hospital



November 30<sup>th</sup>, 2022,

To Whom It May Concern

I am certifying that Mr. Sergio Alonso-Alonso has visited my research laboratory at the Institute for Fundamental Biomedical Research at Johns Hopkins All Childrens Hospital in St. Petersburg, FL USA between May 5 till May 14 2022. He has contributed to our studies on the analyses of tissue and inflammatory macrophages in homeostasis and tissue repair.

His contribution is much appreciated.

In case of further questions please do not hesitate to contact my office.  
Sincerely yours,

A handwritten signature in blue ink that reads "Laszlo Nagy". The signature is written in a cursive style.

Laszlo Nagy

LN:lt



**Laszlo Nagy, M.D., Ph.D.**  
Professor of Medicine  
Department of Medicine, Division of Endocrinology, Diabetes and Metabolism  
Department of Biological Chemistry  
Associate Director, Center for Metabolic Origins of Disease  
Johns Hopkins University School of Medicine  
Co-Director, Institute for Fundamental Biomedical Research  
Johns Hopkins All Children's Hospital



03/18/2024

## CERTIFICATION OF INTERNATIONAL STAY

Visiting PhD Student: Sergio Sergio Alonso, [sergioluanco@hotmail.com](mailto:sergioluanco@hotmail.com)  
(Name, e-mail)

Work place of Visiting PhD Student: Department of General Biophysics, University of Oviedo, Asturias, Spain  
(Home institution)

Title of the project: Role of heme regulated factors in the inflammatory response of alveolar macrophages.

Duration of the stay: 04.28.2023 – 05.16.2023

Data of the host institution: Johns Hopkins School of Medicine, Department of Medicine, Institute for Fundamental Biomedical Research, 5<sup>th</sup> Street South 600, 33701 Saint Petersburg, Florida, USA  
(Name, address, contact data)

Data of the Supervisor: Dr Laszlo Nagy, Co-Director, Institute for Fundamental Biomedical Research, [lnagy@jhmi.edu](mailto:lnagy@jhmi.edu); tel: +1-727-767-8928  
(Name, position, contact data)

Work place of Supervisor: Johns Hopkins School of Medicine, Department of Medicine, Institute for Fundamental Biomedical Research, 5th Street South 600, 3rd Floor Rm. 3109, 33701 Saint Petersburg, Florida, USA  
(Name, address, contact data)

I hereby confirm that Sergio Sergio Alonso (Visiting PhD Student) from the University of Oviedo in Asturias, Spain (Work place of Visiting PhD Student), has carried out experiments and learned molecular and cell biology methods to study the role of BACH1, a heme-regulated transcriptional repressor in the inflammatory responses and tissue regeneration of alveolar macrophages in mice.

.....  
Supervisor: Dr. Laszlo Nagy, M.D., Ph.D.