



Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud
Investigación en Oftalmología y Ciencias de la Visión

Tesis Doctoral

Desarrollo de dos Medicamentos de Terapias Avanzadas para el tratamiento de lesiones en la superficie ocular

Trabajo de investigación realizado por **Doña Mairobi Persinal
Medina** para optar al Grado de Doctor por la Universidad de
Oviedo

Oviedo, septiembre de 2023



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Desarrollo de dos Medicamentos de Terapias Avanzadas para el tratamiento de lesiones en la superficie ocular	Inglés: Development of two Advanced Therapy Medicinal Products to treat injuries on the ocular surface
2.- Autor	
Nombre: Mairobi Persinal Medina	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Ciencias de la Salud	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado	

RESUMEN (en español)

En este estudio, se investigó el uso de la tecnología Endoret®(PRGF®) junto con el cultivo de células madre adultas obtenidas a partir de tejido adiposo y mucosa oral como alternativas al trasplante de células madre epiteliales obtenidas del tejido limbal en el tratamiento de lesiones por quemadura química para evitar el desarrollo de la insuficiencia límbica (LSCD). Los objetivos fueron desarrollar un sistema de cultivo autólogo que permita expandir y trasplantar estas células, estudiar la viabilidad de ambas terapias en un modelo experimental de ratón y su eficacia en un modelo experimental de lesión por quemadura alcalina en conejos.

Se recogieron muestras de sangre, tejido adiposo y mucosa oral de donantes humanos. La sangre se utilizó para preparar factores de crecimiento y membranas de fibrina usando el kit Endoret®(PRGF®). Las células se expandieron en cultivo utilizando medios suplementados con estos factores y se caracterizaron como células madre mesenquimales (MSC) y células madre epiteliales de la mucosa oral (OMESC) mediante distintas técnicas. Las MSC y las OMEC se cultivaron sobre membranas de fibrina y se trasplantaron a nivel subcutáneo en ratones atímicos. Los injertos en ratones fueron estudiados mediante técnicas histológicas para analizar la viabilidad de las células. Se replicaron ambas terapias empleando sangre, tejido adiposo y mucosa oral de conejos, se caracterizaron de manera similar a las humanas, y se trasplantaron sobre la superficie corneal de conejos con una lesión previa por quemadura alcalina. Las córneas tratadas de los conejos fueron estudiadas clínicamente (opacidad, neovascularización, penachos fibrovasculares y defectos epiteliales) e histológicamente (tinción de hematoxilina-eosina, tinción de Schiff e inmunohistoquímica). Los resultados fueron comparados con córneas lesionadas sin tratamiento (control) y con córneas lesionadas tratadas con una membrana de fibrina humana.

Las MSC y las OMEC humanas se expandieron a partir de sus tejidos, con factores de crecimientos y sobre membrana de fibrina obtenidos con la tecnología Endoret®(PRGF®). Las MSC humanas mostraron morfología tipo fibroblástica, con expresión de CD105, CD90 y CD73 y con capacidad de diferenciación multilineaje. Las OMEC humanas mostraron fenotipo tipo epitelial y con expresión de p63 y CK5. Ambas estirpes celulares permanecen viables tras 21 días de trasplante, sin producir inflamación ni alteraciones patológicas locales en el tejido subcutáneo murino. Así mismo, las MSC y las OMEC de conejo se pudieron expandir y caracterizar de manera similar a sus homólogas humanas. Los resultados mostraron que las MSC y las OMEC de conejo expandidas conservaron su morfología y fenotipo característicos antes del trasplante. Después del seguimiento de 42 días, las córneas tratadas con las MSC y las OMEC mostraron remisión de los signos patológicos, presentando córneas transparentes con una histología y fenotipo normales, y con ninguna o mínimas secuelas. Mientras que las córneas del grupo control y tratadas solo con membrana de fibrina mostraron empeoramiento de su dinámica inicial (aumento de opacidad, neovascularización, penachos fibrovasculares y defectos epiteliales) con alteraciones morfológicas y fenotípicas características de la LSCD.

En conclusión, las MSC y las OMEC pueden ser obtenidas, cultivadas y trasplantadas en condiciones autólogas empleando tejidos adultos y la tecnología Endoret®(PRGF®) como alternativa al tejido limbar y a los componentes xenogénicos y alogénicos tradicionales. Este sistema autólogo



Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud
Investigación en Oftalmología y Ciencias de la Visión

Tesis Doctoral

**Desarrollo de dos Medicamentos de Terapias
Avanzadas para el tratamiento de
lesiones en la superficie ocular**

Trabajo de investigación realizado por

Doña Mairobi Persinal Medina

para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Oviedo

Oviedo, septiembre de 2023



Instituto
Universitario
Fernández-Vega

*A mi hermano Fidel.
A mis padres y a mi familia.
A Andrés.*

Empecé mi carrera científica en 2015, apenas graduada en Biotecnología, con unas prácticas extracurriculares en la Fundación de Investigación Oftalmológica, y desde entonces he tenido la suerte de conocer, convivir y trabajar con muchas personas de distintas edades, culturas, lugares, profesiones, empresas/laboratorios, experiencias, personalidades... Y más suerte aún, de alcanzar mis metas académicas con el apoyo de algunas personas a las que siempre les estaré enormemente agradecida. A todos y cada uno de ellos les digo “gracias por formar parte de mi historia”, porque cada experiencia ha sido un aprendizaje constructivo para ser mejor científica y convertirme en la persona que soy y que quiero ser.

Prof. Jesús Merayo Lloves, gracias por darme la oportunidad de formar parte de su equipo donde aprendí y crecí. Aprecio profundamente su determinación en ayudarme. Sus desafíos constantes me han hecho crecer más de lo que habría imaginado.

Dra. Sara Gómez Llames, gracias cada hora que me ha dedicado, sus consejos, su apoyo constante y todo lo que he podido aprender con usted durante estos años.

Dr. Álvaro Meana, gracias por acompañarme desde mi primer día, sus virtudes, su paciencia y constancia han hecho posible este trabajo, y ha sido una inspiración para mí tanto en la Ciencia como en la Medicina. No siempre ha sido fácil, pero sus exigencias han sido la chispa que encendió mi motivación y me hizo esforzarme aún más.

Muy queridos míos: Carlos, Claudia, Carlota, Joana, Eva, Raquel, Nagore, Omar, Montse, Héctor, Enol, Ana, Sergio y Lola; gracias por ser grandes compañeros dentro del laboratorio y mejores amigos fuera de éste. Habéis sido un gran apoyo todos estos años, y me hace muy feliz recordar los días de mis calendarios pasados por los recuerdos que tenemos juntos.

A todos los compañeros de la FIO, los que estuvieron y los que aún siguen, gracias por prestarme vuestra experiencia y ayudarme cada vez que acudí a vosotros. En especial, gracias a Manuel por toda tu ayuda, tus enseñanzas y por escucharme cuando estaba bloqueada en mis experimentos. Y gracias a Nacho por todo lo que me has enseñado de la histología.

Gracias a los colegas del Centro Comunitario de Sangre y Tejidos, del Bioterio de la Universidad de Oviedo, del Instituto Oftalmológico Fernández Vega y del Tecnológico de Monterrey por vuestra ayuda y colaboración. En especial, gracias a la Dra. Marta, Paz, Rosana, Agustín, Dra. Teresa, Silvia Canga, Ramón, al Dr. Luis Fernández Vega Cueto

AGRADECIMIENTOS

Felgueroso, la Dra. Belén Alfonso, el Dr. Edmar Uribe, el Dr. Carlos Fernández Vega, la Dra. Judith Zavala y la Dra. Silvia Berisa.

También, quiero pedir os disculpas, porque hubo momentos complicados. Os pido perdón si en algún momento os disgusté o mi manera de obrar os molestó en aquellos momentos difíciles de desacuerdos o de mucho trabajo y presión. Gracias a todo esto, he aprendido a adaptarme y a ser resolutiva.

Y finalmente, a mi familia y amigos os digo, sois la parte más importante. Soy consciente de que el camino que escogí es largo y tiene muchas dificultades y privaciones. Os pido perdón por aquellos días y fines de semana que me ausenté, aquellas vacaciones que no fui, y aquellas celebraciones que me perdí. Mi gratitud hacia todos vosotros es inmensurable. Os doy las gracias por escucharme siempre, apoyarme y hacerme sentir tan especial como me siento, os amo:

A mi hermano Fidel, gracias por tu apoyo emocional y la energía positiva que siempre me brindas.

A mi mamá (Maira), mi papá (Lolo) y mis padrinos (Loli y Marcial), vuestra sabiduría y paciencia infinita me han guiado a lo largo de los años. Vuestros consejos y palabras de aliento siempre llegaron en el momento justo.

A mis amigos de siempre (Sara, Sergio, Cris, Carmen, Natalia, Paula) y a los que habéis llegado a mi vida más recientemente (amigos y compañeros médicos), gracias por escucharme y animarme en cada momento. Aún nos quedan muchos capítulos más por disfrutar juntos.

A Andrés, quien está a mi lado en este largo viaje. Tu amor, comprensión y sacrificio son mi mayor motivación. A tu familia, Dra Pino y Dr Andrés, me siento muy afortunada de conocerlos y de contar con vuestros consejos, para mí, sois un ejemplo a seguir como médicos y como personas.

¡Gracias!

1. ÍNDICE

1.	ÍNDICE	15
2.	ABREVIATURAS.....	21
3.	INTRODUCCIÓN.....	29
3.1.	SUPERFICIE OCULAR.....	31
3.1.1.	Córnea	32
	a) Anatomía y fisiología.....	32
	b) Histología.....	33
	c) Epitelio corneal	37
3.1.2.	Limbo.....	41
	a) Anatomía y fisiología.....	41
	b) Histología.....	42
3.1.3.	Conjuntiva bulbar	42
	a) Anatomía y fisiología.....	42
	b) Histología.....	43
3.2.	TRAUMATISMO OCULAR Y DEFICIENCIA DE CÉLULAS MADRE LIMBARES	45
3.2.1.	Traumatismos oculares.....	45
3.2.2.	Causticación	45
3.2.3.	Fisiopatología de la causticación alcalina	45
3.2.4.	Deficiencia de células madre limbares	47
3.2.5.	Epidemiología.....	47
	a) Traumatismo ocular.....	47
	b) Traumatismo ocular y deficiencia de células madre limbares	48
3.2.6.	Factores de riesgos.....	48
3.2.7.	Diagnóstico	48
3.2.8.	Abordajes terapéuticos	50
4.	JUSTIFICACIÓN.....	57
5.	HIPÓTESIS.....	61
6.	OBJETIVOS.....	65
7.	MATERIAL Y MÉTODO	69

7.1. MEDICAMENTOS DE TERAPIAS AVANZADAS HUMANOS LIBRES DE FACTORES XENOGÉNICOS.....	71
7.1.1. Preparación del PRGF humano para cultivo celular	71
a) Obtención de sangre completa	71
b) Preparación del plasma sanguíneo	71
c) Preparación del PRGF como suplemento para el medio de cultivo.....	71
d) Preparación del PRGF como soporte celular para el trasplante	72
7.1.2. Obtención de tejidos	73
7.1.3. Cultivo y caracterización de MSC.....	73
a) Cultivo primario de MSC	73
b) Caracterización de las MSC.....	75
7.1.4. Cultivo y caracterización de OMESC.....	77
a) Cultivo primario de OMESC.....	77
b) IF.....	78
7.1.5. Implantes oculares de células madre humanas.....	78
a) Preparación del implante ocular	78
b) IF.....	80
7.1.6. Animales	80
7.1.7. Estudio <i>in vivo</i> de los MTAs humanos.....	81
a) Trasplante subcutáneo en ratón atómico.....	81
b) Preparación de secciones histológicas.....	82
c) Tinción con hematoxilina-eosina.....	82
d) Inmunohistoquímica.....	82
7.2. ENSAYO PRECLÍNICO DE LOS MTA.....	84
7.2.1. Diseño experimental.....	84
7.2.2. Preparación de PRGF de conejo para cultivo celular.....	85
a) Obtención de sangre completa	85
b) Preparación del plasma sanguíneo	85
c) Preparación del PRGF como suplemento para los medios de cultivo.....	85
d) Preparación del PRGF como soporte celular para el trasplante	86
7.2.3. Cultivo por explante de tejidos de conejo.....	86

a) Obtención de tejidos	86
b) Cultivo y caracterización de MSC de conejo	86
c) Cultivo primario y caracterización de OMESC.....	87
7.2.4. Implantes oculares de células madre de conejo	87
a) Preparación del implante ocular	87
b) IF.....	88
7.2.5. Trasplante de los implantes oculares de conejo	88
a) Anestesia.....	88
b) Modelo de conejo con traumatismo por causticación alcalina	88
c) Evaluación clínica y tratamiento del traumatismo por causticación alcalina	89
d) Análisis de los resultados clínicos.....	91
e) Punto final del estudio.....	91
7.2.6. Histología	91
a) Tinción de hematoxilina-eosina.....	91
b) Técnica de Schiff.....	91
7.2.7. Inmunohistoquímica	92
7.2.8. Análisis estadístico	92
8. RESULTADOS	93
8.1. MEDICAMENTOS DE TERAPIAS AVANZADAS HUMANOS LIBRES DE FACTORES XENOGÉNICOS.....	95
8.1.1. Plasma rico en factores de crecimiento humano	95
8.1.2. Cultivo, caracterización e implante ocular de MSC humanas.....	96
a) Cultivo primario de MSC	96
b) Caracterización de MSC	97
c) Implante ocular de MSC.....	100
8.1.3. Cultivo, caracterización e implante ocular de OMESC humanas	100
a) Cultivo primario de OMESC.....	100
b) Caracterización de OMESC.....	101
c) Implante ocular de OMESC.....	101
8.1.4. Estudio <i>in vivo</i> de los MTA humanos.....	102
8.2. ENSAYO PRECLÍNICO DE LOS MTA	104

8.2.1. Cultivo, caracterización e implante ocular de MSC de conejo..... 104

 a) Cultivo primario y caracterización de MSC..... 104

 b) Implante ocular de MSC..... 105

8.2.2. Cultivo, caracterización e implante ocular de OMESC de conejo 106

 a) Cultivo primario y caracterización de OMESC 106

 b) Implante ocular de OMESC 106

8.2.3. Traumatismos ocular por causticación alcalina 107

8.2.4. Análisis clínico..... 109

8.2.5. Análisis histológico 113

8.2.6. Análisis fenotípico 117

9. DISCUSIÓN 127

10. CONCLUSIONES..... 145

11. HITOS..... 149

12. BIBLIOGRAFÍA..... 153

13. ANEXOS 173

14. DIVULGACIÓN CIENTÍFICA..... 183

15. FINANCIACIÓN 230

2. ABREVIATURAS

A

A	arteria
ABC	viene de las siglas en inglés de <i>ATP-binding cassette</i> .
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.
AIC	ángulo iridocorneal.
APC	viene de las siglas en inglés de <i>Allophycocyanin</i> , traducido como ‘aloficocianina’ en castellano.

B

BSS	viene de las siglas en inglés de <i>Balanced Salt Solution</i> , traducido como ‘solución salina balanceada’ en castellano.
BTI	Biotechnology Institute.

C

CA	cámara anterior.
CC	córnea central.
CD	del inglés <i>Cluster of Differentiation</i> , traducido como ‘grupo o antígeno de diferenciación’ en castellano.
CK	citoqueratina.
CKhmw	viene de las siglas en inglés de <i>High Molecular Weight Cytokeratins</i> , traducido como ‘citoqueratinas de alto peso molecular’ en castellano.
CLAU	del inglés <i>Conjunctival- limbal autograft</i> , traducido como ‘autoinjerto conjuntival-limbal’ en castellano.
CLET	viene de las siglas en inglés de <i>Cultured limbal epithelial transplantation</i> , traducido como ‘trasplante de epitelio limbal cultivado’ en castellano.
Co	conejo.
CONJ	conjuntiva.
COR	córnea.
CP	córnea periférica.

D

DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol.
DH	diámetro horizontal.

DMEM	viene de las siglas en inglés de <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> , traducido como 'medio de Eagle modificado de Dulbecco' en castellano.
DMSO	dimetilsulfóxido.
DV	diámetro vertical.
E	
ECO	espesor de la córnea.
EGF	viene de las siglas en inglés de <i>Epidermal Growth Factor</i> , traducido como 'factor de crecimiento epitelial' en castellano.
EMA	European Medicines Agency
F	
FG	viene de las siglas en inglés de <i>Fibrin Glue</i> , traducido como 'pegamento de fibrina' en castellano.
FGF	viene de las siglas en inglés de <i>Fibroblast Growth Factor</i> , traducido como 'factor de crecimiento de fibroblastos' en castellano.
FITC	viene de las siglas en inglés de <i>Fluorescein-5-isotiocyanate</i> , traducido como 'fluoresceína-5-isotiocianato' en castellano.
FSC	viene de las siglas en inglés de <i>Forward scatter</i> , traducido como 'detector de dispersión frontal' en castellano.
F1	fracción superior de la columna de plasma sanguíneo humano.
F12	viene del nombre en inglés de <i>Ham's F12 nutrient mixture</i> , traducido como 'mezcla de nutrientes F12 de Ham' en castellano.
F2	fracción inferior de la columna de plasma sanguíneo humano.
G	
GCM	grupo control tratado con una membrana de fibrina de PRGF humano.
GCTM	grupo control tratado con tratamiento médico exclusivo.
GMSC	grupo tratado con MSC.
GOMESC	grupo tratado con OMESC.
H	
H&E	hematoxilina y eosina.

HGF	viene de las siglas en inglés de <i>Hepatocyte Growth Factor</i> , traducido como ‘factor de crecimiento de hepatocitos’ en castellano.
HLA	viene de las siglas en inglés de <i>Human Leukocyte Antigen</i> , traducido como ‘antígeno leucocitario humano’ en castellano.
HLA-DR	viene de las siglas en inglés de <i>Human Leukocyte Antigen-DR isotype</i> , traducido como ‘antígeno leucocitario humano isotipo DR’ en castellano.
I	
I	iris.
IF	inmunofluorescencia.
IGF	viene de las siglas en inglés de <i>Insulin-like Growth Factor</i> , traducido como ‘factor de crecimiento similar a la insulina’ en castellano.
IHQ	inmunohistoquímica.
IL	interleucina.
ISCT	I nternational S ociety for C ell T herapy.
K	
KGF	viene de las siglas en inglés de <i>Keratinocyte Growth Factor</i> , traducido como ‘factor de crecimiento de queratinocitos’ en castellano.
KLAL	viene de las siglas en inglés de <i>KeratoLimbal allograft</i> , traducido como ‘aloinjerto queratolimbal’ en castellano.
L	
lr-CLAL	viene de las siglas en inglés de <i>Living-related conjunctival-Limbal allograft</i> , traducido como ‘aloinjerto conjuntival de donante vivo emparentado’ en castellano.
LSC	viene de las siglas en inglés de <i>Limbal Stem Cells</i> , traducido como ‘células madre del limbo’ en castellano.
LSCD	viene de las siglas en inglés de <i>Limbal Stem Cell Deficiency</i> traducido como ‘deficiencia de células madre del limbo’ o también denominado como ‘insuficiencia límbica’ en castellano.
M	
M	media muestral.

- MSC** viene de las siglas en inglés de *Mesenchymal Stem Cells*, traducido como ‘células madre mesenquimales’ en castellano.
- MTA** Medicamento de Terapia Avanzada.
- MUC** mucina.
- MUC5AC** mucina soluble 5AC.

O

- OMESC** viene de las siglas en inglés de *Oral Mucosal Epithelial Stem Cells*, traducido como ‘células madre epiteliales de mucosa oral’ en castellano.
- OMS** viene de las siglas en castellano de Organización Mundial de la Salud, conocida internacionalmente como *World Health Organization* (WHO).

P

- PAS** viene de las siglas en inglés de *Periodic Acid-Schiff*, traducido como ‘ácido periódico-Schiff’ en castellano.
- PBS** viene de las siglas en inglés de *Phosphate Buffered Saline*, traducido como ‘tampón fosfato salino’ en castellano.
- PDGF** viene de las siglas en inglés de *Platelet Derived Growth Factor*, traducido como ‘factor de crecimiento derivado de plaquetas’ en castellano.
- PE** viene de las siglas en inglés de *Phycocerythrin*, traducido como ‘ficoeritrina’ en castellano.
- PEE** viene de las siglas en inglés de *Punctate Epithelial Erosions*, traducido como ‘erosiones punteadas epiteliales’ en castellano.
- PerCP** viene de las siglas en inglés de *Peridinin chlorophyll protein complex*, traducido como ‘complejo peridinina-clorofila-proteína’ en castellano.
- PMNs** polimorfonucleares.
- PRGF** viene de las siglas en inglés de *Plasma Rich in Growth Factors*, traducido como ‘plasma rico en factores de crecimiento’ en castellano.

PRK	viene de las siglas en inglés de <i>Photorefractive Keratectomy</i> traducido como ‘queratectomía fotorrefractiva’ en castellano.
P63	proteína tumoral p63.
S	
SBF	suero bovino fetal.
SD	viene de las siglas en inglés de <i>Standard Deviation</i> , traducido como ‘desviación estándar’ en castellano.
SLET	viene de las siglas en inglés de <i>Simple Limbal epithelial transplantation</i> , traducido como ‘trasplante simple de epitelio limbal’ en castellano.
SSC	viene de las siglas en inglés de <i>Side scatter</i> , traducido como ‘detector de dispersión lateral’ en castellano.
T	
TAC	viene de las siglas en inglés de <i>Transit-Amplifying Cells</i> , traducido como ‘célula amplificadora transitoria’ en castellano.
TGF-β	viene de las siglas en inglés de <i>Transforming Growth Factor Beta</i> , traducido como ‘factor de crecimiento transformante beta’ en castellano.
tPA	viene de las siglas en inglés de <i>Tissue-type-Plasminogen Activator</i> , traducido como ‘activador del plasminógeno tipo tisular’ en castellano.
TrypLE	viene de las siglas en inglés de <i>TrypLETM Express Enzyme</i> , traducido como ‘enzima exprés TrypLE TM ’ en castellano.
TSP-1	viene de las siglas en inglés de <i>Thrombospondin-1</i> , traducido como ‘trombospondina 1’ en castellano.
U	
uPA	viene de las siglas en inglés de <i>Urokinase-type-Plasminogen Activator</i> , traducido como ‘activador del plasminógeno tipo uroquinasa’ en castellano.
V	

- VEGF** viene de las siglas en inglés de *Vascular Endothelial Growth Factor*, traducido como ‘factor de crecimiento de endotelio vascular’ en castellano.
- Vim** vimentina.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. SUPERFICIE OCULAR

La superficie ocular se estructura en un complejo de capas que se continúan con diferencias morfológicas y funcionales entre ellas. Ésta formada por la córnea, la zona de transición esclerocorneal denominada limbo, la conjuntiva bulbar y tarsal, cubiertas por éstas, la esclera y los párpados, y finalmente la capa lacrimal que se extiende sobre todas las estructuras anteriores [1,2] (**Figura 1**). La córnea sirve como una ‘ventana transparente que permite la refracción y transmisión de la luz dentro del ojo, mientras que la esclera proporciona la ‘caja oscura’ que permite la formación de la imagen en la retina. El limbo, la conjuntiva bulbar y la capa lacrimal ayudan a la córnea a mantener su transparencia y sus funciones. Y en su conjunto, estas estructuras tienen funciones importantes, como son la provisión de una capa externa lisa y transparente que permita la visión, una barrera mecánica que dificulte la entrada de microorganismos dentro del ojo, y un sistema de comunicación que permita el intercambio de nutrientes y la interacción metabólica con el tejido estromal subyacente [1,3].

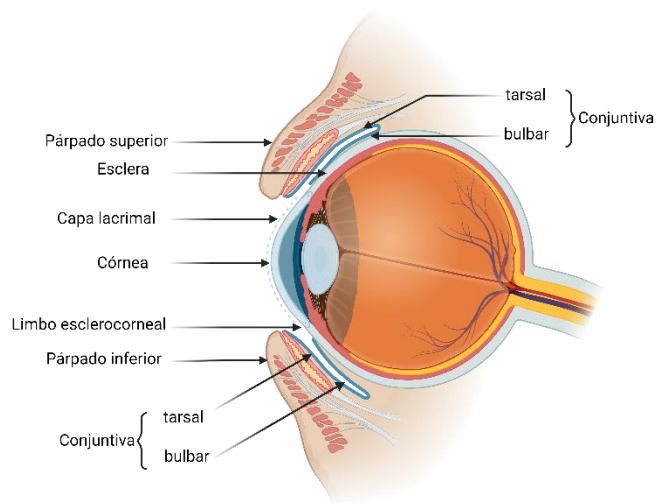


Figura 1. Estructuras que forman parte de la superficie ocular del ojo. Párpados superior, esclera, capa lacrimal, córnea, limbo esclerocorneal, párpado inferior y conjuntiva tarsal y bulbar.

3.1.1. Córnea

a) Anatomía y fisiología

La córnea ocupa la zona anterior y central del globo ocular, y limita por su periferia con la esclera y la conjuntiva bulbar a través del limbo, donde el tejido pierde su transparencia (**Figura 2**). Se trata de una estructura esférica dado que tiene menos aberraciones ópticas que una esfera, y prolata dado que la curvatura es más pronunciada en el centro y se va aplanando hacia la periferia [1]. Su diámetro horizontal (DH) mide entre 11,5 y 12,0 mm, siendo aproximadamente 1,0 mm mayor que su diámetro vertical (DV) [4]. El espesor de la córnea es en torno a 540 μm en el centro y va aumentando hacia la periferia [4].

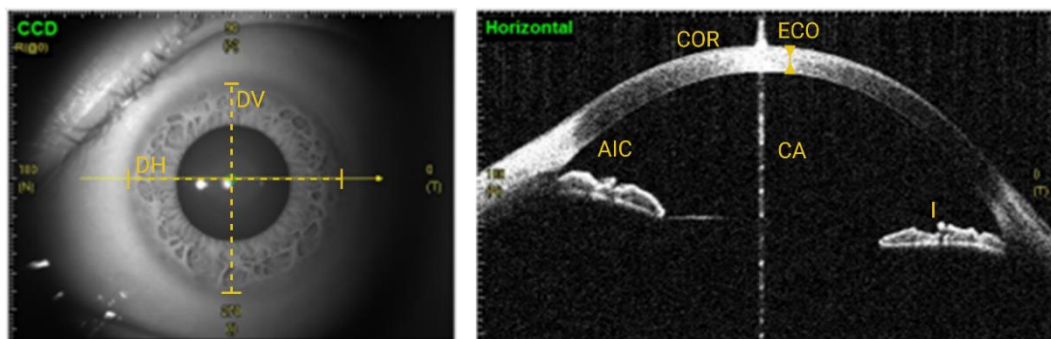


Figura 2. Imagen tomada mediante tomografía de coherencia óptica del segmento anterior. La córnea se localiza en la zona anterior y central del globo ocular. En la imagen frontal (CCD) se ven los DV y DH; y en su sección horizontal (Horizontal) se observan el espesor corneal y los elementos y cámaras anatómicas anexos. AIC: ángulo iridocorneal. CA: cámara anterior. COR: córnea. DH: diámetro horizontal. DV: diámetro vertical. ECO: espesor de la córnea. I: iris.

En cuanto a su función fisiológica, la córnea forma parte del sistema de barreras de protección del ojo y es responsable del 75 % de su poder óptico [4]. En condiciones fisiológicas normales, es avascular y está altamente inervada. El abastecimiento de nutrientes y la retirada de sus productos metabólicos dependen principalmente de las ramas terminales de la arteria oftálmica a través de la lágrima anteriormente, del humor acuoso posteriormente, y de componentes de la sangre que son proporcionados por pequeños vasos conjuntivales en la periferia corneal [1,4]. Estas estructuras se encuentran en equilibrio para mantener la avascularidad y transparencia de la córnea, por lo que la alteración de cada una favorecería la pérdida de la transparencia de la córnea y la formación de vasos sanguíneos que mantenga la nutrición del tejido.

Por otra parte, la córnea se ha descrito como posiblemente el tejido más innervado y sensible del cuerpo [5], debido a su mayor densidad de terminaciones nerviosas nociceptivas que es 25-40 veces mayor que en la pulpa dental y 300-600 veces mayor que en la piel [6-8]. La sensibilidad es recogida a nivel del estroma corneal por dos plexos nerviosos formados por los nervios nasociliares de la primera división del nervio trigémino (conocida como rama oftálmica) a nivel sub-epitelial y sub-basal [5-7]. Debida a esta alta sensibilidad, el dolor ocular supone una importante alteración negativa de la calidad de vida de los pacientes pudiendo llegar a la incapacidad del paciente para llevar a cabo sus actividades diarias [9].

b) Histología

La córnea humana es un conjunto de tejidos formado por 3 capas celulares (epitelio, estroma y endotelio) y 2 interfases membranosas (capa o membrana de Bowman y membrana de Descemet) [1,4] (**Figura 3**).

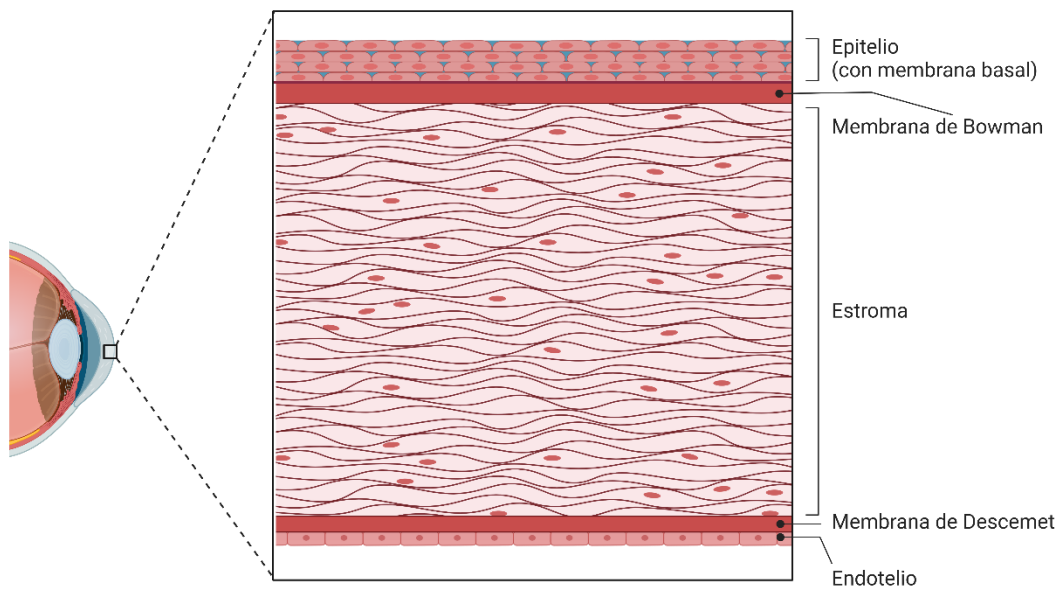


Figura 3. Capas histológicas de la córnea. La córnea está estructurada en capas que son de superficial a profundo: el epitelio formado por células epiteliales y la membrana basal, la membrana o capa de Bowman formada por matriz rica en colágeno tipo I y III, el estroma formado por células estromales y matriz rica en colágeno tipo I, la membrana de Descemet formada por matriz rica en colágeno tipo IV y el endotelio formado por células endoteliales.

El **epitelio corneal** es escamoso, estratificado, no queratinizado y está compuesto por tres estratos celulares: células superficiales o apicales, células alares y células basales [2,4,10].

Esta capa celular se explicará con mayor detalle en el siguiente apartado “c) Epitelio corneal” en la página 37.

La **membrana basal** se localiza en el polo inferior de la membrana plasmática de las células basales del epitelio corneal, tiene un espesor de entre $0,04 - 0,06 \mu\text{m}$ [1,4]. Se trata de una estructura delgada, acelular, altamente especializada que separa a las células basales de su matriz asociada (la capa o membrana de Bowman) y se conecta a ellas [11,12]. La membrana basal interacciona con el citoesqueleto de las células basales para regular la polaridad, adhesión y migración celular, y mantener el fenotipo epitelial de dichas células [1,11,12]. Además, la membrana basal modula la activación, localización y concentración de los factores de crecimiento y citoquinas que controlan la respuesta a la lesión corneal [11,12]. Su composición exacta ha sido un tema bastante controvertido debido a la heterogeneidad horizontal de la propia membrana. En general, su matriz la forman cuatro componentes primarios: colágenos, lamininas, proteoglicanos de heparán sulfato y nidógenos o entactinas; y otros muchos componentes minoritarios como la fibronectina [1,4,11-15]. Ante una alteración de la membrana basal, se produce un incremento de los niveles normales de fibronectina y el proceso de reparación del epitelio corneal se puede alargar hasta 6 semanas, produciendo nuevas uniones débiles e inestables entre las células y las membranas basales. Las consecuencias de una lesión en la membrana basal y una regeneración ineficiente de ésta conducen al desarrollo de fibrosis estromal corneal que puede tardar en resolverse meses, años o agravarse si no se trata [16]. Los factores clínicos comúnmente asociados con la fibrosis corneal son las cirugías como la queratectomía fotorrefractiva o PRK, lesiones como un traumatismo estromal o una quemadura química/térmica, las infecciones microbianas del epitelio o los retrasos en la reparación del epitelio corneal después de una abrasión o desbridamiento terapéutico [16].

La **capa o membrana de Bowman** se localiza inmediatamente posterior a la membrana basal y anterior al estroma. No se trata de una verdadera membrana, es una capa acelular de aproximadamente $8-12 \mu\text{m}$ de espesor que se continúa con el estroma corneal [5,17]. Está formada principalmente por fibras de colágeno tipos I y III secretado por las células estromales y por proteoglicanos ¹. Las funciones biológicas originalmente atribuidas a la membrana de Bowman se cree que están mediadas por la membrana basal ¹. La membrana de Bowman no se regenera después de una lesión y puede formar una cicatriz [1,17]. La

experiencia clínica con la fotoablación con láser excímer demuestra que el epitelio se forma y mantiene incluso en ausencia de la membrana de Bowman [1]. Además, muchos mamíferos, como el conejo, no tienen una membrana de Bowman [17] y presentan una estructura epitelial bien organizada. Luego, la función fisiológica de la membrana de Bowman sigue sin estar del todo clara.

El **estroma corneal** representa más del 90 % del espesor de la córnea [2] y dentro de éste se han diferenciado dos partes: el estroma anterior y el estroma posterior. Algunos autores incluyen la capa de Bowman como la parte más anterior del estroma anterior [17]; y recientemente, se ha descrito la capa de Dua o estroma pre-Descemet como la parte más posterior del estroma posterior, dado que cuando se inyecta una burbuja de aire o de viscoelástico en el estroma profundo se crea un plano de corte a este nivel que permite separar una fina capa del estroma posterior anatómicamente indistinguible del estroma posterior y que se superpone a la membrana de Descemet [18]. Las características de la córnea como las propiedades físicas, la forma de la estructura, y la transparencia son atribuidas mayormente a las propiedades del estroma. La transparencia del estroma se debe a una alta organización de la matriz extracelular en láminas de colágeno que presenta una disposición uniforme y una renovación continua y lenta de las fibrillas de colágeno [4]. La matriz extracelular del estroma de la córnea se compone principalmente de colágenos y proteoglicanos [4]. El colágeno del estroma constituye más del 70 % de su peso seco, y es mayoritariamente tipo I pero tiene en menor proporción los tipos III, V, VI, XII y XIV [19]. Las moléculas de procolágeno son secretadas en el espacio extracelular por los queratocitos, tras lo cual los extremos del pro-péptido se escinden para dar lugar a las moléculas de colágeno maduras que se ensamblarán en fibrillas y fibras de colágeno. Las fibrillas de colágeno están dispuestas en 200-250 láminas orientadas oblicuamente y con fibras entrelazadas que conectan las capas entre sí [18]. La disposición anatómica homogénea de las fibrillas de colágeno es la responsable de la transparencia corneal y de que la dispersión de un rayo de luz incidente en una fibrilla de colágeno se cancela por la interferencia de otros rayos dispersos permitiendo que la luz pase a través de la córnea [20]. La córnea pierde su transparencia si el diámetro o la distancia entre las fibrillas de colágeno se vuelve heterogénea (como ocurre en casos de fibrosis o edema) ya que los rayos incidentes se dispersan al azar [20]. Las **células estromales o queratocitos** están dispersos entre las

láminas de colágeno del estroma ocupando el 2-3 % de su volumen y son reemplazados cada 2-3 años [2]. Los queratocitos son similares a los fibroblastos, tienen forma fusiforme, poseen un extenso citoesqueleto intracelular, incluyendo prominentes filamentos de actina, y están conectados por sus extremos laterales mediante uniones gap. Los queratocitos son, por tanto, quiescentes en la córnea normal, pero se activan fácilmente y se transforman en miofibroblastos, que expresan α -actina de músculo liso, cuando se produce una agresión que produzca una desepitelización de la córnea dejando el estroma descubierto [1,2,4]. En estos casos el estroma se vuelve reactivo, los miofibroblastos producen matriz extracelular, enzimas que degradan el colágeno, metaloproteinasas y citoquinas para la reparación del tejido estromal, y su capacidad de contracción contribuye al cierre de la herida [1,2,4]. Este proceso de regeneración produce colágeno aberrante que acaba formando tejido cicatricial opaco. El proceso de regeneración natural del estroma es lento, requiriendo de años para que el colágeno regenerado adopte la estructura y orientación adecuada para mantener la transparencia de la córnea [21]. Para evitar esto, la córnea se reepiteliza lo antes posible para proteger el estroma. Esta reepitelización es a partir de las células madre epiteliales del limbo (LSC) o de las células epiteliales de la conjuntiva en caso de no ser posible lo primero.

La **membrana de Descemet** es una lámina discreta compuesta por colágeno tipo IV, laminina, nidógenos y perlecana [18]. La membrana puede alcanzar hasta 10 μm de espesor con la edad repartidos en dos zonas: una anterior que se forma antes del nacimiento a partir de la 8 semana de gestación en el útero, y una zona posterior que se forma a partir del nacimiento [1,2,4]. La membrana de Descemet ancla las células endoteliales a la córnea y permite el paso a través de ella de nutrientes y macromoléculas hacia el estroma corneal. Su función es fundamental para la correcta hidratación de la córnea y para mantener la transparencia corneal. Tiene potencial regenerativo muy limitado y a expensas de la acción de las células endoteliales [22].

El **endotelio** consiste en una monocapa de células poligonales quiescentes que regula el equilibrio del contenido hídrico de la córnea bombeando el exceso de líquido fuera del estroma [1,2,4]. La densidad celular de un adulto joven es de aproximadamente 3.000 células/ mm^2 [1]. El número de células disminuye aproximadamente un 0,6 % al año y las células vecinas se hipertrofian para rellenar el espacio [2]. Si la densidad de células

disminuye por debajo de 500 células/mm² se produce un edema corneal y la transparencia se ve afectada [2].

c) Epitelio corneal

El epitelio corneal está compuesto por células epiteliales escamosas, estratificadas y no queratinizadas. Tiene un grosor variable entre 40-60 µm (5 % del espesor total de la córnea) siendo mayor en el epitelio corneal de la periferia que en el central. El epitelio presenta en su zona central entre 5-7 capas de células y en su zona periférica entre 8-10 capas de células [2,4,10]. Dentro de las capas del epitelio corneal se pueden diferenciar tres tipos de células con diferencias morfológicas y funcionales: las células superficiales, las células alares y las células basales (**Figura 4**).

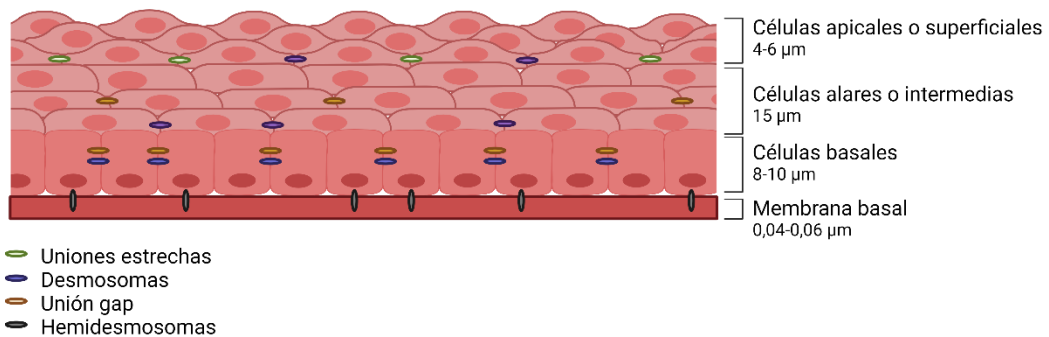


Figura 4. Estratos celulares del epitelio corneal y sus uniones intercelulares. El estrato apical está formado por 2-3 capas de células apicales (uniones estrechas y desmosomas), el estrato intermedio por 2-3 capas de células alares (uniones tipo gap y desmosomas) y el estrato basal por una monocapa de células basales (uniones tipo gap, desmosomas) sobre la membrana basal a la que se une mediante hemidesmosomas.

c1. Células superficiales o apicales:

Se localizan en la superficie del epitelio corneal, son células escamosas no queratinizadas estrechamente unidas por sus membranas laterales mediante uniones estrechas (o *zonula occludens*) y desmosomas [2,4,10]. Forman un estrato de 2-3 capas de células de 4-6 µm de espesor en la zona central y 2 µm de espesor en la periferia. Morfológicamente son células planas poligonales de 40-60 µm de diámetro, cuyas membranas plasmáticas presentan microvellosidades y micropliegues y sin actividad mitótica [2,4]. Funcionalmente, forman la primera capa de protección de la córnea caracterizada por una amplia superficie de

absorción que permite el intercambio de nutrientes y oxígeno con la capa lacrimal que la cubre.

c2. Células alares o intermedias

Se localizan en medio del espesor de la córnea, posteriormente a las células apicales y se distribuyen formando entre 2-3 capas de células de 15 μm de espesor total. Morfológicamente, las células alares son menos planas que las apicales y más alargadas, no presentan actividad mitótica y están unidas lateralmente mediante uniones de tipo gap y desmosomas [2,4,10].

c3. Células basales

Se localiza en el estrato basal del epitelio corneal formando una monocapa de células de morfología columnar de 8-10 μm de espesor que están ancladas de por su polo inferior mediante hemidesmosomas a una membrana basal sobre la que descansa [2,4,10]. Además, estas células también están unidas unas a otras mediante uniones intercelulares laterales de tipo gap y desmosomas [10]. La característica fundamental de estas células es que son las únicas del epitelio corneal con cierta capacidad proliferativa para formar células alares y apicales durante el proceso de descamación y renovación del epitelio corneal [2,4,10].

c4. Características del epitelio corneal

El epitelio corneal es la primera barrera de la córnea con el medio externo, con el cual se comunica a través de la película lacrimal. Se trata de una barrera autorrenovable altamente especializada que protege a la córnea a la vez que permite su nutrición para mantener su principal característica que es la transparencia (**Figura 5**). Su funcionalidad es posible gracias a varias de sus propiedades, descritas a continuación.

Por un lado, su propiedad de cohesividad que mantiene la continuidad del epitelio corneal gracias a las uniones intercelulares de las membranas laterales de las células apicales y las células alares, conformando una capa impermeable a toxinas, microbios y a la propia capa lacrimal que no pueden atravesar los espacios intercelulares [2,4]. Es por ello, por lo que una córnea sana no se tiñe con determinados colorantes porque los repele, esto se observa en la práctica clínica cuando se usan los colorantes como la fluoresceína o la rosa de Bengala

para teñir córneas con epitelios irregulares o células muertas, respectivamente, que presentan alterada la impermeabilidad de la barrera [4].

Por otro lado, el mantenimiento del balance hídrico y nutricional de la córnea facilitado por el estrato apical, las células caliciformes conjuntivales, la capa lacrimal y el endotelio. Las células epiteliales superficiales presentan una superficie aumentada mediante la formación de microvellosidades y micropliegues que mejoran el intercambio de oxígeno y nutrientes con la capa lacrimal [4]. La lágrima es una mezcla compleja de secreciones de varios tejidos que proporciona a la córnea factores de crecimiento e inmunológicos que son primordiales para la salud, proliferación y reparación del epitelio corneal [1,2,4]. La película lacrimal está formada por cuatro capas: la más interna es un glicocálix que recubre la superficie del epitelio corneal apical; la segunda es una capa mucosa con alto contenido en mucina producida por las células caliciformes conjuntivales; la tercera es una capa acuosa y la última la capa lipídica. La capa más interna de la lágrima, el glicocálix, está formada por una red de polisacáridos que sobresale de la porción apical de las microvellosidades de las células superficiales de la córnea y la conjuntiva [23]. La interacción entre la mucina y el glicocálix permite que se extienda la capa lacrimal por toda la superficie corneal entre los límites de los párpados superior e inferior para nutrir las estructuras que cubre [1,2,4]. En el caso de haber un daño en el glicocálix corneal o el estrato epitelial apical debido a una lesión o enfermedad, se perdería la estabilidad de la película lacrimal que alteraría la hidratación de la córnea y consiguientemente su transparencia y potencial visual [24].

Finalmente, la continua renovación celular permite mantener la barrera protectora más externa de la córnea, el epitelio corneal, que está expuesta continuamente a todo tipo de lesiones y desgastes. La renovación es posible gracias al equilibrio dinámico entre las células basales y las células apicales que semanalmente sufren una descamación celular de las capas más apicales que son sustituidas por las capas más profundas a su vez reemplazadas por la capa basal que está proliferando [1,2,4].

c5. Regeneración del epitelio corneal

La fricción mecánica asociada con el parpadeo, la radiación ultravioleta, la hipoxia y las lesiones externas inducen la apoptosis y la descamación de las células superficiales del

epitelio corneal [1]. En estos casos, la autorrenovación del epitelio corneal es imperativa para mantener la transparencia y funciones de la córnea.

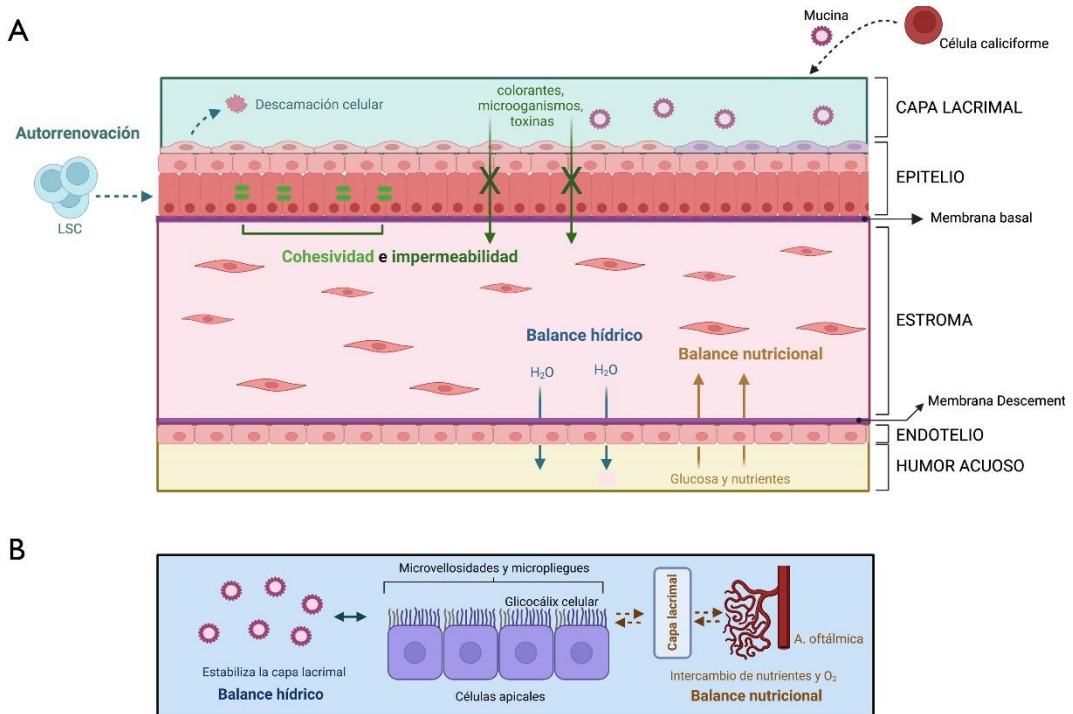


Figura 5. Características fundamentales que mantienen la transparencia de la córnea. (A) Autorrenovación: El epitelio está en continua descamación y renovación a partir de las células basales y de las LSC del limbo esclerocorneal. **Cohesividad e impermeabilidad:** las uniones intercelulares mantienen un epitelio cohesivo formando una barrera de protección impermeable que evita el paso de colorantes, tóxicos y microorganismos a través de los espacios intercelulares. **Balance hídrico:** se mantiene por la capa lacrimal que cubre todo el epitelio corneal y el endotelio que expulsa el exceso de H₂O. **Balance nutricional:** los nutrientes y oxígeno llegan a las células epiteliales desde la capa lacrimal y el humor acuoso. (B) Características especiales del epitelio apical. **A.:** arteria. **LSC:** células madre del limbo.

El proceso de renovación celular es llevado a cabo por las células columnares de la capa basal del epitelio corneal. Las células basales son las únicas células del epitelio corneal con capacidad proliferativa, aunque limitada. Estas células se dividen y diferencian en células alares que subsecuentemente se diferencian en células superficiales que emergen gradualmente a la superficie de la córnea desplazando a las células precedentes que se desprenden produciendo el proceso de descamación celular del epitelio corneal [1,2]. Este proceso se produce a lo largo de 7-10 días, después del cual las células superficiales se descaman dentro de la película lacrimal [1].

Las LSC participan junto con las células basales en el proceso de renovación celular del epitelio de la córnea reponiendo las células perdidas durante la descamación normal o después de un daño tisular. La división asimétrica de cada LSC genera una nueva célula madre y una célula amplificadora transitoria (TAC) que inicialmente prolifera y después da lugar a una célula diferenciada. Se ha descrito que las TAC avanza de manera centripeta desde la periferia donde nacen, en las empalizadas de Vogt del limbo, hacia la córnea central donde se diferencia [1,2] (Figura 6).

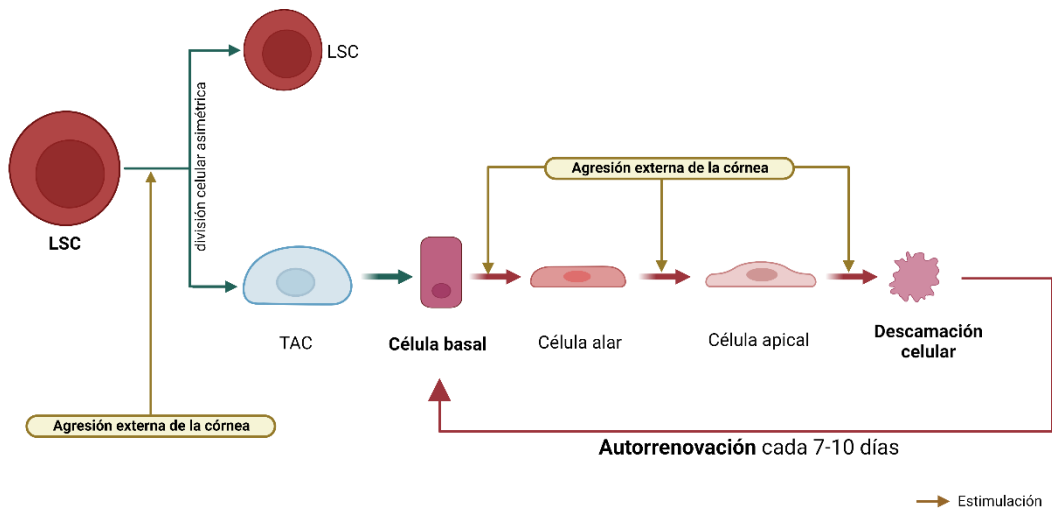


Figura 6. Estirpes celulares que participan en el proceso de renovación del epitelio corneal: LSC, TAC y células diferenciadas (basal, alar y apical). El epitelio corneal está en continua descamación y autorrenovación de sus células, las células más apicales se descaman a la vez que son renovadas por la proliferación de las células basales. En el caso de un traumatismo ocular por un agente externo, se estimula el proceso de renovación y las LSC proliferan para restablecer el epitelio corneal ya que la capacidad proliferativa de las células basales es limitada. **LSC:** célula madre del limbo. **TAC:** célula amplificadora transitoria.

3.1.2. Limbo

a) Anatomía y fisiología

El limbo esclerocorneal es la zona de transición entre el epitelio corneal y la conjuntiva bulbar. Está delimitado por su borde inferior con una línea que une los bordes externos de la capa de Bowman y la membrana de Descemet, por su borde exterior con el inicio de la esclera y el borde exterior del canal de Schlemm y por su borde interior con la córnea [1]. Se cree que las LSC localizadas en el limbo tiene una importante función de barrera evitando

el proceso conocido como conjuntivalización que consiste en el crecimiento de la conjuntiva sobre la córnea [2,25].

b) Histología

El limbo está compuesto de un epitelio y un estroma [2]. El epitelio del limbo al ser una zona de transición presenta una morfología intermedia entre el epitelio corneal y el epitelio de la conjuntiva. Su epitelio es estratificado no queratinizado y se diferencia del epitelio conjuntiva en la ausencia de células caliciformes [1,10]. Las células epiteliales superficiales del limbo son histológicamente similares a las del epitelio corneal, con la exclusividad que presentan células dendríticas, linfocitos T, melanocitos con un alto contenido de melanina y pequeños capilares subyacentes [1]. Además, las células del epitelio basal del limbo son las células epiteliales de estadio menos diferenciadas de todo el epitelio de la superficie ocular. Las células basales del limbo son más pequeñas, menos columnares y tiene menos organelos citoplasmáticos [1].

Las LSC se han localizado en las criptas del epitelio límbico dentro de unas papilas subepiteliales conocidas como palizadas de Vogt [2]. Los procesos de división, diferenciación y el estadio indiferenciado de las LSC están regulados por el microambiente llamado nicho límbico [1]. Estos nichos están altamente vascularizados (a través del estroma conjuntival) e inervados, proporcionando una fuente de nutrientes y factores de crecimiento para nutrir y mantener indiferenciadas a las LSC. Además, las células mesenquimales localizadas en el estroma del nicho límbico secretan proteínas ácidas y ricas en cisteína que contribuyen a la adhesión de las LSC [1]. La insuficiencia límbica o deficiencia de células madre epiteliales del limbo (LSCD) puede dar lugar a defectos epiteliales crónicos y la conjuntivalización de la córnea (inestabilidad epitelial, vascularización y aparición de células caliciformes) [2,25].

3.1.3. Conjuntiva bulbar

a) Anatomía y fisiología

La conjuntiva es una membrana mucosa transparente que se extiende desde los márgenes de los párpados superior e inferior hasta el limbo esclerocorneal, recubriendo la cara interna de los párpados y la superficie anterior de la esclera del globo ocular [26]. Anatómicamente se pueden distinguir tres partes:

1. **La conjuntiva tarsal o palpebral** que empieza en la unión mucocutánea del margen de los párpados y se extiende unida firmemente a su cara posterior de los párpados [2,26].
2. **La conjuntiva bulbar** que cubre la superficie anterior de la esclera y se continúa con el epitelio corneal a través del limbo esclerocorneal, donde, además, se inserta mezclándose con la cápsula de Tenon y la epiesclera subyacentes [2,26].
3. La transición entre la conjuntiva tarsal y bulbar deja tres **fórnicos o fondos de saco** que son el superior, el inferior y el temporal y un pliegue medialmente que sólo crea un verdadero fórnix durante la aducción del ojo. La función de los fórnicos es permitir el movimiento independiente del ojo y de los párpados [2,26].

La conjuntiva se encuentra altamente vascularizada por la arteria ciliar anterior y la arteria palpebral, ambas ramas de la arteria oftálmica, y drena a los nódulos preauricular y submandibular a nivel de los párpados. Presenta función protectora del globo ocular de agentes externos, protección inmunológica mediando la inmunidad pasiva y activa, y participa en la formación de la lágrima modulando su volumen, osmolaridad y concentración electrolítica para mantener el ojo lubricado [1,2].

b) Histología

Histológicamente podemos distinguir tres partes en la conjuntiva bulbar que son el epitelio, el estroma y el tejido linfoide asociado a la conjuntiva.

El **epitelio** [10] está formado por aproximadamente 5 capas de células que forman un epitelio no queratinizado estratificado excretor que interacciona con la membrana basal de colágeno tipo IV y la sustancia propia para cubrir todo el globo ocular. En el epitelio hay mayoritariamente células epiteliales de tipo cuboidal acompañadas por células caliciformes, células de Langerhans, melanocitos y linfocitos [1,10]. Las células apicales forman una capa de permeabilidad selectiva e hidrofóbica que favorece la adherencia de la película lacrimal gracias a la presencia de uniones intercelulares estrechas, tipo gap y desmosomas, y a la presencia en su superficie de complejos de microvellosidades y del glicocáliz [1,10]. Éste último es rico en una serie de glicoproteínas de transmembrana altamente glicosiladas denominadas mucinas (MUC), principalmente MUC1, MUC4, MUC16, que son secretadas mediante vesículas y que lubrican la superficie apical de los epitelios y proporcionan una barrera frente a patógenos [27,28]. Entre las células del epitelio conjuntival se localizan las células caliciformes, son células secretoras de MUC por activación parasimpática,

representan el 5-10 % de las células basales del epitelio conjuntival y su distribución no es homogénea. La mayor densidad de células caliciforme se encuentra en la conjuntiva bulbar inferonasal. Las células caliciformes secretan la MUC soluble 5AC (MUC5AC) que es la MUC principal en la composición de la lágrima [1]. La MUC5AC actúa como un surfactante para la superficie ocular, lo que permite que la capa lacrimal cubra uniformemente el epitelio hidrofóbico de la córnea para humedecerlo [28].

El **estroma o sustancia propia** [1,10] es un tejido conectivo laxo localizado debajo de la membrana basal que se adelgaza y compacta a nivel del limbo. La sustancia propia está altamente vascularizada y contiene las glándulas lacrimales accesorias de Krause y Wolfring cuyas secreciones son esenciales en la composición de la capa lacrimal.

El **tejido linfoide asociado a la conjuntiva** [1,10] está formado por linfocitos intercalados entre las capas de células epiteliales, asociados a vasos linfáticos y sanguíneos, con un componente estromal de células plasmáticas y linfocitos incluyendo agregados foliculares. Su función es crítica para el desencadenamiento y regulación de la respuesta inmune de la superficie ocular.

3.2. TRAUMATISMO OCULAR Y DEFICIENCIA DE CÉLULAS MADRE LIMBARES

3.2.1. Traumatismos oculares

La superficie ocular debido a su estrecho contacto con el exterior tiene un alto riesgo de ser lesionada ante un accidente que comprometa la parte superior de la cara produciendo un traumatismo ocular. Los traumatismos oculares pueden ser por causas mecánicas o no mecánicas [29]. Entre las causas mecánicas podemos encontrar las contusiones, heridas y cuerpos extraños. Mientras que las causas no mecánicas se pueden clasificar según el agente nocivo como traumatismo por químicos, calor, radiación o electricidad. Otra distinción importante es que los traumatismos pueden ser clasificados como abiertos o cerrados en función de si hay o no perforación [30]. Esto es común en traumatismos por objetos punzantes, pero también se puede ver un como complicación de un traumatismo no mecánico como una causticación.

3.2.2. Causticación

El traumatismo químico, se conoce como causticación, es la causa no mecánica más importante, y representa entre el 7,7 y el 18 % de las lesiones oculares por traumatismo [31,32]. Suelen ser bilaterales, se dan mayoritariamente en pacientes jóvenes varones, y pueden producirse tanto por ácidos (como el sulfúrico, acético y clorhídrico) como por álcalis (como la lejía, cal viva, amoníaco y sosa cáustica). Generalmente las causticaciones por ácidos son menos graves que las causticaciones por álcalis porque dañan solo las capas superficiales de la córnea, a diferencia de los álcalis que precipitan y afectan a capas más profundas [33].

3.2.3. Fisiopatología de la causticación alcalina

La fisiopatología de la causticación ocular por álcali fue descrita por Pfister R y Koski J en 1978 [34]. Estos autores lo describen de la siguiente manera, el álcali al contactar con el epitelio de la córnea produce la saponificación, lisis de las membranas celulares y la descamación del epitelio dejando defectos epiteliales que persistirán durante semanas o meses. Si la causticación es leve se produce una abrasión corneal, es decir, se desprende el epitelio. Pero si la causticación es más grave, el álcali alcanza el estroma causando lisis de

los queratocitos, desnaturalización de la matriz de colágeno e incluso daño endotelial que acabará produciendo edema corneal. A su vez, se produce una respuesta inflamatoria aguda en la córnea manifestada por la infiltración de polimorfonucleares (PMNs) [33]. En presencia de defectos epiteliales, los PMNs son activados y liberan enzimas que degradan el estroma corneal formando úlceras que pueden complicarse formando un descemetocele y/o una perforación corneal. El riesgo de perforación es mayor cuanto mayor sea la severidad de la causticación.

En cuanto al pronóstico, mediante numerosos trabajos se describieron los distintos pronósticos de los traumatismos oculares [2,3,10,35,36]. En casos leves, el epitelio corneal es regenerado correctamente por la proliferación y diferenciación de las células del epitelio basal y las LSC. No obstante, en casos de causticaciones más severas y/o extensas se colapsan los sistemas de renovación del epitelio corneal debido a que a las células madre no les da tiempo a regenerar correctamente todas las capas del epitelio corneal perdido y para protegerlo antes posible al estroma reactivo se forma un epitelio patológico caracterizado por un número anormal de capas celulares con morfología patológica y depósitos de colágeno cicatricial. Además, cuando el traumatismo afecta al limbo, las LSC pueden estar comprometidas, lo cual lleva a dos puntos importantes: (1) la renovación del epitelio corneal que solo puede ser llevada a cabo por las células del epitelio basal y del limbo remanente, si las hubiera, que resultaría en una capacidad de proliferación limitada e insuficiente para restaurar toda la superficie corneal; (2) la pérdida de la barrera que frena la invasión de la córnea por parte del epitelio conjuntival de la conjuntiva bulbar, el cual avanza arrastrando consigo vasos sanguíneos de la propia conjuntiva en un proceso que se conoce como conjuntivalización y que se ha descrito como signo patognomónico de LSCD (**Figura 7**).

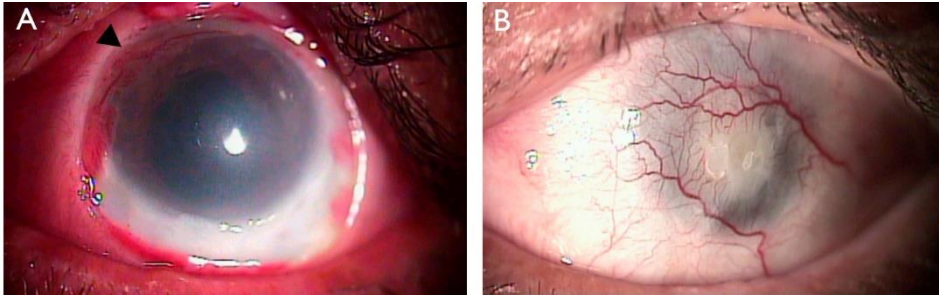


Figura 7. Hallazgos clínicos característicos de la LSCD. (A) Imagen de lámpara de hendidura de una córnea con conjuntivalización supero-temporal, neovascularización y penachos fibrovasculares importantes (◄) sin alcanzar el eje visual. (B) Imagen de lámpara de hendidura de una córnea que muestra conjuntivalización corneal total/completa con queratinización central. Imagen cortesía del Dr. Luis Fernández-Vega Cueto-Felgueroso.

3.2.4. Deficiencia de células madre limbares

La insuficiencia límbica o LSCD es una entidad clínica producida como consecuencia de la destrucción de las LSC que se produce generalmente por agresiones externas y con menor frecuencia se asocia a enfermedades congénitas o presenta un carácter idiopático [37]. Las causas más frecuentes de LSCD adquirida son resultado de agresiones extrínsecas que producen una destrucción aguda o crónica de las LSC [10,37]. Como causas de LSCD adquirida se incluyen las quemaduras químicas y térmicas, radiación ultravioleta e ionizante, desórdenes crónicos inflamatorios, condiciones de cicatrización progresiva (Síndrome de Steven Johnson y penfigoide ocular cicatricial), uso de lentes de contacto, iatrogénica (crioterapia o cirugía), infecciones microbianas crónicas como el tracoma, y menos común la queratitis asociada con deficiencia endocrina múltiple, la queratopatía neurotrófica (neural o isquémica), y la limbitis crónica [10]. El signo clínico particular de la LSCD es la conjuntivalización de la córnea, pero la manifestación clínica más relevante es el defecto epitelial corneal [10]. Además, dentro de la clínica acompañante se podrían incluir una disminución la visión, fotofobia, lagrimeo, blefarospasmo y episodios recurrentes de dolor si hay desgarro epitelial, así como historia de inflamación crónica con enrojecimiento [2].

3.2.5. Epidemiología

a) Traumatismo ocular

Las características epidemiológicas de los traumatismos oculares no están claras y solo están descritas en algunas poblaciones [38] de Estados Unidos [39–42], Australia [43], Asia

[44–47] y Europa [48–52]. Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) sitúa a los traumatismos como una de las tres causas más frecuentes de opacidad corneal que han causado a 4,2 millones de personas un deterioro visual significativo [53].

En nuestro país, el traumatismo ocular es la tercera causa de ceguera o secuelas importantes, después del glaucoma y de la retinopatía diabética que ocupan el primer y segundo lugar respectivamente [54]. La incidencia anual del traumatismo ocular se ha descrito en torno a 1,45 casos por 100.000 habitantes [49] en una población urbana madrileña y de más de 6,76 casos por 100.000 habitantes en población más rural almeriense [48].

b) Traumatismo ocular y deficiencia de células madre limbares

Parece existir relación entre los traumatismos oculares por causticación y el desarrollo de LSCD posteriormente al trauma. Vazirani J *et al.* [40] han relacionado la lesión por agente químico con el desarrollo de LSCD en un estudio multicéntrico retrospectivo en muestras de poblaciones americanas e indias. Según estos autores la quemadura química es la principal causa de LSCD unilateral (en el 84 % de los casos de LSCD unilateral), y es una causa importante de LSCD bilateral (en el 30 % de los casos de LSCD bilateral).

3.2.6. Factores de riesgos

Entre los factores de riesgo del traumatismo ocular se encuentran la edad, el sexo, el nivel socioeconómico y el estilo de vida [38]. Hay varias actividades que se relacionan con mayor frecuencia con los traumatismos oculares: laborales, domésticas, accidentes de tráfico, agresiones y práctica deportiva. A nivel global, los accidentes laborales y domésticos presentan la mayor frecuencia [29]. En nuestro medio, las causas principales de trauma ocular en poblaciones urbanas y/o con alto nivel socioeconómico son los accidentes domésticos (44,6 %), seguidos de las agresiones (22,80 %) y los accidentes laborales (17,4 %) [49]. Mientras que los accidentes laborales son la causa más común en poblaciones de menor nivel socioeconómico y/o rurales [48]. El perfil de paciente más típico es un adulto joven en edad laboral, es decir entre 20 y 40 años [32,38].

3.2.7. Diagnóstico

Ante córneas lesionadas por agentes externos se realiza un diagnóstico esencialmente clínico mediante examen con lámpara de hendidura, tinción de fluoresceína y asociado a una

citología de impresión de la superficie corneal [2,3,10,35]. En casos de sospecha de LSCD, hay que tener en cuenta que dependiendo de la extensión de limbo afectado tendremos una LSCD parcial o total, y dependiendo de si afecta a uno o a los dos ojos puede ser unilateral o bilateral (**Figura 8**).

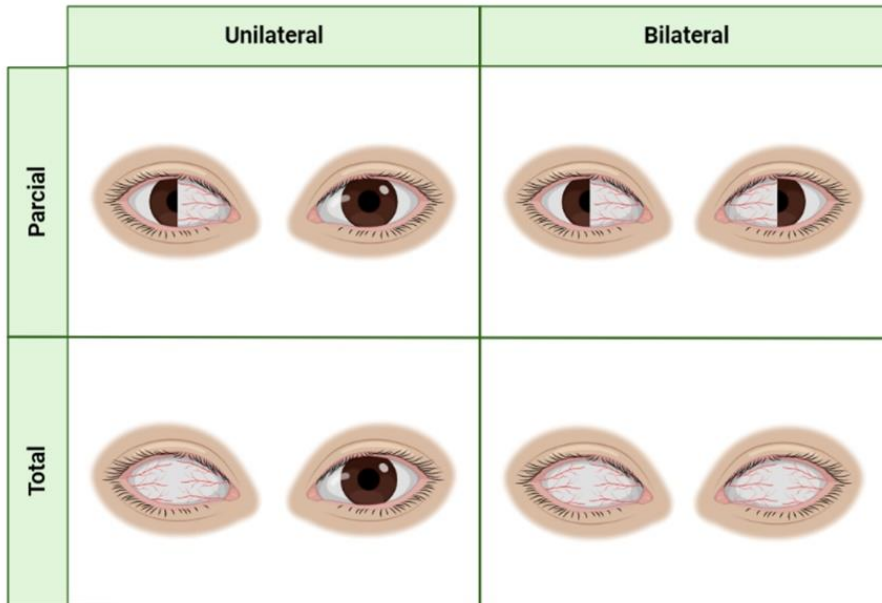


Figura 8. Tipos de insuficiencias límbicas. En función de si está afectada uno (unilateral) o los dos ojos (bilateral) y de la extensión de limbo afectado (parcial o total), la insuficiencia límbica se denomina comúnmente como: unilateral parcial o total y bilateral parcial o total.

Las causticaciones oculares se clasifican en grados de acuerdo a su pronóstico, la clasificación que más se ha empleado es la clasificación de Hughes [55] modificada por Roper-Hall [56] (**Tabla 1**) que distingue cuatro grados pronósticos según la apariencia inicial de la córnea y el limbo. Actualmente es más utilizada la escala de Dua *et al.* [57] (**Tabla 2**), dada la facilidad de su manejo, ya que divide la afectación del limbo en horas de reloj y el porcentaje correspondiente de lesión conjuntiva, y su mayor precisión.

Tabla 1. Clasificación de Hughes modificada por Roper-Hall.

Pronóstico	Grado	Claridad corneal	Severidad de la isquemia limbal
Muy bueno	I	Totalmente clara (no daño epitelial)	Sin isquemia limbal
Bueno	II	Opalescencia corneal, detalles de iris visibles	Isquemia limbal <1/3
Reservado	III	Pérdida total del epitelio, opacidad estromal, detalles de iris borrosos	Isquemia limbal 1/3-1/2
Malo	IV	Córnea opaca, pupila e iris borrosos	Isquemia limbal >1/2

Tabla 2. Clasificación de Dua.

Pronóstico	Grado	Limbo afectado en horas de reloj	Afectación conjuntival	Escala analógica *
Muy bueno	I	0	0 %	0 / 0 %
Bueno	II	≤ 3	< 30 %	0.1-3 / 1-29.9 %
Bueno	III	> 3 a 6	> 30 a 50 %	3.1-6 / 31- 50 %
Bueno-Reservado	IV	> 6 a 9	> 50 a 75 %	6.1-9 / 51-75 %
Reservado-Malo	V	> 9 a < 12	75 a < 100 %	9.1-11.9 / 75.1- 99.9 %
Malo	VI	12	100 %	12 / 100 %

* La escala analógica registra con precisión la afectación limbal en horas de reloj de limbo afectado/porcentaje de afectación conjuntival. Al calcular el porcentaje de afectación conjuntival, sólo se tiene en cuenta la afectación de la conjuntiva bulbar, incluidos los fórnicos conjuntivales.

3.2.8. Abordajes terapéuticos

Ante una causticación, la primera actuación (o tratamiento inmediato) es: lavado prolongado con suero, eliminación de residuos sólidos, analgesia sistémica, y derivar al paciente al oftalmólogo. Posteriormente, no hay consenso sobre el régimen de tratamiento más adecuado, consistiendo los principales tratamientos en:

1. Tratamiento médico.
2. Favorecer la reepitelización.
3. Tratamiento quirúrgico:
 - Trasplante autólogo o alogénico de una biopsia de limbo.
 - Trasplante autólogo de LSC expandidas *in vitro*.

El objetivo del tratamiento médico es mejorar o mantener la visión, reduciendo o evitando la progresión de la opacificación corneal y la neovascularización. Se recomienda el tratamiento médico ante cualquier tipo de lesión corneal para controlar la infección y la inflamación mediante el uso de agentes antimicrobianos tan pronto como sea posible, y esteroides tópicos cuando sea preciso [2].

En casos más grave, se recomienda favorecer la reepitelización protegiendo y cubriendo el epitelio corneal, reduciendo factores que reduzca la reepitelización o aplicando tratamiento que la mejoren. Son habituales los siguientes métodos: uso de lentes de contacto blandas con vendas como protección, tarsorrafia temporal, *flap* conjuntival, parches de membrana amniótica, adhesivos tisulares de fibrina, la reducción de la exposición a tóxicos, reducir el consumo de tabaco, lubricación con lágrima artificial y aplicación de colirios de suero autólogo [1,2,10].

En corneas que pese a las medidas terapéuticas anteriores no mejoran la visión o existe una sospecha sólida de riesgo de LSCD, se recomiendan un tratamiento quirúrgico [2,10] con el objetivo de repoblar la superficie corneal con LSC (**Figura 9**). Éstos han demostrado ser efectivos tanto en casos de LSCD ya establecidas como en ojos lesionados por causticación para prevenir su empeoramiento hacia una LSCD [58]. Actualmente, existen varias opciones de trasplante [59], pero, el trasplante de una biopsia de tejido limbal autólogo o alogénico y el trasplante de limbo cultivado son las opciones terapéuticas de mayor interés [24].

Para el trasplante de una biopsia de tejido limbal autólogo se puede extraer 3-4 mm de tejido limbal sano del ojo contralateral al lesionado u homolateral (si conserva limbo sano), e implantarlo en el ojo afectado con un ratio de éxito entorno al 80 % [60-62]. Este tipo de trasplante se ha descrito mediante las siguientes técnicas quirúrgicas: trasplante epitelial limbal simple (SLET) [63] y el autoinjerto conjuntival-limbal (CLAU) [64] que emplea biopsias más grandes. Sin embargo, el obtener suficiente tejido limbal puede comprometer el ojo donante y dar lugar a la aparición de una LSCD *de novo* en el ojo sano o empeorar la patología preexistente si el ojo donante está enfermo.

El trasplante de una biopsia de tejido limbal alogénico se recomienda en pacientes que no disponen de tejido limbal sano para donar y en pacientes que necesitan una mayor cantidad de tejido limbal para restablecer el epitelio corneal y el limbo, porque el autoinjerto por sí

solo no sería suficiente para frenar la conjuntivalización después del trasplante [59]. En ambos casos, se recurre al aloinjerto de tejido conjuntival-limbal de donante vivo emparentado (preferiblemente) (lr-CLAL) [65], al SLET alogénico y al aloinjerto queratolimbal cadavérico (KLAL) [66], combinado con un CLAU en el primer caso [59]. No obstante, realizar un trasplante alogénico supone una serie de riesgos para el paciente: rechazo del aloinjerto donado y transmisión de infecciones.

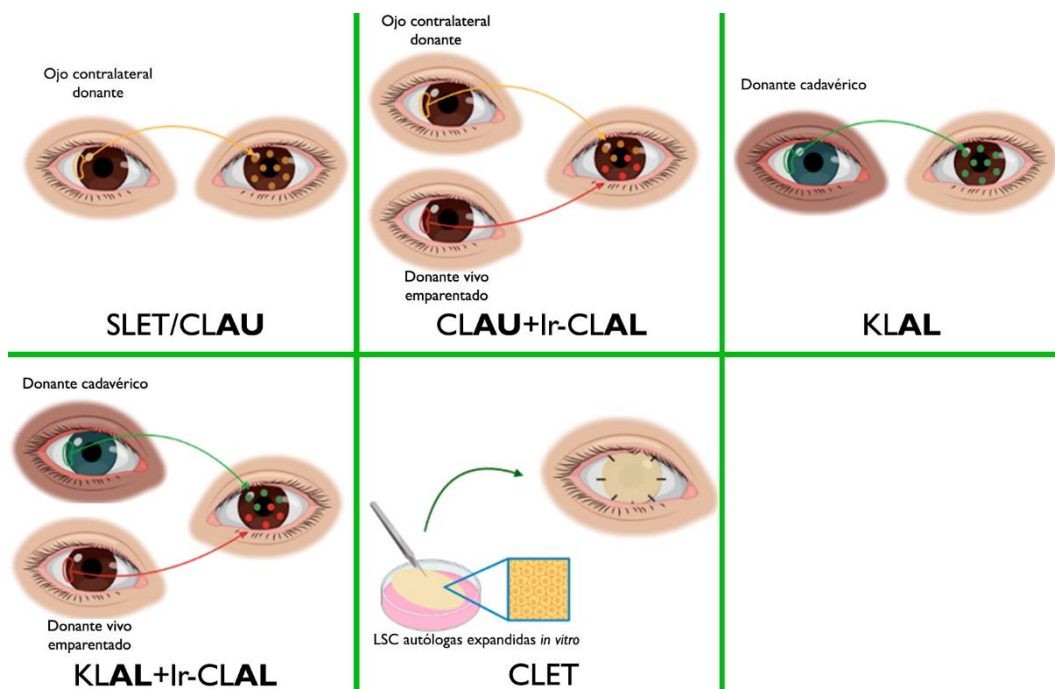


Figura 9. Tipos de trasplante de limbo. Autoinjertos de limbo: SLET, CLAU, CLET. Aloinjertos de limbo: lr-CLAL, KLAL, SLET alogénico. **SLET y CLAU:** Una pequeña biopsia del limbo de 2x2 mm (SLET) o un injerto conjuntival-limbal grande libre de 90-300° (CLAU) del ojo sano se distribuye sobre la córnea del ojo afectado utilizando un andamio de membrana amniótica. **KLAL:** Se utilizan dos bordes corneoesclerales de donantes para restaurar un limbo de 360°. **lr-CLAL:** Los tejidos limbares y conjuntivales se obtienen de familiares vivos HLA compatibles. **CLET:** Se cultivan láminas de células limbares a partir de biopsias limbares (2x2 mm) del ojo sano o del limbo sano restante de un ojo con deficiencia parcial de células madre limbares y se trasplantan al ojo afectado. **CLAU:** *Conjunctival- limbal autograft*. **CLET:** *Cultured limbal epithelial transplantation*. **HLA:** antígeno leucocitario humano. **KLAL:** *Keratolimbal allografts*. **lr-CLAL:** *Living- related conjunctival allograft*. **SLET:** *Simple limbal epithelial transplantation*.

Además, como el limbo esclerocorneal del receptor está muy vascularizado y el tejido limbal donante está cargado de antígenos, influirían el grupo sanguíneo y el antígeno leucocitario

humano (HLA) [67,68], y es necesaria una inmunosupresión sistémica perioperatoria para evitar el rechazo inmunológico del aloinjerto [69]. La inmunosupresión sistémica supone uno de los mayores riesgos para estos pacientes y es la principal causa de fracaso del injerto tras un trasplante alogénico de tejido limbal, especialmente cuando se emplean aloinjertos de donante cadavérico [67,68]. Como consecuencia, para prevenir el rechazo del aloinjerto está indicado el uso prolongado de regímenes inmunosupresores que combinan distintos agentes sistémicos, además de fármacos tópicos (principalmente corticoides) [68,69], que pueden mantenerse durante años tras el trasplante. Normalmente, los efectos adversos de la inmunosupresión sistémica no son serios en pacientes jóvenes sin comorbilidades, algunos de los más comunes son la anemia, la hiperglucemia, el aumento de la creatinina y el aumento de la función hepática [70]. Sin embargo, en pacientes de edad avanzada y con comorbilidades (como hipertensión arterial, hiperlipidemia, diabetes, asma, hipotiroidismo, hepatopatía o insuficiencia renal, entre otros), la inmunosupresión sistémica conlleva efectos adversos más graves [70], pudiendo estar contraindicada.

El trasplante de epitelio limbal cultivado (CLET) autólogo está indicado en pacientes cuya cantidad de limbo disponible para donar en un autotrasplante sea insuficiente o si se desea reducir la cantidad de limbo necesario para un autotrasplante. Esta terapia se trata del cultivo *ex vivo* de células limbares y su posterior trasplante usando una membrana como soporte, y es considerada por la legislación europea como un Medicamento de Terapias Avanzadas (MTA). El Holoclar® es el primer MTA que consigue la autorización de comercialización por parte de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) (EMA/68652015, EMEA/H/C/002450) [71]. El producto Holoclar® consiste en obtener una biopsia de 2 mm² de limbo autólogo y expandir las LSC en cultivo. El principio activo lo constituyen entre 300.000 y 1.200.000 células oculares vivas provenientes de su biopsia, de las cuales una media de 3,5 % son LSC [72]. Estas células se cultivan y expanden empleando dos componentes de origen animal, el suero bovino fetal (SBF) y los fibroblastos de ratón 3T3 letalmente irradiados. Una vez expandidas, las células epiteliales, se siembran sobre una membrana de fibrina que sirve de soporte para realizar el implante quirúrgico. Esta técnica, aunque es una terapia innovadora, no previene los riesgos del trasplante autólogo y alogénico, ya que suma el riesgo que supone tener que biopsiar aunque sea mínimamente el limbo y el riesgo inmunogénico debido a las condiciones xenogénicas del cultivo celular.

Una alternativa para prevenir los riesgos descritos de los trasplantes autólogos y alogénicos convencionales es recurrir a otras fuentes tisulares de células madre adultas que sean autólogas, seguras, y con capacidad de restablecer el epitelio corneal. Como alternativa a las LSC, las células madre mesenquimales (MSC) y las células madre epiteliales de la mucosa oral (OMESC) han mostrado eficacia para regenerar el epitelio tanto en modelos animales como en casos clínicos.

Las **MSC** obtenidas a partir de diferentes orígenes (médula ósea, tejido graso, pulpa dentaria, útero...) han demostrado un gran potencial para su uso en la Medicina Regenerativa, habiendo sido empleadas en diferentes patologías humanas como isquemia periférica, regeneración miocárdica o accidentes cerebrovasculares [73]. En Oftalmología, se ha descrito recientemente la reconstrucción de la superficie ocular en un ensayo clínico en fase I-II con MSC derivadas de médula ósea y membrana amniótica para tratar pacientes con LSCD establecida [74]. Por otro lado, entre los epitelios candidatos para el tratamiento de la LSCD está el **epitelio de la mucosa oral**. En la actualidad, se han realizado numerosos estudios comparativos entre las células limbares y las OMEC. Se ha podido confirmar que la citoqueratina (CK) 3, marcador típico de células epiteliales corneales diferenciadas, así como la CK5 son también positivas en las células de mucosa oral [10,75,76]. Posiblemente, las OMEC sean las células más estudiadas para regenerar lesiones en la superficie ocular, y cuenta con numerosos estudios clínicos de reconstrucción de tejido corneal lesionado mediante distintos tipos de trasplante de OMEC [75,77,78]. Estas terapias han demostrado ser eficaces clínicamente a corto y largo plazo.

El principal inconveniente de las Terapias Avanzadas basadas en MSC y OMEC para uso oftalmológico es que mantienen el uso de componentes xenogénicos y alogénicos para realizar el cultivo de las células madre y su trasplante, además, de contar en algunos casos con metodologías de preparación complejas y numerosas que reducen su rentabilidad. Recientemente, Riestra AC *et al.* [79] han descrito un método de cultivo sin suplementos xenogénicos, basado en el empleo de hemoderivados preparados con el kit comercial Endoret®(PRGF®) desarrollado por la empresa Biotechnology Institute (BTI, Vitoria, España) para el empleo de Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) en el campo de la Oftalmología [58,79]. Además, este método emplea como soporte de las células para su posterior trasplante una membrana de fibrina de PRGF que reemplazaría a la membrana

amniótica de origen alogénico de uso convencional o a cualquier otro material potencialmente reactivo. Por otra parte, se han descrito métodos para obtener células a partir de los tejidos sin utilizar enzimas digestivas de origen xenogénico, como es el caso del método de cultivo por explante que consiste en expandir células sobre el plástico de cultivo a partir de una pequeña porción del tejido y sin ningún procesamiento previo [80,81].

4. JUSTIFICACIÓN

Cuando se produce una lesión ocular grave, los pacientes pueden desarrollar una opacidad corneal permanente o incluso la lesión puede evolucionar hacia una LSCD porque el daño es tan severo o extenso que los mecanismos de reparación de la córnea no son suficientes.

El trasplante limbal autólogo ha mostrado una gran efectividad, mientras que el ratio de éxito del trasplante limbal alogénico está limitado por el riesgo de rechazo, transmisión de infecciones y puede requerir de una inmunosupresión sistémica. Sin embargo, tanto el autoinjerto limbal, como el aloinjerto limbal y el MTA de LSC autólogas suponen un riesgo iatrogénico importante para la visión y la salud del paciente debido a sus procedimientos de obtención de tejido, trasplante y preparación, que incluyen técnicas de disección invasivas y el uso de componentes inmunogénicos de origen xenogénicos y alogénicos.

Estos inconvenientes junto con la necesidad de inmunosupresión sistémica han llevado al desarrollo de MTA alternativos a los trasplantes convencionales de LSC. Existen terapias alternativas que emplean células madre expandidas *in vitro* a partir de tejidos adultos no limbares. Entre las Terapias Avanzadas más destacadas en Oftalmología están las MSC y las OMESC, pero el principal inconveniente es que aún mantienen el uso de factores xenogénicos para la expansión celular y el uso de soportes celulares alogénicos o heterólogos.

Sin embargo, las terapias celulares tienen la categoría de MTA de acuerdo con la legislación vigente (Real Decreto 477/2014) y deben cumplir al igual que los medicamentos de síntesis química, las tres premisas fundamentales para su uso: seguridad, calidad y eficacia. Uno de los problemas regulatorios que existen a la hora de trasladar su uso a la práctica clínica es el empleo de factores xenogénicos en la metodología de cultivo y trasplante. Aunque no están prohibidos, las agencias reguladoras consideran su reemplazo por otros componentes no xenogénicos algo prioritario debido al riesgo asociado al uso de suplementos de origen animal, incluyendo la transmisión de enfermedades, el desarrollo de efectos tumorigénicos y reacciones inmunes.

Disponer de un sistema de cultivo autólogo, un sistema de trasplante autólogo y una fuente de células madre adultas alternativa también autóloga con capacidad regenerativa de la córnea:

1. Preveniría los riesgos biológicos del empleo de material biológico no autólogo.

2. Prevendría la progresión de los traumatismos oculares moderados-graves y/o extensos hacia una ceguera por LSCD.
3. Reduciría la aplicación de los trasplantes convencional de LSC, previniendo sus riesgos.

5. HIPÓTESIS

El propósito de este trabajo es estudiar si:

Las MSC obtenidas de la grasa subcutánea y las OMESC, cultivadas y trasplantadas con componentes derivados del plasma sanguíneo y en ausencia de componentes xenogénicos, podrían componer dos MTA potencialmente autólogos, viables, seguros y eficaces en la regeneración del epitelio corneal lesionado y prevención del desarrollo de ceguera por LSCD.

6. OBJETIVOS

Objetivo 1. Desarrollo de un MTA de MSC:

- 1.1. Cultivo de explantes de grasa subcutánea en un medio de cultivo suplementado con PRGF como fuente de factores de crecimiento y en condiciones libres de factores xenogénicos.
- 1.2. Caracterización de las células expandidas como MSC.
- 1.3. Preparación del implante ocular: cultivo de las MSC sobre una membrana de fibrina de PRGF en un medio de cultivo suplementado con PRGF como fuente de factores de crecimiento y en condiciones libres de factores xenogénicos.
- 1.4. Estudio de viabilidad y respuesta en un modelo animal de ratón atómico.

Objetivo 2. Desarrollo de un MTA de OMESC:

- 2.1. Cultivo de explantes de mucosa oral en un medio de cultivo suplementado con PRGF como fuente de factores de crecimiento y en condiciones libres de factores xenogénicos.
- 2.2. Caracterización de las células expandidas como OMESC.
- 2.3. Preparación del implante ocular: cultivo de las OMESC sobre una membrana de fibrina de PRGF en un medio de cultivo suplementado con PRGF como fuente de factores de crecimiento y en condiciones libres de factores xenogénicos.
- 2.4. Estudio de viabilidad y respuesta en un modelo animal de ratón atómico.

Objetivo 3. Estudio de eficacia en ojos de conejos con quemadura química alcalina:

- 3.1. Preparación de los MTA empleando tejidos de conejo.
- 3.2. Ensayo preclínico en cuatro grupos de conejos tratados con: tratamiento médico exclusivo, membrana de fibrina de PRGF, MSC y OMESC.
- 3.3. Análisis clínico, morfológico y fenotípico de las córneas antes de la lesión, después de la lesión, y antes y después del trasplante del MTA.

7. MATERIAL Y MÉTODO

7.1. MEDICAMENTOS DE TERAPIAS AVANZADAS HUMANOS LIBRES DE FACTORES XENOGÉNICOS

7.1.1. Preparación del PRGF humano para cultivo celular

a) Obtención de sangre completa

La sangre se obtuvo de voluntarios (de edad entre 23-64 años) sanos y altruistas en el Instituto Oftalmológico Fernández-Vega (Asturias, España) y su Fundación de Investigación Oftalmológica (Asturias, España), tras la firma del consentimiento informado (Anexo I). De cada voluntario, se extrajeron 72 mL de sangre en tubos de 9 mL con 0,129 M de citrato de sodio como anticoagulante (BTI) mediante venopunción.

b) Preparación del plasma sanguíneo

Se empleó el sistema de Endoret®(PRGF®) de BTI siguiendo las indicaciones de uso del fabricante modificadas como se describe a continuación (**Figura 10**), para adaptar dicha tecnología al sistema de cultivo autólogo de tejidos humanos [79].

Después de cada extracción de sangre, se centrifugaron los tubos a 580 g durante 8 min empleando la centrifuga PRGF System® modelo *System IV* (BTI) a temperatura ambiente dentro de las primeras 4 h desde su extracción. Tras la centrifugación, el plasma de cada tubo se separó en una fracción superior (F1) y una fracción inferior (F2). La F2 se corresponde a los 2 mL de plasma más cercanos a la serie blanca y la F1 al volumen de plasma restante por encima de F2. Posteriormente, se recogieron sin provocar turbulencias las F1 y después las F2, ambas fracciones se separaron en dos tubos estériles de 50 mL (Corning™ Falcon™, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.).

c) Preparación del PRGF como suplemento para el medio de cultivo

Las F1 se dividieron en alícuotas de 5 mL en tubo estériles y se incubaron con 100 µL de cloruro de calcio a 100 mg/mL (B Braun, Melsungen, Alemania) a 37 °C durante 1 h. Los sueros liberados se recogieron por aspiración, para posteriormente, hacer un *pool* que se conservó en alícuotas de 5 mL a -20 °C hasta su uso como fuente de factores de crecimiento en el medio de cultivo para las células expandidas a partir de tejidos humanos.

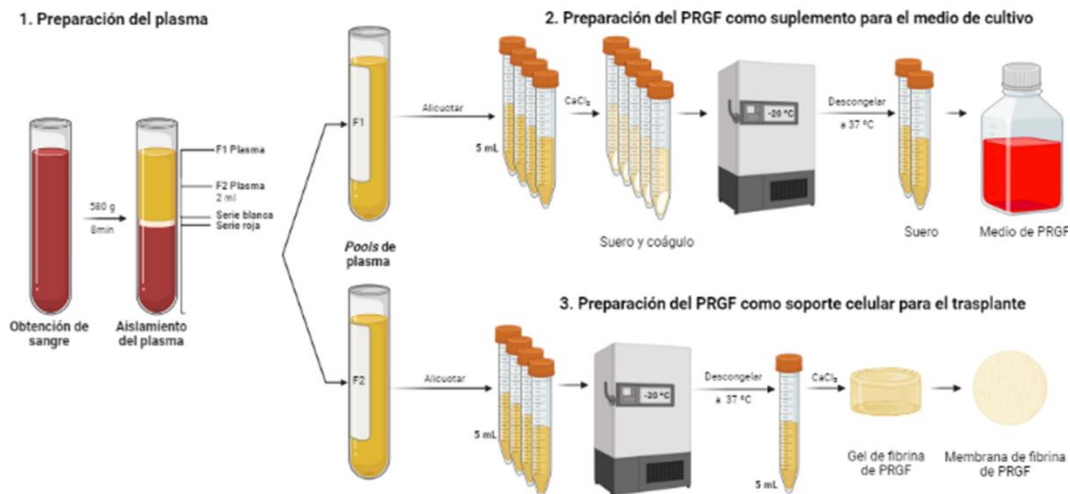


Figura 10. Preparación del PRGF humano para el cultivo y trasplante celular. (1) Obtención de sangre completa. (2) Preparación del plasma sanguíneo. (3) Preparación de PRGF como suplemento para el medio de cultivo. (4) Preparación del PRGF como soporte celular para el trasplante. **F:** fracción de plasma. **PRGF:** plasma rico en factores de crecimiento.

d) Preparación del PRGF como soporte celular para el trasplante

Las F2 se dividieron en alícuotas de 5 mL en tubos estériles y se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso para preparar las membranas de fibrina de PRGF. Las alícuotas se descongelaron en un baño a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, y se preparó un gel de fibrina de PRGF mezclando $100\text{ }\mu\text{L}$ de cloruro de calcio (100 mg/mL) con la F2 dentro de un pocillo de $9,6\text{ cm}^2$ (35 mm de diámetro) de una placa de 6 pocillos (Thermo Fisher Scientific) e incubando a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min. Una vez coagulado el gel, se preparó la membrana de fibrina de PRGF de $500\text{ }\mu\text{m}$ de espesor comprimiendo el gel durante 30 s dentro de un conformador (BTI). La membrana de fibrina de PRGF se colocó sobre un disco de nitrocelulosa de aproximadamente 25 mm de diámetro (Merck Millipore, Munster, Irlanda) para mantenerla extendida y facilitar su manejo hasta el trasplante. Seguidamente se colocó sobre un *insert* Corning® Transwell® de $4,5\text{ cm}^2$ (24 mm de diámetro) y $0,4\text{ }\mu\text{m}$ de tamaño de poro (Sigma-Aldrich, Missouri, EE. UU.) y se introdujo en un pocillo de $9,6\text{ cm}^2$ de una placa de 6 pocillos con 1 mL del medio de cultivo correspondiente para mantener la humedad de la membrana y evitar su deshidratación y deterioro. La membrana de fibrina de PRGF se empleó inmediatamente como soporte de cultivo de las células expandidas a partir de los tejidos humanos.

7.1.2. Obtención de tejidos

Este trabajo se llevó a cabo de acuerdo con las directrices de la Declaración de Helsinki y fue aprobada por el Comité de Ética de Investigación del Principado de Asturias (Código de Protocolo: 2020.50; 23 de marzo de 2020).

Para este estudio se utilizaron 10 biopsias de aproximadamente 0,5-1,5 cm² de tejido adiposo subcutáneo de la almohadilla de grasa infrapatelar y 10 biopsias de entre 4 y 8 mm² de tejido de mucosa oral tanto queratinizada (gingival) como no queratinizada (piso de la boca y paladar blando). Ambos tejidos se obtuvieron de donantes altruistas de órganos y tejidos del Hospital Universitario Central de Asturias (Asturias, España), tras la firma del consentimiento informado por escrito siguiendo las leyes españolas en materia de donación de órganos y tejidos. Las biopsias se obtuvieron y analizaron por el Centro de Sangre y Tejidos (Asturias, España) y se recibieron en la Fundación de Investigación Oftalmológica, previa firma del acuerdo de colaboración entre ambos centros. Los tejidos se transportaron en *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) (Thermo Fisher Scientific) con antibióticos, usando un contenedor isotérmico refrigerado con pastillas de frío de forma que el acumulador de frío no entrase en contacto directo con el frasco de medio de transporte.

7.1.3. Cultivo y caracterización de MSC

Las MSC se expandieron a partir de grasa subcutánea y se caracterizaron mediante distintas técnicas como se describe a continuación y se representa en la **Figura 11**.

a) Cultivo primario de MSC

a1. Preparación de la grasa subcutánea

Tras la recepción del tejido en la Fundación de Investigación Oftalmológica, la biopsia se mantuvo 1 día a 4 °C dentro de medio de conservación fresco compuesto por: DMEM suplementado con 40 µg/mL de vancomicina, 40 µg/mL de amikacina (Normon, Madrid, España) y 0,5 µg/mL de anfotericina B (Ambisome, Gilead Sciences, Madrid, España). Posteriormente, se colocó la biopsia sobre una placa Petri de 100 mm de diámetro con 3 mL del medio para evitar que se seque el tejido, se limpió con ayuda de unas tijeras y pinzas estériles para retirar los restos de tejido conectivo, y finalmente, se cortó en pequeños fragmentos, que llamaremos explantes, de 1-2 mm² aproximadamente.

a2. Expansión de MSC *in vitro*

En cada pocillo de 3,8 cm² de una placa de 12 pocillos (Thermo Fisher Scientific) se añadió 250 µL de medio de cultivo. Se colocó un explante de grasa en el centro de cada pocillo de manera que quedase en contacto con el plástico de cultivo sin flotar para que las células pudiesen expandirse sobre el plástico de cultivo. Se cultivaron los explantes a 37 °C en un incubador con 5 % de CO₂ y humedad saturada con cambio de medios cada 2-3 días. Se empleó el medio de cultivo descrito por Odabas S *et al.* [82] ligeramente modificado: DMEM y *Ham's F12 nutrient mixture* (F12) (Thermo Fisher Scientific) (2:1) suplementado con 10% de PRGF humano, 100 U/mL de penicilina y 0,1 mg/mL de estreptomina. La evolución de los cultivos celulares se siguió siempre con un microscopio de contraste de fases DMIL LED y se registró usando la cámara EC3 acoplada al microscopio (Leica Biosystems, Cataluña, España).

a3. Subcultivo de MSC *in vitro*

Las MSC expandidas en tres pocillos de cultivo de 3,8 cm² cada uno se despegaron con TrypLE™ Express Enzyme (TrypLE) (Thermo Fisher Scientific) cuando alcanzaron el 80-90 % de confluencia, y posteriormente, se sembraron en un frasco de cultivo de 75 cm² (Thermo Fisher Scientific) con 10 mL de medio de cultivo fresco. Las MSC se mantuvieron en el incubador a 37 °C con cambio de medios cada 2-3 días. Una vez alcanzada la confluencia del 80-90 %, se realizaron dos subcultivos seriados de 1/10 de las células crecidas en el frasco de 75 cm², como se acaba de describir, para obtener cultivos de MSC en fase 3 confluentes.

a4. Criopreservación y descongelación de MSC

Las MSC se criopreservaron cuando el cultivo en fase 3 alcanzó el 90 % de confluencia. Para ello se levantaron las células con TrypLE, se centrifugaron y resuspendieron en 3 mL de medio de congelación. Se congelaron entre 1-1.5 x 10⁶ células por cada criovial (Thermo Fisher Scientific). Se mantuvieron a -80 °C durante 1 día y posteriormente se conservaron en nitrógeno líquido hasta su uso. El medio de congelación se preparó con: DMEM suplementado con 10 % de PRGF y 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO) [82] (Sigma-Aldrich). Las MSC se recuperaron descongelando los crioviales en un baño a 37 °C. El medio de congelación se eliminó diluyendo 1:1 con medio de cultivo y centrifugando a 400 g durante 5 min. Finalmente, el *pellet* se resuspendió y sembró en un frasco de 75 cm² con medio de

cultivo fresco. Las MSC se cultivaron hasta alcanzar el 80-90 % confluencia con cambio de medios cada 2-3 días.

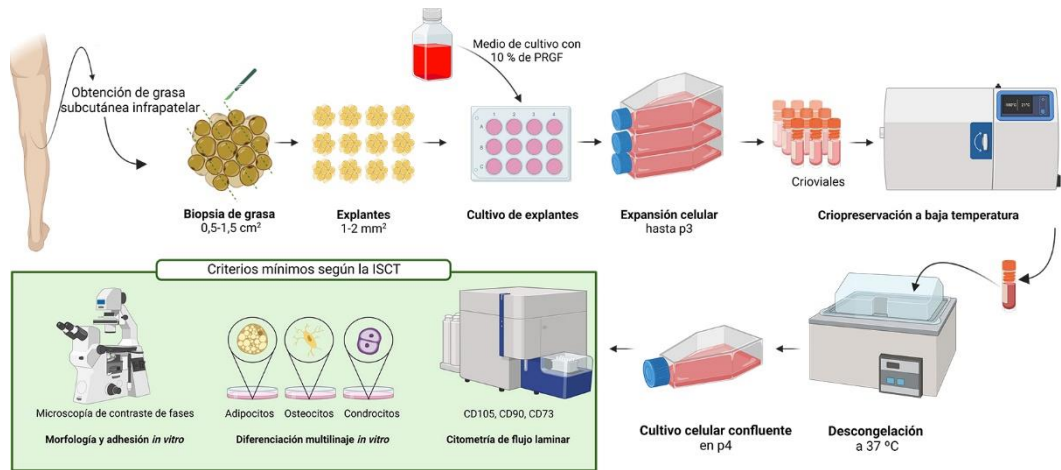


Figura 11. Cultivo y caracterización de MSC a partir de grasa subcutánea. Obtención y preparación de tejidos, expansión *in vitro* con medio de cultivo de PRGF, subcultivo hasta fase 3, criopreservación hasta su uso, descongelación y caracterización de las células expandidas como MSC mediante morfología, diferenciación multilínea *in vitro* y citometría de flujo laminar. **CD**: grupo o antígeno de diferenciación. **p3/4**: fase 3/4. **ISCT**: International Society for Cell & Gene Therapy. **MSC**: células madre mesenquimales. **PRGF**: plasma rico en factores de crecimiento.

b) Caracterización de las MSC

Se caracterizaron las MSC obtenidas a partir de tejido adiposo mediante el estudio de los criterios mínimos de las MSC descritos por la International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT) [83]. Se descongelaron dos crioviales de MSC en fase 3 y se sembró cada uno en un frasco de 75 cm², una vez alcanzaron el paso 4 al 80% de confluencia, se levantaron las células con TrypLE para llevar a cabo las caracterizaciones: con un frasco se realizó la adipogénesis, osteogénesis y condrogénesis, y con otro frasco se realizó la citometría de flujo laminar.

b1. Adipogénesis y osteogénesis

Se sembraron 20.000 células viables/cm² en 10 pocillos de 1,9 cm² de una placa de 24 pocillos (Thermo Fisher Scientific). Las MSC se cultivaron durante 3 días a 37 °C en un incubador con 5 % de CO₂ y humedad saturada con medio de cultivo fresco. Posteriormente, se reemplazó el medio de cultivo por los medios de adipogénesis (5 pocillos) y de osteogénesis (5 pocillos), cambiando los medios cada 2-3 días durante 21 días. Los cultivos se fijaron con metanol absoluto (Sigma-Aldrich) frío a 4 °C durante 10 min y se tiñeron. Los cultivos con

medio adipogénico se lavaron con alcohol isopropílico al 60 % y se tiñeron con *Oil Red O* (Sigma-Aldrich) al 0,3 % para detectar las vacuolas lipídicas intracelulares. Los cultivos con medio osteogénico se tiñeron con *Alizarin Red S* (Sigma-Aldrich) al 2 % en oscuridad para marcar los depósitos extracelulares de calcio. Una vez teñidos, los cultivos se lavaron y se observaron bajo un microscopio de contraste de fases de Leica Biosystems.

El medio adipogénico se preparó con: DMEM:F12 (2:1), 10 % de PRGF, 1 μ M de dexametasona, 10 μ M de insulina, 0,5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina, 200 μ M de indometacina, 100 U/mL de penicilina y 0,1 mg/mL de estreptomina (Sigma-Aldrich). El medio osteogénico se preparó con: DMEM:F12 (2:1), 10 % de PRGF, 1 μ M de dexametasona, 50 μ M de ácido ascórbico, 10 mM de β -glicofosfato, 100 U/mL de penicilina y 0,1 mg/mL de estreptomina (Sigma-Aldrich).

b2. Condrogénesis

Se preparó una suspensión de MSC a $1,6 \times 10^7$ células viables/mL y se procedió siguiendo las indicaciones del kit de diferenciación condrogénica StemPro[®] MSC SFM *XenoFree* (Thermo Fisher Scientific). Se pipetearon 5 μ L de la suspensión en el centro de 48 pocillos de 1,1 cm² de una placa de 48 pocillos (Thermo Fisher Scientific) y se incubaron 2 h a 37 °C en una atmósfera húmeda para formar micromasas de células adheridas entre ellas y al plástico de cultivo. Las micromasas se cultivaron en StemPro[®] *Chondrocyte Differentiation Basal Medium* suplementado con StemPro[®] *Chondrogenesis Supplement* a 37 °C en un incubador con 5 % de CO₂ y humedad saturada con cambio de medio todos los días durante 21 días. Las micromasas se fijaron en glutaraldehído al 2,5 % durante 30 min a temperatura ambiente. Se tiñeron con *Alcian Blue* para detectar glicosaminoglicanos y mucopolisacáridos característicos de la matriz cartilaginosa y se observaron y fotografiaron con el microscopio de contraste de fases de Leica Biosystems.

b3. Citometría de flujo laminar

Se preparó una suspensión de MSC a 5×10^6 células viables/mL, y se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) suplementado con 0,5 % de albúmina de suero bovino (Sigma Aldrich). Se marcaron las células incubándolas con anticuerpos monoclonales siguiendo las instrucciones del kit *Mesenchymal Cell* (Immunostep, Castilla y León, España): FITC anti-CD90 y CD44, PE anti-CD105 y CD166, APC anti-CD29 y CD73 y PerCP anti-CD45,

CD34, CD4, CD19 y HLA-DR. La viabilidad celular se estudió marcando con ioduro de propidio (Becton Dickinson Bioscience, Nueva Jersey, EE. UU.). El inmunofenotipado se realizó con un citómetro de flujo FACS Aria II™ (Becton Dickinson Bioscience), y posteriormente, se analizaron los datos obtenidos y se representaron gráficamente usando el software FlowJo (Trre Star, Oregon, EE. UU.). Se calculó la media (M) del porcentaje de expresión de cada marcador y su desviación estándar (SD) utilizando una hoja de cálculo de Excel (Microsoft, Washington, EE. UU.).

7.1.4. Cultivo y caracterización de OMESC

Las OMESC se expandieron a partir de mucosa oral y se caracterizaron mediante inmunofluorescencia (IF) como se describe a continuación y se representa en la **Figura 12**.

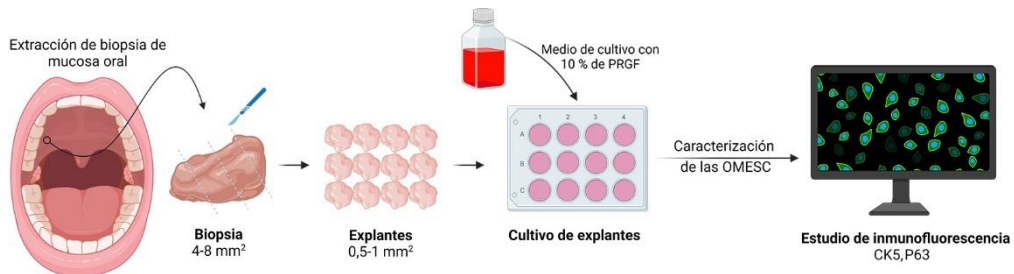


Figura 12. Cultivo y caracterización de OMESC a partir de mucosa oral. Obtención y preparación de tejidos, expansión *in vitro* con medio de cultivo de PRGF y caracterización mediante estudio de IF. **CK**: citoqueratina. **IF**: inmunofluorescencia. **OMESC**: células madre epiteliales de mucosa oral. **PRGF**: plasma rico en factores de crecimiento. **P63**: proteína tumoral p63.

a) Cultivo primario de OMESC

a1. Preparación de la mucosa oral

Se separaron los 2/3 inferiores de la biopsia con ayuda de un bisturí y unas tijeras estériles y se descartó. La porción superior de la biopsia, que incluía el epitelio, se cortó en pequeños explantes de hasta 0,5-1 mm² y se sembraron de forma similar a la descrita para la grasa.

a2. Expansión de OMESC *in vitro*

Se empleó el medio de cultivo descrito [84] modificado: DMEM:F12 (2:1) suplementado con 10 % de PRGF humano, 24 µg/L de adenina, 5 µg/mL de insulina, 1,3 ng/mL de triiodotironina, 0,4 µg/mL de hidrocortisona, 8,3 ng/mL de toxina colérica (Sigma-Aldrich), 40 µg/mL de vancomicina, 40 µg/mL de amikacina y 0,5 µg/mL de anfotericina B. A partir

del primer cambio el medio de cultivo se añadió factor de crecimiento epitelial (EGF, Austral Biologicals, California, EE. UU.) a una concentración a 10 µg/mL. La evolución de los cultivos celulares se siguió con un microscopio de contraste de fases de Leica Biosystems.

b) IF

Cultivos al 90 % de confluencia se fijaron con paraformaldehído (Sigma-Aldrich) al 4 % en PBS a temperatura ambiente durante 15 min, se lavaron con PBS y se incubaron con Tritón™ X-100 (Sigma-Aldrich) diluido en PBS al 0,3 % durante 10 min para permeabilizar las células. Posteriormente, se retiró el Tritón™ X-100 y se lavó tres veces con PBS durante 5 min. Las células se marcaron con uno o dos anticuerpos primarios diluido en PBS con 10 % de suero de cabra (Life Technologies, California, EE. UU.) para bloquear las reacciones inespecíficas e incubando a 4 °C hasta el día siguiente. Los anticuerpos primarios empleados y su dilución fueron los siguientes: anti-CK5 (1:100, monoclonal, conejo, clon EP1601Y, Abcam, Cambridge, Reino Unido) y anti-proteína tumoral p63 (P63) (1:100, monoclonal, conejo, clon EPR5701, Abcam).

A continuación, se retiró el anticuerpo primario, se lavó 5 min con PBS y se incubaron las células con el correspondiente anticuerpo secundario policlonal anti-IgG de conejo o ratón (conjugados con Alexa Fluor® 488 o 594) (Sigma-Aldrich) diluido 1:500 en PBS a temperatura ambiente y en agitación durante 2 h.

Finalmente, se lavó 5 min con PBS y se marcaron los núcleos incubando 10 min a temperatura ambiente con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Thermo Fisher Scientific). Tras retirar el DAPI y lavar 5 min con PBS, se cubrieron las células con PBS y se observó el marcaje bajo un microscopio de fluorescencia DMI6000B registrándolo fotográficamente con una cámara DFC310FX acoplada al microscopio (Leica Biosystems).

7.1.5. Implantes oculares de células madre humanas

a) Preparación del implante ocular

Para hacer un implante se sembraron las MSC (en pase 4) o las OMESC (en pase 0) a una densidad de $2,1 \times 10^5$ células/cm² en 300 µL de medio de cultivo sobre una membrana de fibrina de PRGF de 4,5 cm² preparada tal y como se describe en la página 72. Se empleó el medio de cultivo correspondiente para cada tipo celular añadiendo 1,5 mg/mL de ácido tranexámico (Amchafibrin®, Meda Pharma SL, Madrid, España) a su composición para evitar

la fibrinólisis. Las células se cultivaron a 37 °C en un incubador con 5 % de CO₂ y humedad saturada con cambio de medios cada día durante 2 días para las MSC y durante 3 días para las OMESC (Figura 13). Los cultivos celulares empleados cumplieron los criterios descritos en la Tabla 3 antes de realizar el implante ocular. Los implantes oculares se observaron bajo el microscopio de contraste de fases de Leica Biosystems.

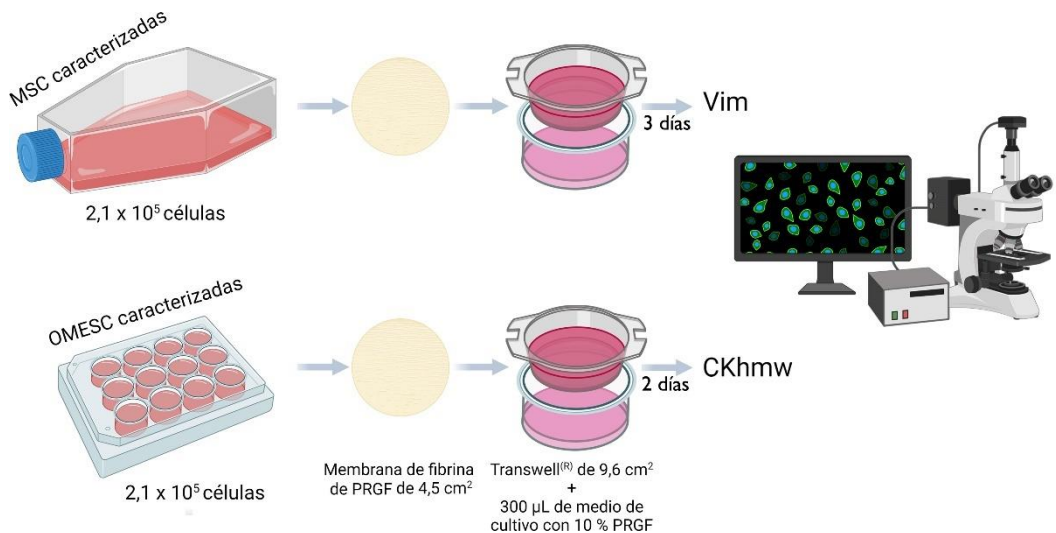


Figura 13. Preparación y caracterización de los implantes oculares de células madre. Siembra de las células madre sobre una membrana de fibrina de PRGF, cultivo con medio de cultivo de PRGF y caracterización mediante IF. **CKhmw**: citoqueratinas de alto peso molecular. **MSC**: células madre mesenquimales. **OMESC**: células madre epiteliales de mucosa oral. **PRGF**: plasma rico en factores de crecimiento. **Vim**: vimentina.

Tabla 3. Criterios de selección de los cultivos celulares para la preparación del implante ocular.

Cultivos de MSC	Cultivos de OMESC
* Cultivo primario en pase 4.	* Cultivo primario en pase 0.
* Cultivo homogéneo y confluyente.	* Cultivo homogéneo y confluyente.
* Morfología tipo fibroblástica.	* Morfología tipo epitelial
* Células adheridas al plástico.	* Ausencia de crecimiento de fibroblastos o inferior al 5 % de la superficie total de cultivo.
* Caracterizadas positivamente mediante diferenciación in vitro multilínea.	* Caracterizadas positivamente para los marcadores P63 y CK5.

CK: citoqueratina. **MSC**: células madre mesenquimales. **OMESC**: células madre epiteliales de mucosa oral. **P63**: proteína tumoral p63.

b) IF

Se siguió la metodología previa descrita en la página 78 empleando los anticuerpos primarios y su dilución siguientes: anti-Vimentina (Vim) humana (1:100, monoclonal, conejo, clon SF20, Abcam) para las MSC, anti-CKs de alto peso molecular (CK_{hmw}) 1, 5, 10 y 14 humanas (1:40, monoclonal, ratón, clon 34βE12, Dako, California, EE. UU.) para las OMESC y DAPI para marcar los núcleos.

7.1.6. Animales

Todos los animales de este estudio se trataron de acuerdo con *The Association for Research in Vision and Ophthalmology Resolution on the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research*. Tanto los animales como los procedimientos experimentales empleados se aprobaron por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Oviedo, y se autorizaron en la resolución PROAE 21/2019 (Anexo II) alzada por la Conserjería de Desarrollo Rural y Recursos Naturales.

Se emplearon ratones atímicos cepa *Swiss Nude* (CrI:UN(Ico)-Foxn1^{nu}) machos, de 6-7 semanas de edad y con peso entre 25 y 30 g adquiridos a Charles River Laboratories (Les Oncins, Francia); y conejos cepa *white New Zealand* machos, de 3-4 semanas de edad y entre 2,5-3,0 kg de peso adquiridos a la Granja San Bernardo (Navarra, España).

Los animales se estabularon dentro de las instalaciones del Bioterio de la Universidad de Oviedo (Asturias, España) registrado con el número ES330440003591 en la Conserjería de Desarrollo Rural y Recursos Naturales del Principado de Asturias como centro de cría y usuario de animales de experimentación en cumplimiento del Real Decreto 53/2013. La Unidad de Bioterio de la Universidad de Oviedo permitió estabular y mantener los animales en jaulas individuales aisladas bajo las condiciones ambientales constantes y controladas que determina la Conserjería de Medio Rural y Pesca del Principado de Asturias. Los ratones atímicos se estabularon en condiciones libre de patógenos dentro de jaulas ventiladas para biocontención, con ciclos de 12 h de luz/ 12 h de oscuridad, a 22 ± 2 °C, 55 ± 10 % de humedad con comida y agua *ad libitum*. Durante los procedimientos quirúrgicos fuera de las jaulas, los ratones se manipularon dentro de cabinas de seguridad biológica. Los conejos se estabularon en salas de estabulación convencionales con ciclos de 12 h de luz/12 h de oscuridad, a 18 ± 3 °C, 55 ± 10 % de humedad y con comida y agua *ad libitum*.

7.1.7. Estudio *in vivo* de los MTAs humanos

a) Trasplante subcutáneo en ratón atímico

Los experimentos se llevaron a cabo en 9 ratones atímicos, que se dividieron en tres grupos experimentales de 3 animales cada uno según el injerto recibido: una membrana de fibrina de PRGF humano, el implante ocular de MSC humanas o el implante ocular de OMESC humanas.

Los injertos fueron trasplantados a nivel subcutáneo en el dorso del animal previamente anestesiado vía inhalatoria con isoflurano al 2 % (Ecuphar® Veterinaria, Barcelona, España). Se hicieron tres incisiones formando una ‘U’ en el dorso del ratón y se abrió un bolsillo subcutáneo de 5 cm². A continuación, se colocó el injerto correspondiente sobre la fascia toracolumbar posterior con las células en contacto con dicha fascia cuando se incluían en el injerto (**Figura 14 A**). Finalmente, se retiró el disco de nitrocelulosa (**Figura 14 B**), se cubrió el injerto con la piel y se cerró el bolsillo usando sutura de seda 4-0 no reabsorbible (Covidien™ Medtronic, Dublín, Irlanda) (**Figura 14 C**). Se realizó el seguimiento de la herida durante 21 días, y posteriormente los ratones se eutanasiaron en una cámara de CO₂. El tejido injertado se recuperó mediante disección quirúrgica y se fijó en paraformaldehído al 4 % para su posterior análisis mediante tinción histológica con hematoxilina y eosina (H&E) e inmunohistoquímica (IHQ)

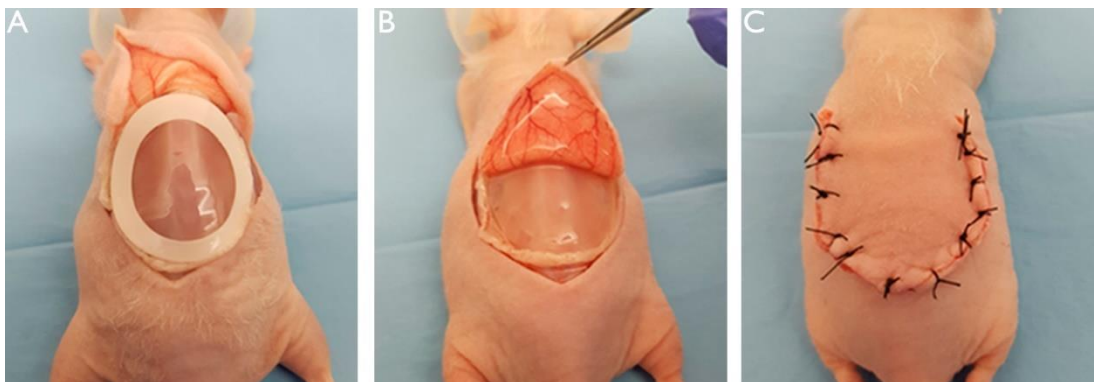


Figura 14. Trasplante de los implantes oculares de células madre en ratones atímicos. (A) Se abre en el dorso del ratón un bolsillo subcutáneo, (B) se coloca el implante ocular con las células en contacto con la fascia inferior y (C) se cierra el bolsillo con sutura 4-0.

b) Preparación de secciones histológicas

Las muestras fijadas se lavaron en PBS y se deshidrataron en disoluciones seriadas de alcohol a concentraciones crecientes (70 %, 80 %, 90 %, y etanol absoluto) y en xileno (Sigma-Aldrich). Seguidamente, se embebieron en bloques de parafina y se conservaron a temperatura ambiente hasta su uso. Posteriormente, se hicieron cortes transversales de 5 μm de sección que se montaron sobre portaobjetos de vidrio (Thermo Fisher Scientific). Previamente a ser usadas, las secciones se desparafinaron 10 min en xileno dos veces, 10 min en etanol absoluto dos veces y 5 min en disoluciones seriadas de alcohol a concentraciones decrecientes (90 %, 80 % y 70 %), y se hidrataron en agua destilada.

c) Tinción con hematoxilina-eosina

Las secciones de las muestras desparafinadas se tiñeron 2 min en hematoxilina de Harris y 1 min en eosina B (Merck Millipore), se aclararon y se deshidrataron 1 min en alcoholes a concentraciones decrecientes (etanol absoluto, 90 %, 80 % y 70 %) y 1 min en xileno dos veces. Finalmente, se montaron con medio de montaje para microscopía Entellan™ (Merck Millipore) y un cubreobjetos de vidrio (Thermo Fisher Scientific) y se observaron bajo un microscopio de campo claro DM6000B registrando los resultados con la cámara DFC310FX (Leica Biosystems).

d) Inmunohistoquímica

d1. Detección *ex vivo* de MSC trasplantadas en ratón

Las secciones de las muestras desparafinadas se desenmascararon sumergidas en tampón de citrato de sodio calentando a 87 °C durante 10 min mediante un microondas (LG, Madrid, España) a 140 W de potencia. El tampón de citrato de sodio se preparó con 10 mM de citrato de sodio, 0,05 % de Tween-20 y el pH ajustado a 6 con HCl 1 M. Las muestras se lavaron dos veces con PBS durante 10 min y se incubaron 5 min con peróxido de hidrógeno (Sigma-Aldrich) al 3 % en metanol absoluto. A continuación, se lavaron 10 min con PBS tres veces y se trataron en PBS con Tritón™ X-100 al 0,05 % durante 10 min tres veces para permeabilizar las células. Las muestras se lavaron tres veces con PBS durante 10 min, y posteriormente se marcaron las células incubando a 4 °C durante 2 días en cámara húmeda con un anticuerpo primario diluido en PBS con Tritón™ X-100 al 0,05 % y suero de cabra al 10 % para bloquear las reacciones inespecíficas. El anticuerpo primario empleado y su dilución fue la siguiente: anti-Vim humana (1:100) para las MSC.

Se retiró el anticuerpo primario, se lavó tres veces con PBS durante 10 min y se incubaron las muestras en cámara húmeda durante 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-IgG conjugado con peroxidasa contra la especie del anticuerpo primario (1:200, Vector Laboratories, California, EE. UU.) diluido en PBS. Posteriormente, se lavaron las muestras tres veces con PBS durante 10 min, y se incubaron con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain® Elite ABC-HRP Kit, Vector Laboratories) durante 2 h a temperatura ambiente, en cámara húmeda y en oscuridad siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, las secciones se lavaron 10 min en PBS tres veces y 10 min en tampón PBS 0,1 M (pH 7,4) para adecuarlas al medio de revelado. El marcaje se reveló incubando las muestras con peróxido de hidrógeno al 0,03 % y 3,3'-diaminobenzidina al 0,1 % en PBS 0,1 M (pH 7,4) durante 10-20 s o hasta visualizar el precipitado marrón. El tiempo de reacción se controló bajo el microscopio óptico de campo claro de Leica Biosystems y se paró con PBS 0,1 M (pH 7,4). Posteriormente, se marcaron los núcleos incubando 2 min en hematoxilina de Harris, se aclararon y se deshidrataron 1 min en alcoholes a concentraciones decrecientes (etanol absoluto, 90 %, 80 % y 70 %) y 1 min en xileno dos veces. Finalmente, se montaron con medio de montaje para microscopía Entellan™ y un cubreobjetos de vidrio y se observaron bajo un microscopio de campo claro de Leica Biosystems.

d2. Detección *ex vivo* de OMESC trasplantadas en ratón

Se realizó una IF sobre las secciones de las muestras desparafinadas siguiendo la metodología descrita en la página 78 con el anticuerpo primario anti-CKhmw diluido 1:100, el marcaje se reveló incubando con el anticuerpo secundario policlonal anti-IgG de ratón, los núcleos se marcaron con DAPI, se montaron las muestras usando medio de montaje para fluorescencia (Dako) y un cubreobjetos, y se observaron las muestras bajo el microscopio de fluorescencia de Leica Biosystems.

7.2. ENSAYO PRECLÍNICO DE LOS MTA

7.2.1. Diseño experimental

Se extrajeron sangre y tejidos adiposo y oral de los conejos para obtener factores de crecimiento, membranas de fibrina, cultivos de MSC y cultivos de OMESC. Se prepararon implantes oculares de MSC y OMESC de conejo de manera similar a los implantes oculares humanos. Se indujo una lesión por quemadura con NaOH en el ojo derecho de 18 conejos (el izquierdo sirvió de control), inmediatamente después, se lavó, se aplicó un tratamiento médico y se favoreció la reepitelización de la córnea cubriéndola con una tarsorrafia. Los ojos se examinaron clínicamente y se trataron después de una semana (**Figura 15**).

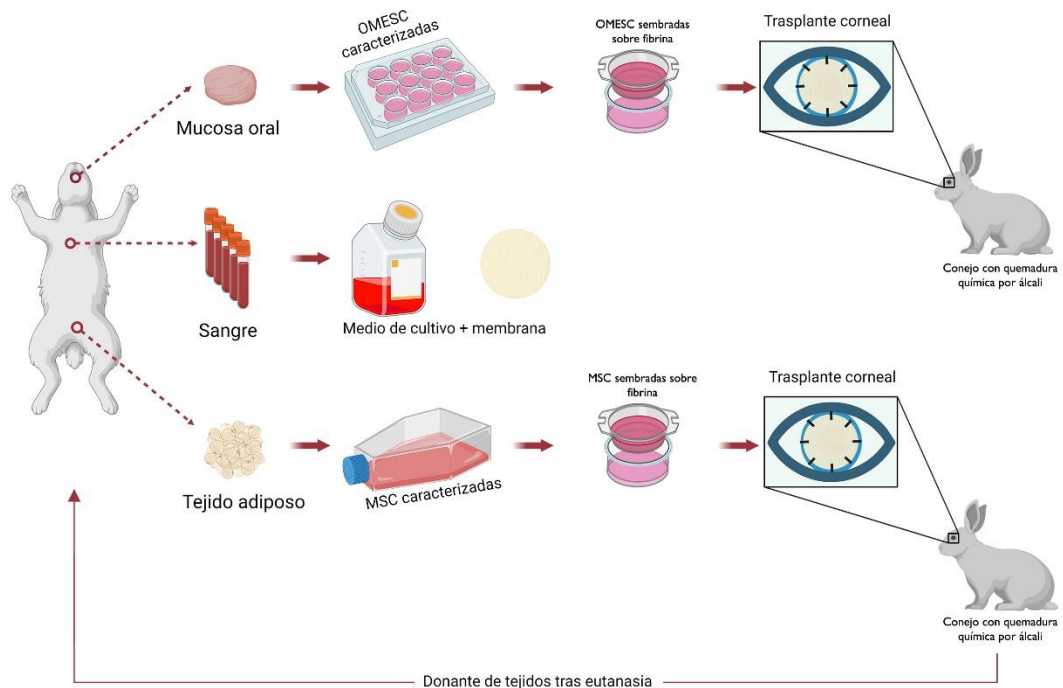


Figura 15. Diseño experimental del ensayo preclínico. Obtención de tejidos oral, adiposo y sangre completa de conejo. Preparación de medios de cultivo, membranas de fibrina y cultivos de MSC y OMESC. Preparación de los implantes oculares de MSC y de OMESC. Y, trasplante corneal de los implantes oculares en modelo animal de conejo con traumatismo ocular previo. **MSC:** células madre mesenquimales. **OMESC:** células madre epiteliales de mucosa oral.

Los animales se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos de 4-5 conejos cada uno: tratamiento médico exclusivo (n= 5, GCTM), tratamiento con una membrana de fibrina de

PRGF humano (n= 5, GCM), tratamiento con MSC (n= 4, GMSC) y tratamiento con OMESC (n= 4, GOMESC).

Los conejos fueron evaluados (integridad epitelial, neovascularización corneal, pannus fibrovascular y opacidad corneal) tras 42 días de seguimiento clínico. Los conejos fueron eutanasiados y sus córneas se sometieron a exámenes histológicos e inmunohistoquímicos.

7.2.2. Preparación de PRGF de conejo para cultivo celular

a) Obtención de sangre completa

La sangre se obtuvo de los conejos de este estudio en el punto final y de conejos (machos, \leq 3 meses de edad) de otros proyectos ajenos, cuya donación no supusiera un riesgo para nuestro estudio, tras ser eutanasiados en el Bioterio de la Universidad de Oviedo, respetando así la reducción del número de animales de experimentación contemplada en el código ético de experimentación animal (Real Decreto 53/2013). Los conejos se anestesiaron (página 88) y se extrajo de cada uno de ellos entre 76 y 100 mL de sangre en tubos de 4,5 mL con 0,129 M de citrato de sodio como anticoagulante (Becton Dickinson Bioscience) de la arteria auricular y mediante punción cardíaca. Finalmente, los conejos fueron eutanasiados (página 91).

b) Preparación del plasma sanguíneo

El plasma se preparó a partir de los tubos de sangre dentro de las primeras 4 h desde su extracción. Se centrifugaron los tubos a 460 g durante 8 min y a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, se aisló el plasma, la serie blanca y la serie roja. Se pipeteó cuidadosamente toda la columna de plasma y se descartó la serie blanca y la roja subyacentes.

c) Preparación del PRGF como suplemento para los medios de cultivo

Se realizó un *pool* de plasma de varios conejos, después se tomaron 20 mL de plasma, se dividió en alícuotas de 5 mL en tubos estériles y se procesó como se ha descrito en la página 71. Es decir, se incubó con cloruro de calcio 100 mg/mL (20 μ L/mL de plasma), los sobrenadantes se recogieron, mezclaron, alicuotaron y conservaron congelados a -20 °C hasta su uso como fuente de factores de crecimiento en el medio de cultivo de las células expandidas a partir de tejidos de conejos.

d) Preparación del PRGF como soporte celular para el trasplante

Se tomaron 23 mL del *pool* de plasma y se dividió en alícuotas de 7,5 mL en tubos estériles y se conservaron a -20 °C hasta su uso para preparar las membranas de fibrina de PRGF. Se descongeló el plasma en un baño a 37 °C. Se preparó un gel de fibrina mezclando 7,5 mL de plasma de conejo con 150 µL de cloruro de calcio a 100 mg/mL dentro de un pocillo de 9,6 cm² de una placa de 6 pocillos e incubando a 37 °C durante 30-45 min. Una vez formado el gel, se preparó la membrana de fibrina de PRGF tal cual se ha descrito para preparar la membrana de fibrina de PRGF humano (página 72). Es decir, se comprimió el gel para formar la membrana, se montó sobre un disco de nitrocelulosa, se colocó dentro de un *insert* y se pasó a un pocillo de 9,6 cm² de una placa de 6 pocillos con 1 mL de medio de cultivo. La membrana de fibrina de conejo se empleó inmediatamente como soporte de cultivo de las células expandidas a partir de los tejidos de conejos.

7.2.3. Cultivo por explante de tejidos de conejo

a) Obtención de tejidos

Inmediatamente tras la obtención de sangre completa, se extrajo tejido oral y adiposo de los conejos eutanasiados. Se diseccionó la mucosa oral en biopsias de entre 4 y 8 mm² del piso de la boca (no queratinizada) y de las paredes del vestíbulo bucal (queratinizada). Posteriormente, se hizo una incisión en el hipogastrio siguiendo la línea medioesternal, se diseccionó la dermis hasta alcanzar el tejido adiposo subcutáneo y se extrajeron hasta 5 cm² de grasa. Tras la extracción, los tejidos de conejo se manipularon igual que los tejidos humanos (página 73). De manera que, las biopsias de conejo se transportaron en frío dentro de frascos con medio de transporte suplementado con antimicrobianos y se conservaron mantuvieron durante 1 día a 4 °C.

b) Cultivo y caracterización de MSC de conejo

b1. Expansión *in vitro* de MSC empleando medio de cultivo suplementado con PRGF

Se realizó siguiendo los métodos descritos para el cultivo de grasa subcutánea humana con mínimas variaciones (página 74). Es decir, se prepararon los explantes de grasa y se cultivaron en un incubador a 37 °C con un medio de cultivo compuesto por DMEM:F12 (2:1) suplementado con 10 % de PRGF de conejo, 100 U/mL de penicilina y 0,1 mg/mL de estreptomina, y con cambios de medio cada 2-3 días. Las células fueron subcultivadas hasta

alcanzar el pase 3 y criopreservadas hasta su uso. Se caracterizaron las células mediante diferenciación multilínea a adipocitos, osteocitos y condrocitos. Se siguió la misma metodología descrita que para diferenciar las MSC humanas (página 75).

b2. Expansión *in vitro* de MSC empleando medio de cultivo suplementado con SBF

Se realizó siguiendo los métodos descritos en el párrafo anterior y utilizando el medio de cultivo compuesto por DMEM:F12 (2:1) suplementado con 20 % de SBF [82], 100 U/mL de penicilina y 0,1 mg/mL de estreptomina. Se caracterizaron las células mediante diferenciación multilínea a adipocitos, osteocitos y condrocitos siguiendo el método ya descrito (página 75). En este caso, los medios de cultivo de adipogénesis y osteogénesis se suplementaron con SBF al 20 % [82].

c) Cultivo primario y caracterización de OMESC

Se realizó siguiendo los métodos descritos para el cultivo de OMESC humana con ligeras variaciones. Brevemente, se prepararon los explantes de mucosa oral, y se cultivaron en un incubador a 37 °C con un medio de cultivo compuesto por DMEM:F12 (2:1) suplementado con 10 % de PRGF de conejo, 24 µg/L de adenina, 5 µg/mL de insulina, 1,3 ng/mL de triiodotironina, 0,4 µg/mL de hidrocortisona, 8,3 ng/mL de toxina colérica (Sigma-Aldrich), 40 µg/mL de vancomicina, 40 µg/mL de amikacina y 0,5 µg/mL de anfotericina B. Se realizaron cambios de medios cada 2-3 días, incorporando 10 µg/mL de EGF al medio de cultivo a partir del primer cambio de medio de cultivo. Se caracterizaron las células mediante IF empleando los anticuerpos primarios y diluciones: anti-CK5 (1:100) y anti-proteína tumoral p63 (1:100), y siguiendo la metodología descrita para las OMESC humanas (página 78).

7.2.4. Implantes oculares de células madre de conejo

a) Preparación del implante ocular

Se replicaron los implantes oculares siguiendo el mismo método descrito para preparar los implantes oculares humanos (página 78), y con los medios de cultivos correspondientes para las MSC de conejo y las OMESC de conejo suplementados con 1,5 mg/mL de ácido tranexámico. Es decir, se prepararon suspensiones de MSC en pase 4 y de OMESC en pase 0 y se sembraron a una densidad de $2,1 \times 10^5$ células/cm² en 300 µL de medio de cultivo

sobre 4,5 cm² de membrana de fibrina de conejo. Las células se cultivaron a 37 °C en un incubador con 5 % de CO₂ y humedad saturada con cambio de medios diarios durante 2 días para las MSC y durante 3 días para las OMESC. Los cultivos de MSC y OMESC empleados cumplieron los criterios descritos en la **Tabla 3** (página 79) antes de realizar el implante ocular.

b) IF

Las células madre de los implantes oculares se estudiaron mediante IF con los anticuerpos primarios anti-Vim (1:100, monoclonal, ratón, clon V9, Dako) para las MSC y anti-CK5 (1:100) para las OMESC, siguiendo el método descrito para los implantes oculares humanos (página 78).

7.2.5. Trasplante de los implantes oculares de conejo

a) Anestesia

Se colocó un catéter intravenoso en la vena marginal de una de las orejas. A continuación, se sedaron y se indujo la anestesia general con 0,01-0,05 mg/kg de buprenorfina (Richter Pharma AG, Wels, Austria) por vía subcutánea y un bolo intravenoso de 3-5 mg/kg de ketamina, 0,05-0,1 mg/kg de butorfanol (Richter Pharma AG) y 0,025-0,05 mg/kg de dexmedetomidina (Orion Pharma, Espoo, Finlandia). Se realizó una preoxigenación usando la mascarilla con 2-4 L/min de O₂ durante 2-3 min, y, se colocó un tubo endotraqueal de 3 mm de diámetro. Una vez intubado, se conectó al circuito de ventilación mecánica y se mantuvo la anestesia general con 400 mL/min·Kg de isoflurano al 1,5-2 % (Zoetis, Madrid, Spain) por vía inhalatoria mezclado con O₂ puro y óxido nitroso al 50-66 % que aportó una analgesia moderada. Durante la cirugía bajo anestesia general se monitorizaron las constantes usando un pulsioxímetro y se administró fluidoterapia basada en perfusión de 5-10 mL/h·Kg de suero fisiológico de NaCl al 0,9 % (B Braun) por vía intravenosa auricular. Finalmente, se aplicó anestesia local en el ojo derecho con 2-3 gotas de 1 mg/mL de hidrocloreuro de tetracaína y 4 mg/mL de hidrocloreuro de oxibuprocaína en colirio (Alcon, Ginebra, Suiza).

b) Modelo de conejo con traumatismo por causticación alcalina

Con el animal anestesiado y estable, se desinfectó la córnea con betadine diluido (1:1) en solución salina balanceada (BSS) (Zeiss, Jena, Alemania), se lavó con abundante BSS y se

retiró el exceso con una hemosteta triangular (Medical Mix SLU, Barcelona, España). Se quemó la córnea aplicando NaOH 1M (Sigma-Aldrich) con una gasa recortada con el tamaño de la córnea durante 10 s, e inmediatamente se lavó el exceso de NaOH con 25 mL de BSS [58]. Posteriormente, se embebió una hemosteta con NaOH 1M, se aplicó sobre el limbo esclerocorneal haciendo una circunferencia de 360° sobre éste, y se lavó con 25 mL de BSS. Se hizo una valoración clínica (**post-causticación**) de la integridad del epitelio y del grado de opacidad, neovascularización y penachos fibrovasculares presentes de la córnea. Seguidamente, se aplicó 1-2 gotas de fluoresceína (Alcon) sobre la córnea para valorar con luz azul (lámpara de hendidura Kowa SL-17, Kowa Company Ltd, Tokio, Japón) el daño realizado. Cada uno de estos signos se categorizaron mediante un sistema de valoración numérico de 0 a 4 (**Tabla 4**) [58]. El grado y pronóstico de las causticaciones oculares se clasificaron según la apariencia inicial de la córnea y el limbo, siguiendo la clasificación de Hughes [55] modificada por Roper-Hall [2,56] (**Tabla 1**, página 50).

Tabla 4. Escala de valoración de los signos patológicos de la córnea.

Signos clínicos	Valores de la escala				
	0	1	2	3	4
Opacidad	Transparente	< ¼	¼ and ½	½ and ¾	> ¾
Neovascularización	Sin vasos	< ¼	¼ and ½	½ and ¾	> ¾
Penachos fibrovasculares	0	1	2	3	≥ 4
Defectos epiteliales	Sin tinción de fluoresceína	< ¼	¼ and ½	½ and ¾	> ¾

Cada ¼ se corresponde con 90° que equivale a un cuadrante de la córnea, la cual está formada por cuatro cuadrantes.

Finalmente, se lavó la fluoresceína con BSS, se aplicó viscoelástico (Medical Mix SLU) y se cerró el ojo mediante una tarsorrafia con sutura de seda 4-0 no reabsorbible. Se dejó la tarsorrafia durante 7 días y se administró analgesia vía subcutánea cada 24 h con 0,3 mg/Kg de meloxicam (Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Alemania) durante 7 días y 0,01-0,05 mg/Kg de buprenorfina durante 4 días y profilaxis antibiótica vía subcutánea cada 24 h con 5-10 mg/Kg de enrofloxacin (Ecuphar® Veterinaria) durante 7 días.

c) Evaluación clínica y tratamiento del traumatismo por causticación alcalina

La selección del tratamiento para cada ojo se realizó bajo un sistema aleatorizado, en el cual el anestésista seleccionó el animal que se iba a operar sin conocimiento previo del tratamiento

que iba a recibir, y posteriormente el cirujano seleccionó uno de los tratamientos sin saber con qué ojo/animal lo iba a recibir. Siete días después del traumatismo corneal, se realizó la anestesia general y local del ojo derecho como se ha descrito previamente. Se abrió la tarsorrafia, se lavó el ojo con BSS y se hizo una valoración clínica (**pre-trasplante**) siguiendo los criterios de la **Tabla 4** (página 88). Tras finalizar la valoración, se limpió la superficie de la córnea mediante debridación con bisturí. A continuación, una membrana de fibrina de PRGF humano (GCM), un implante ocular de MSC de conejo (GMSC) o un implante ocular de OMESC de conejo (GOMESC) se colocó con la superficie de la membrana hacia abajo en contacto con la córnea y la membrana de nitrocelulosa hacia arriba. Posteriormente, se retiró el disco de nitrocelulosa, se recortó el exceso de membrana para adaptarla al tamaño de la córnea y se suturó a la conjuntiva usando una sutura reabsorbible vicryl™ de 6-0 (Ethicon, Nueva Jersey, EE. UU.) (**Figura 16**). Finalmente, se aplicó 0,1 mL de 3 mg/mL de fosfato sódico de betametasona y de acetato de betametasona (Schering-Plough, Nueva Jersey, EE. UU.) subconjuntival, y se hizo una tarsorrafia. Se dejó la tarsorrafia durante 7 días y se administró analgesia vía subcutánea con 0,3 mg/kg de meloxicam (7 días) cada 24 h, 0,01-0,05 mg/kg buprenorfina (3-4 días) cada 24 h y profilaxis antibiótica con 5-10 mg/kg de enrofloxacin cada 24 h. Cinco conejos no recibieron trasplante y se trataron con tratamiento médico exclusivo (GCTM). Los ojos izquierdos no intervenidos sirvieron como control de córnea sana de conejo antes de la lesión.

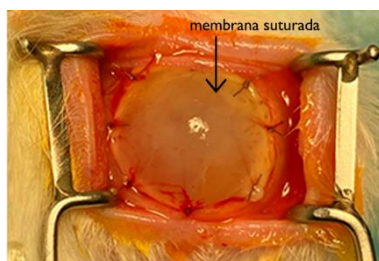


Figura 16. Trasplante de un implante ocular. Se muestra una membrana suturada sobre la superficie corneal.

Siete días después del tratamiento, se realizó la anestesia general y local del ojo derecho como se ha descrito previamente (página 88). Se abrió la tarsorrafia, se retiraron los restos del injerto y de la sutura, y se lavó el ojo con BSS. En los días siguientes a la revisión posquirúrgica se cambió la analgesia y profilaxis antimicrobiana sistémicas vía subcutánea

por analgesia y profilaxis vía oftálmica usando colirios. Se administró 1-2 gotas de fosfato de dexametasona 1 mg/mL (Laboratorios Théa, Barcelona, España) y 1-2 gotas de hidrocloreto de moxifloxacino 5 mg/mL (Alcon) hasta el final del seguimiento clínico.

d) Análisis de los resultados clínicos

Los ojos de los conejos se siguieron clínicamente mediante examen con lámpara de hendidura, tinción con fluoresceína y fotografía una vez a la semana durante los 42 días del periodo de seguimiento. La integridad epitelial, la neovascularización corneal, el pannus fibrovascular y la opacidad corneal fueron evaluados al final del periodo de seguimiento (evaluación **post-trasplante**) y puntuados por el mismo examinador de forma enmascarada siguiendo los criterios descritos previamente (**Tabla 4**).

e) Punto final del estudio

Al final del seguimiento (día 42), los conejos fueron eutanasiados mediante sobredosis anestésica con 3-5 mg/kg de ketamina y 2 mg/kg de hidrocloreto de xilacina (Bayer, Leverkusen, Alemania) por vía intravenosa a través de un catéter en la vena marginal, y posterior infusión lenta de una dosis letal de pentobarbital sódico (133 mg/kg) (Vetoquinol, Madrid, España). Se enuclearon los ojos, se diseccionaron las córneas, se fijaron en paraformaldehído al 4 %.

7.2.6. Histología

a) Tinción de hematoxilina-eosina

Se prepararon las secciones histológicas de las córneas (página 82) y se realizaron las tinciones de H&E (página 82) como se ha descrito.

b) Técnica de Schiff

También denominada tinción del ácido periódico-Schiff (PAS). Las secciones de las muestras desparafinadas se oxidaron incubando 5 min con ácido periódico al 0,5 % (Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente, y posteriormente, se tiñeron las células caliciformes incubando 15 min con el reactivo de Schiff (Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente y los núcleos incubando 1 min con hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente. Se realizaron lavados con agua destilada entre las incubaciones. Las muestras se aclararon y se deshidrataron 1 min en alcoholes a concentraciones decrecientes (etanol absoluto, 90 %, 80

% y 70 %) y 1 min en xileno dos veces. Finalmente, se montaron con medio de montaje para microscopía Entellan™ y un cubreobjetos de vidrio y se observaron bajo un microscopio de campo claro Leica.

7.2.7. Inmunohistoquímica

Las secciones de las muestras desparafinadas se desenmascararon sumergidas en tampón de citrato de sodio calentando a 87 °C durante 10 min mediante un microondas a 140 W de potencia. El tampón de citrato de sodio se preparó con 10 mM de citrato de sodio, 0,05 % de Tween-20 y el pH ajustado a 6,0 con HCl. Las muestras se lavaron 5 min con PBS tres veces y se trataron con Tritón™ X-100 diluido en PBS al 0,3 % durante 10 min para permeabilizar las células. Posteriormente, las muestras se lavaron 5 min con PBS tres veces y se marcaron incubándolas durante 1 h a 37 °C con un anticuerpo primario diluido en PBS con 10 % de suero de cabra para bloquear las reacciones inespecíficas. Los anticuerpos primarios (monoclonales y de origen murino) y sus diluciones fueron los siguientes: anti-CK3 (1:50, monoclonal, ratón, clon AE5, Abcam), anti-CK13 (1:500, monoclonal, ratón, clon AE8, Abcam), anti-MUC5AC (1:500, monoclonal, ratón, clon 45M1, Abcam) y anti-CK10 (1:500, monoclonal, ratón, clon EP1607IHCY, Abcam). Posteriormente, se retiró el anticuerpo primario, se lavó tres veces con PBS durante 5 min y se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario policlonal anti-IgG de ratón diluido 1:500 en PBS durante 1 h a 37 °C. Finalmente, se marcaron los núcleos con DAPI y se montaron las muestras usando medio de montaje para fluorescencia y un cubreobjetos. Se observó el marcaje bajo un microscopio de fluorescencia de Leica Biosystems.

7.2.8. Análisis estadístico

Se estudiaron las puntuaciones de las valoraciones clínicas post-causticación, pre-trasplante y post-trasplante. La distribución normal de los datos se evaluó mediante el método de Shapiro-Wilk. Para el estudio comparativo de las medias se utilizaron las prueba de comparación múltiple Kruskal-Wallis y la prueba U de Mann-Whitney para dos muestras independientes. El nivel de significancia se fijó a p -valor < 0,05 para todos los casos. Todos los test estadísticos se realizaron en el programa IBM SPSS Statistics versión 22 (IBM Corp, Nueva York, EE. UU.). Las M, sus SD y las significancias estadísticas con respecto al GCTM (†) y al GCM (‡) cuando las hubo, se representaron gráficamente usando Excel

8. RESULTADOS

8.1. MEDICAMENTOS DE TERAPIAS AVANZADAS HUMANOS LIBRES DE FACTORES XENOGÉNICOS

8.1.1. Plasma rico en factores de crecimiento humano

Con un kit de Endoret®(PRGF®) se obtuvieron aproximadamente 20 mL de F1 y 16 mL de F2 a partir de una extracción individual de sangre humana (de 72 mL) cuando el hematocrito fue entorno al 45 % (**Figura 17**). Posteriormente, de la F1 se obtuvieron en torno a 15 mL de PRGF con los que se prepararon 150 mL de medio de cultivo para el cultivo de las MSC o las OMESC.

Posteriormente, de la F2 se prepararon hasta 3 membranas de fibrina de PRGF de 5 mL de plasma y 500 μm cada una (**Figura 18**). Con un kit de Endoret®(PRGF®) fue suficiente para desarrollar desde el cultivo hasta la preparación del implante ocular de OMESC, mientras que para el de MSC fueron necesarios hasta 3 kits.

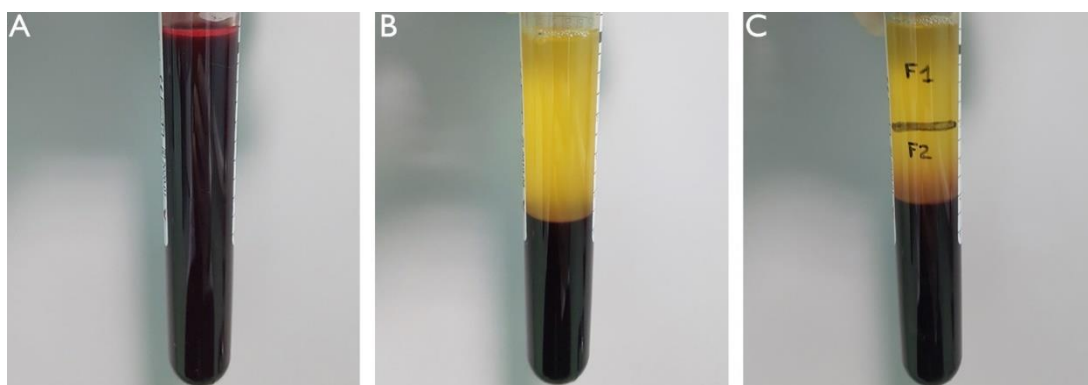


Figura 17. Fracciones del plasma sanguíneo separadas mediante centrifugación. (A) Sangre completa citrada en un tubo de 9 mL obtenida por venopunción. (B) Sangre centrifugada y dividida en su fase roja inferior, fase leucocitaria intermedia y columna de plasma superior. (C) Identificación de la F1 y la F2 en la columna de plasma sanguíneo. **F1**: fracción superior de la columna de plasma sanguíneo humano. **F2**: fracción inferior de la columna de plasma sanguíneo humano.

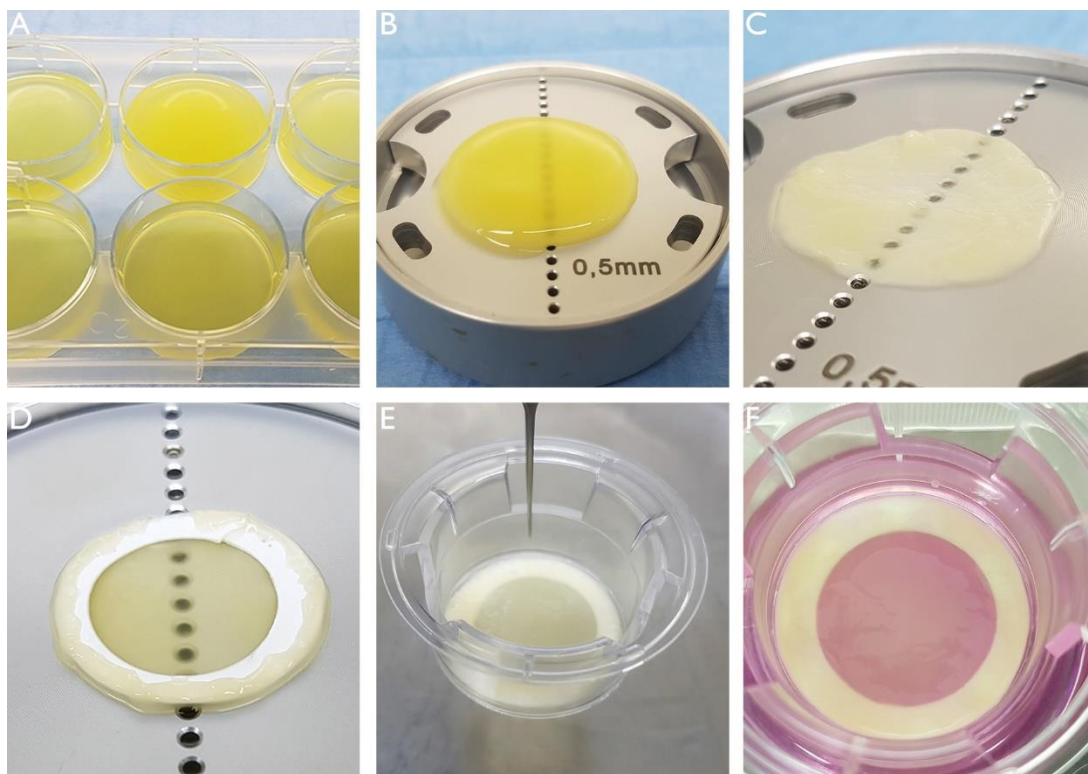


Figura 18. Membrana de fibrina de PRGF de 500 μm preparada a partir de un gel de fibrina de PRGF. (A) Geles de fibrina de PRGF en pocillos de 9,5 cm^2 preparados con F2 y cloruro de calcio. (B) Gel de fibrina de PRGF sobre el conformador antes de preparar la membrana de fibrina de PRGF de 500 μm de grosor. (C) Membrana de fibrina de PRGF de 500 μm de grosor. (D) Disco de nitrocelulosa sobre la membrana de fibrina de PRGF para mantenerla extendida. (E) *Insert* de 4,5 cm^2 con membrana de fibrina de PRGF. (F) Membrana de fibrina de PRGF sobre un *insert* dentro de un pocillo de 9,5 cm^2 con medio de cultivo por debajo. **F2**: fracción inferior de la columna de plasma sanguíneo humano. **PRGF**: plasma rico en factores de crecimiento.

8.1.2. Cultivo, caracterización e implante ocular de MSC humanas

a) Cultivo primario de MSC

Las MSC comenzaron a crecer desde de los explantes de tejido adiposo subcutáneo a partir del quinto día empleando el medio de cultivo suplementado con PRGF. Los cultivos en pase 0 alcanzaron la confluencia aproximadamente a los 13 días de cultivo, obteniendo por cada 1-2 mm^2 de tejido adiposo entre $7-9 \times 10^4$ células en 3,8 cm^2 de superficie de plástico de cultivo (un pocillo de una placa de 12 pocillos). Posteriormente, cada subcultivo realizado entre los pases 1 y 4 alcanzó la confluencia a los 5-7 días de cultivo desde la siembra, obteniendo alrededor de $2-3 \times 10^6$ células en un frasco de 75 cm^2 . En general, se observaron

dos poblaciones celulares principales. En los cultivos en pase 0, se observaron células con forma triangular o en forma de estrella y células alargadas, con forma de huso y tipo fibroblástica (**Figura 19 A**). Algunas células presentaron morfología redondeada y con vacuolas aparentemente lipídicas en su citoplasma (**Figura 19 B**), que es una característica común de célula diferenciada tipo adipocito. Mediante el subcultivo de las MSC expandidas de la grasa subcutánea, se obtuvieron cultivos homogéneos de MSC de tipo fibroblásticas en pase 4 (**Figura 19 C**).

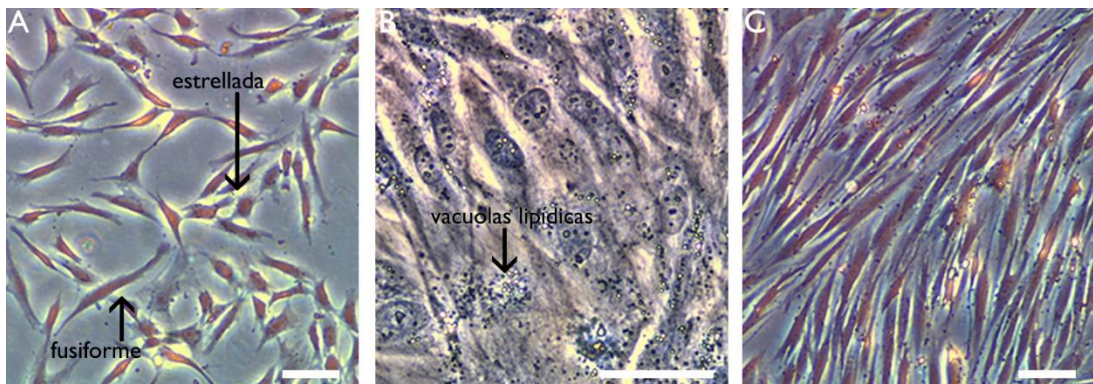


Figura 19. Cultivos de células del tejido adiposo subcutáneo. (A, B) Cultivos primarios en pase 0 con células de distintas morfologías: estrellada, fusiforme y con vacuolas lipídicas citoplasmáticas. (C) Cultivo primario en pase 4 confluyente con células fusiformes tipo fibroblásticas. Las barras de escala corresponden a 100 μm .

b) Caracterización de MSC

Las células expandidas se identificaron como MSC de acuerdo con los criterios de mínimo cumplimiento descritos por la ISCT [83]:

1. Se observaron células adheridas a la superficie de cultivo y con una alta capacidad proliferativa evidenciada por su rápida expansión durante los subcultivos realizados.
2. Se observó la plasticidad celular esperada empleando medios de cultivos específicos:
 - Las células presentaron vacuolas lipídicas intracelulares teñidas en rojo por el colorante *Oil Red O* (**Figura 20 A**) que confirmaron la adipogénesis.
 - Las células mostraron adherencia al plástico de cultivo y depósitos extracelulares ricos en calcio que se tiñeron de rojo-anaranjado por el *Alizarin Red S* (**Figura 20 B**) que confirmaron la osteogénesis.

- La presencia de células con morfología tipo condrocito rodeados por una matriz extracelular rica en glucosaminoglicanos y mucopolisacáridos que se tiñó de azul con *Alcian Blue* (**Figura 20 C**) confirmaron la condrogénesis.

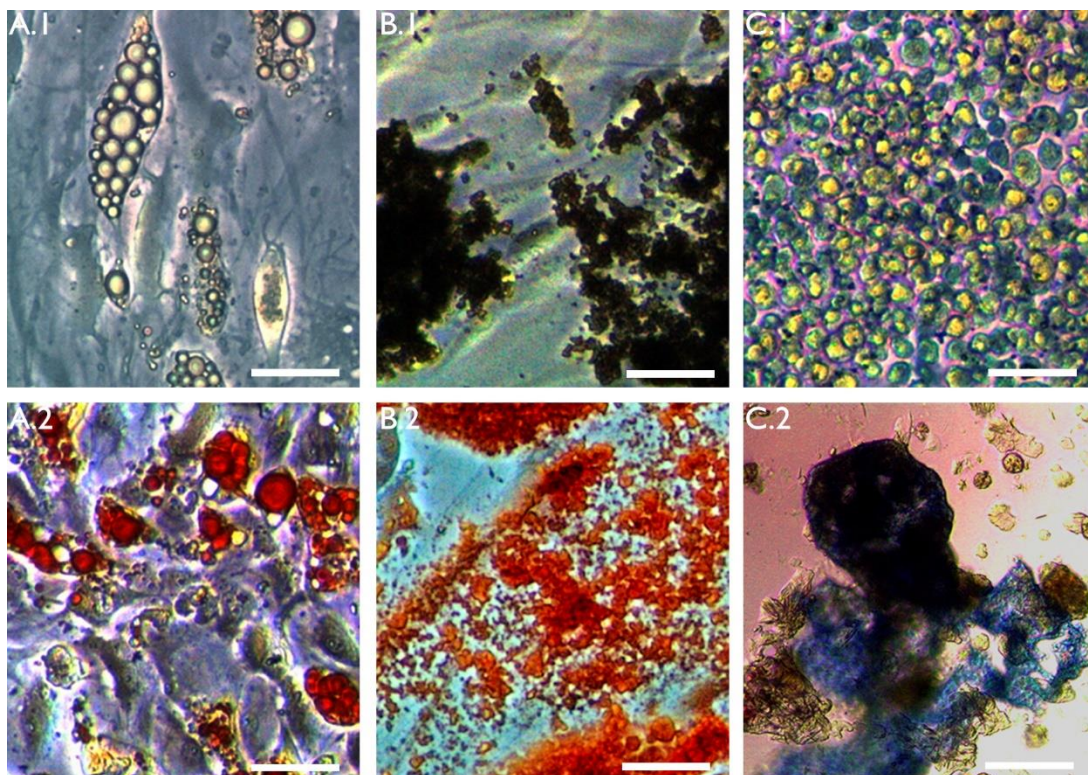


Figura 20. Caracterización de las MSC mediante diferenciación multilineaje. (A) Adipogénesis: células con vacuolas en su citoplasma (A.1) confirmadas por su tinción en rojo por el *Oil Red O* (A.2). (B) Osteogénesis: depósitos extracelulares sobre las células adheridas al plástico inferiormente (B.1) confirmados por su tinción en rojo-anaranjado por el *Alizarin Red S* (B.2). (C) Condrogénesis: células con morfología tipo condral (C.1) confirmada por su tinción en azul con el *Alcian Blue* (C.2). En la primera fila se muestran los cultivos *in vitro* sin teñir, y en la segunda fila se muestran los cultivos fijados y teñidos con su correspondiente colorante. Las barras de escala corresponden a 50 μm . MSC: células madre mesenquimales.

3. La citometría de flujo laminar determinó lo siguiente:

- Los cultivos analizados estaban formados por una población altamente homogénea donde el $94,08 \pm 3,64 \%$ ($M \pm SD$) mostraron el mismo tamaño celular y patrón de antígenos de superficie (**Figura 21 A**).
- Tras la criopreservación, la proporción de células muertas fue mínima, con una proporción media de células muertas del $2,74 \pm 1,27 \%$ ($M \pm SD$, **Figura 21 B**).

- Las células mostraron ausencia de expresión de los antígenos típicos de las células de origen hematopoyético, CD45, CD34, CD14, CD19 y HLA-DR, ya que menos del 2 % de las células fueron positivas para estos marcadores (**Figura 21 C**).
- Las células mostraron marcaje positivo en más del 95 % de la población celular para CD105 ($96,19 \pm 3,17$ %), CD90 ($99,66 \pm 0,31$ %) y CD73 ($99,77 \pm 0,28$ %) que son característicos del linaje de las MSC ($M \pm SD$, **Figura 21 D-F**), así como otros marcadores menos relevantes ya que no son exclusivos del linaje, CD166 ($99,82 \pm 0,17$ %), CD44 ($99,37 \pm 1,06$ %) y CD29 ($99,90 \pm 0,15$ %) ($M \pm SD$, **Figura 21 G-I**).

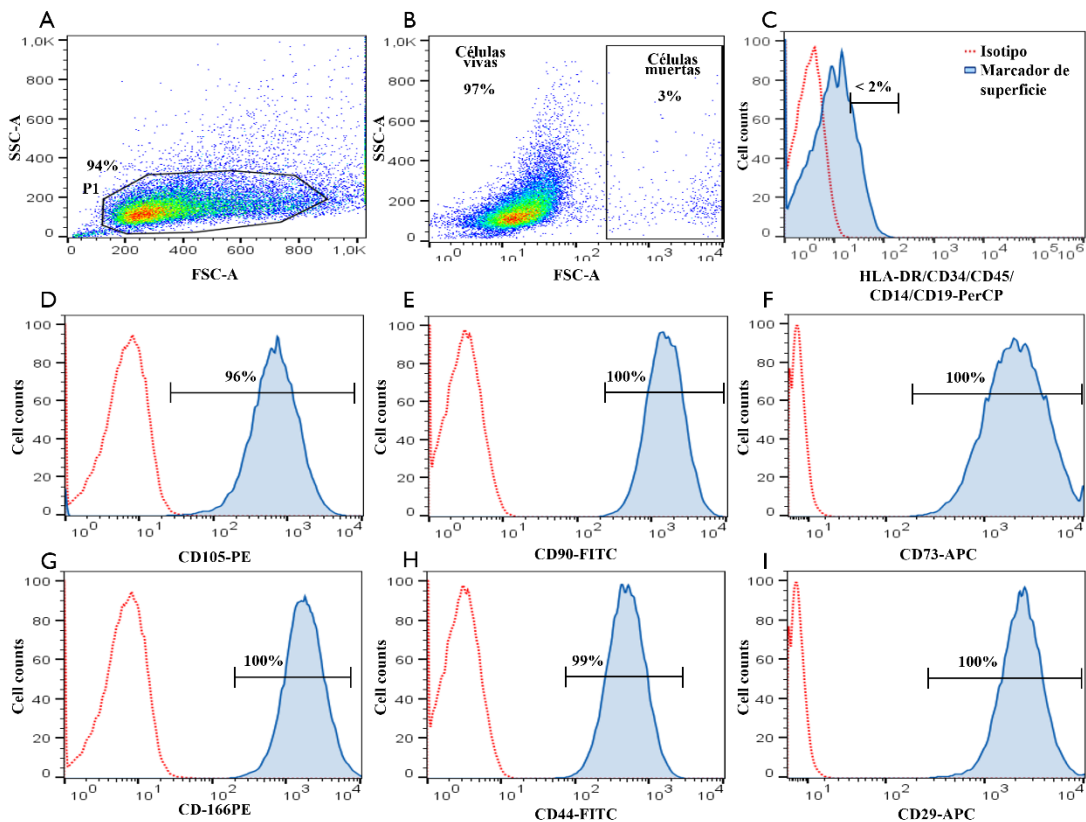


Figura 21. Caracterización fenotípica de las MSC derivadas de tejido adiposo estudiadas mediante citometría de flujo. (A) La población analizada “P1” representa aproximadamente el 94 % de las células. (B) Viabilidad celular: entorno al 97 % de las células son viables. (C-I) Determinación de los marcadores de superficie celular CD105, CD90, CD73, CD166, CD44, CD29, CD45, CD34, CD14, CD19 y HLA-DR. Se muestran los resultados de un caso representativo. **APC**: alofocianina. **CD**: grupo o antígeno de diferenciación. **FITC**: fluoresceína-5-isotiocianato. **FSC**: detector de dispersion frontal. **HLA-DR**: antígeno leucocitario humano isotipo DR. **MSC**: células madre mesenquimales. **PE**: ficoeritrina. **PerCP**: complejo peridina-clorofila-proteína. **P1**: población 1. **SSC**: detector de dispersión lateral.

c) Implante ocular de MSC

Una vez caracterizadas las células expandidas del tejido adiposo como MSC, se preparó el implante ocular sembrando las células sobre una membrana de fibrina de PRGF. Las MSC se adherieron y crecieron sobre la membrana de fibrina de PRGF en el medio de cultivo suplementado con PRGF (**Figura 22 A**), sin fibrinolisis y con cierta retracción de ésta. Mediante IF se observaron las MSC confluentes a los 2 días de cultivo sobre la membrana de fibrina de PRGF, con marcaje positivo para la Vim y conservando la morfología fibroblástica previa (**Figura 22 B**).

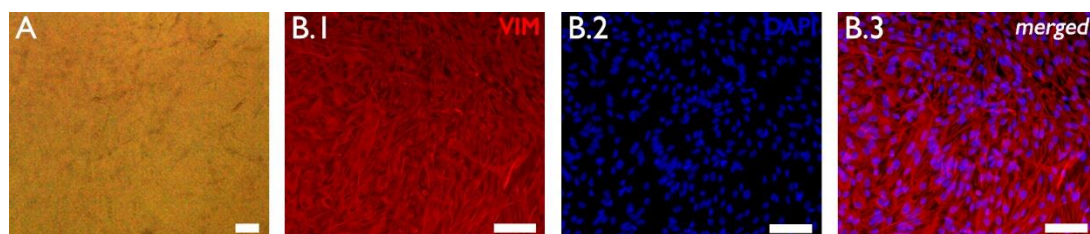


Figura 22. MSC cultivadas sobre una membrana de fibrina de PRGF. Imagen de microscopía de contraste de fases (A) y microscopía de fluorescencia (B) que muestran células con morfología tipo fibroblásticas sobre la membrana, con los citoplasma marcados por anti-Vim (B.1, rojo) y con los núcleos teñidos con DAPI (B.2, azul). Las barras de escala corresponden a 100 µm. **DAPI:** 4',6-diamino-2-fenilindol. **Merged:** composición de las imágenes B.1 y B.2. **MSC:** células madre mesenquimales. **PRGF:** plasma rico en factores de crecimiento. **Vim:** vimentina.

8.1.3. Cultivo, caracterización e implante ocular de OMESC humanas

a) Cultivo primario de OMESC

Las OMESC se expandieron a partir de los explantes de mucosa oral queratinizada y no queratinizada empleando el medio de cultivo suplementado con PRGF. Durante el cultivo, se distinguieron dos fases de crecimiento: una fase lenta durante los 5 primeros días de cultivo en la cual se vieron células con morfología epitelial creciendo alrededor del explante (**Figura 23 A**), seguida de una fase rápida (**Figura 23 B**) en la cual las células alcanzaron rápidamente la confluencia del 90-95 % en los siguientes 5-8 días aproximadamente. Se obtuvieron por cada explante de mucosa oral entre $2-3 \times 10^5$ células en $3,8 \text{ cm}^2$ de superficie de cultivo (un pocillo de una placa de 12 pocillos). Morfológicamente, los cultivos confluentes presentaron células de morfología tipo epitelial, es decir, poliédricas, aplanadas y pequeñas que crecían estrechamente unidas unas a otros y empaquetadas con forma de adoquín, con una proporción núcleo/citoplasma alta (**Figura 23 C**).

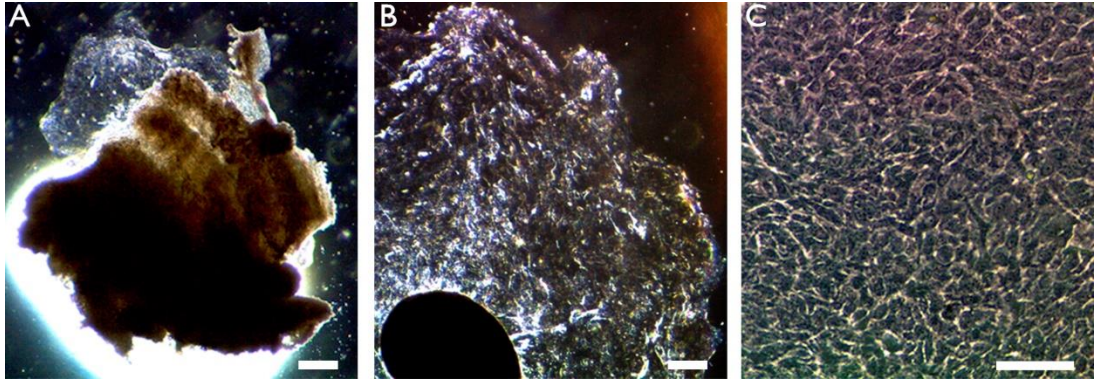


Figura 23. Cultivo de explante de mucosa oral. Se muestra un cultivo a los 5 días (A), 10 días (B), y 13 días con células de morfología tipo epitelial (C). Las barras de escala corresponden a 50 μm .

b) Caracterización de OMESC

Previamente a hacer el implante ocular, las OMESC presentaron marcaje positivo para una citoqueratina citoplasmática basal, la CK5; y para el marcador de proliferación nuclear P63 (**Figura 24**).

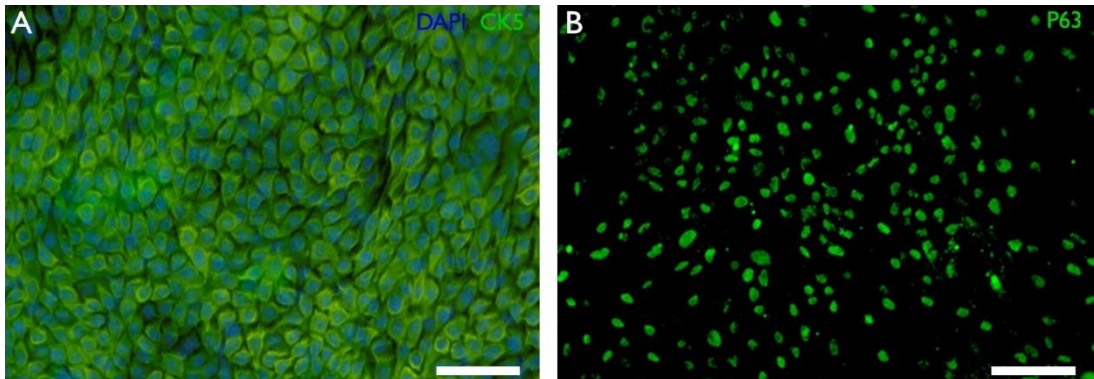


Figura 24. Caracterización de las OMESC mediante IF. (A) Las células epiteliales cultivadas de la mucosa oral con marcaje positivo de la CK5 (verde) en el citoplasma y los núcleos marcados con DAPI (azul). (B) Marcaje positivo de P63 (verde) en el núcleo. Las barras de escala corresponden a 200 μm . **CK**: citoqueratina. **DAPI**: 4',6-diamino-2-fenilindol. **IF**: inmunofluorescencia. **OMESC**: células madre epiteliales de la mucosa oral. **P63**: proteína tumoral p63.

c) Implante ocular de OMESC

Una vez confirmado el fenotipo de célula madre epitelial, los pocillos de cultivo restantes fueron empleados para preparar el implante ocular. Las OMESC se adhirieron y crecieron sobre la membrana de fibrina de PRGF en el medio de cultivo suplementado con PRGF sin degradar la membrana (**Figura 25 A**) y sin retracción de ésta. Mediante la IF se observaron

las OMESC confluentes a los 3 días y manteniendo su crecimiento tipo epitelial con las citoqueratinas citoplasmáticas marcadas por el anticuerpo anti-CKhmw (**Figura 25 B**).

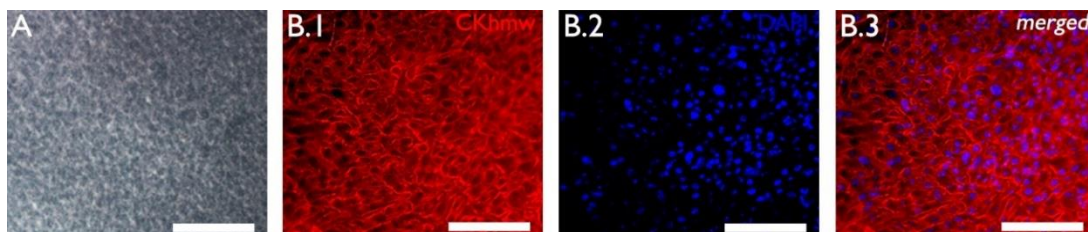


Figura 25. OMESC cultivadas sobre una membrana de fibrina de PRGF. Imagen de microscopía de contraste de fases (A) y microscopía de fluorescencia (B) que muestran células con morfología tipo epitelial sobre la membrana, con los citoplasma marcados por anti-CKhmw (B.1, rojo) y con los núcleos teñidos con DAPI (B.2, azul). Las barras de escala corresponden a 100 μ m. **DAPI:** 4',6-diamino-2-fenilindol. **CKhmw:** citoqueratinas de alto peso molecular. **Merged:** composición de las imágenes B.1 y B.2. **OMESC:** células madre epiteliales de la mucosa oral. **PRGF:** plasma rico en factores de crecimiento.

8.1.4. Estudio *in vivo* de los MTA humanos

Ambos implantes oculares mostraron una buena respuesta y resistencia al manejo con el material quirúrgico, y, además, no se registró ningún caso de fracaso del injerto ni mortalidad en los ratones durante el periodo de seguimiento. Los ratones atímicos trasplantados no presentaron signos de inflamación (edema subcutáneo, enrojecimiento, rechazo del injerto o necrosis) ni infección (pus e hipertermia) posoperatorios en ningún caso. Además, las incisiones de la zona trasplantada siguieron un proceso de cicatrización y reparación normal (**Figura 26**).

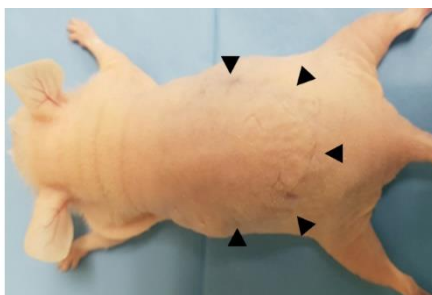


Figura 26. Trasplante subcutáneo de los implantes oculares humanos en ratones atímicos. Se observó una cicatriz posoperatoria de 21 días (\blacktriangleleft). Se muestra un caso representativo de las cirugías realizadas.

En el estudio de IHQ de las muestras tomadas 21 días después del trasplante, se identificaron células humanas dentro de las dermis murinas. Se observaron células adheridas unas a otras

con morfología fusiforme, marcadas con anti-Vim humana y núcleos normales teñidos por la hematoxilina en el caso los ratones que recibieron el implante ocular de MSC (**Figura 27 A**); y con morfología epitelial, con las citoqueratinas plasmáticas marcadas por el anti-CKhmw humanas y núcleos normales teñidos por DAPI en el caso de los ratones que recibieron el implante ocular de OMESC (**Figura 27 B**). Además, no se observaron infiltrados de células inmunes, alteraciones aberrantes del tejido circundante o signos anatomopatológicos de malignidad (tales como la hipervascularización, migración celular e hiperplasias irregulares) relacionados con los implantes oculares de MSC (**Figura 28 A**) y de OMESC (**Figura 28 B**).

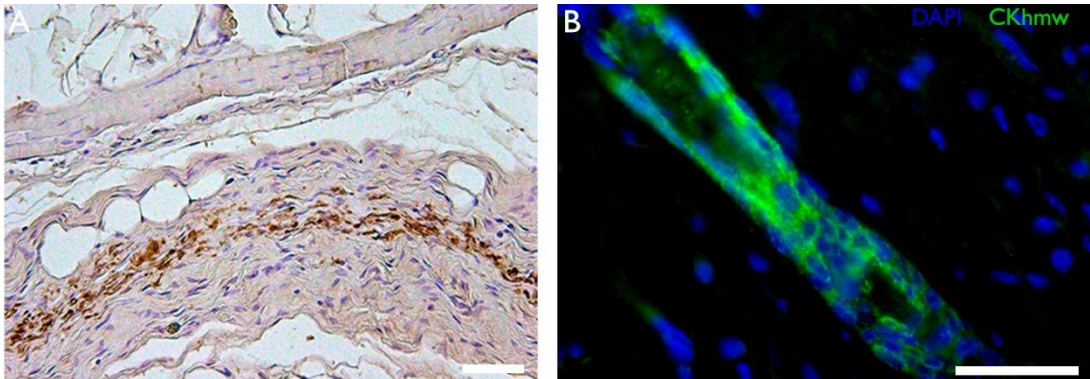


Figura 27. Identificación de las células trasplantadas en la dermis murina 21 días después del trasplante. (A) IHQ del implante ocular de MSC revelada con inmuno-peroxidasa: células fibroblásticas humanas marcadas por el anticuerpo anti-Vim humana en marrón. (B) IHQ del implante ocular de OMESC revelada por fluorescencia: células marcadas por el anticuerpo anti-CKhmw en verde y DAPI en azul. Las barras de escala corresponden a 100 µm respectivamente. **CKhmw**: citoqueratinas de alto peso molecular. **DAPI**: 4',6-diamino-2-fenilindol. **IHQ**: inmunohistoquímica. **MSC**: células madre mesenquimales. **OMESC**: células madre epiteliales de la mucosa oral.

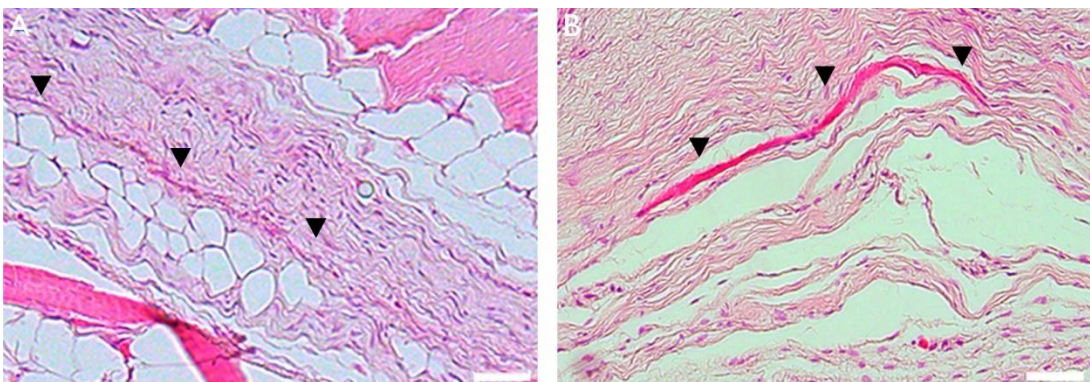


Figura 28. H&E de las dermis murinas trasplantadas a los 21 días. (A) Implante ocular de MSC. (B) Implante ocular de OMESC. Las barras de escala corresponden a 50 µm. ◄: señalan los injertos.

8.2. ENSAYO PRECLÍNICO DE LOS MTA

8.2.1. Cultivo, caracterización e implante ocular de MSC de conejo

a) Cultivo primario y caracterización de MSC

Las células cultivadas a partir de la grasa subcutánea de conejo empleando el medio de cultivo suplementado con PRGF de conejo no cumplieron los Criterios Mínimos exigidos por la ISCT [83]. Las células expandidas en pase 4 presentaron adherencia al plástico de cultivo y morfología tipo fibroblástica (**Figura 29 A**), pero no presentaron capacidad de diferenciación multilínea (**Figura 29 B-D**).

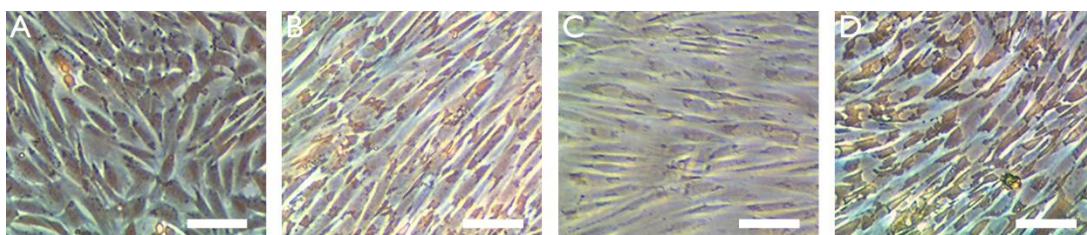


Figura 29. Cultivo de explantes de grasa subcutánea de conejo con PRGF de conejo. (A) Células en pase 4 cultivadas con medio de cultivo suplementado con 10 % PRGF de conejo. (B) Células cultivadas con medio adipogénico con tinción *Oil Red O* negativa y ausencia de vacuolas lipídicas. (C) Células incubadas con medio osteogénico con ausencia de tinción *Alizarin Red S* y depósitos de calcio extracelular. (D) Células incubadas con medio condrogénico con ausencia de tinción *Alcian Blue* y matriz tipo condral. Las barras de escala corresponden a 100 µm. **PRGF**: plasma rico en factores de crecimiento.

No obstante, las células cultivadas de la grasa subcutánea de conejo con medio de cultivo suplementado con SBF al 20 %, sí cumplieron los Criterios Mínimos exigidos por la ISCT [83]. Estos cultivos alcanzaron el pase 4 presentando células adheridas al plástico de cultivo con morfología tipo fibroblástica (**Figura 30 A**), alta capacidad proliferativa porque alcanzaron la confluencia en pocos días (4-5 días) y capaces de diferenciarse en adipocitos, osteocitos y condrocitos utilizando medios de cultivo de inducción. Los adipocitos presentaron vacuolas lipídicas con tinción positiva en rojo con *Oil Red O* (**Figura 30 B**), los osteocitos presentaron depósitos extracelulares de calcio con tinción positiva en rojo-anaranjado con *Alizarin Red S* (**Figura 30 C**) y los condrocitos se presentaron embebidos en una matriz tipo condral rica en glucosaminoglicanos y mucopolisacáridos con tinción positiva en azul con *Alcian Blue* (**Figura 30 D**).

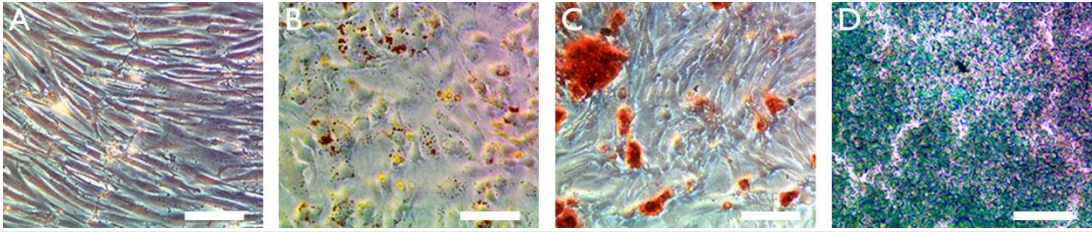


Figura 30. Cultivo de MSC a partir de grasa subcutánea de conejo con SBF. (A) Células en fase 4 cultivadas con medio de cultivo suplementado con 20 % de SBF. (B) Diferenciación adipogénica: células diferenciadas a adipocitos con vacuolas adiposas teñida en rojo con *Oil Red O*. (C) Diferenciación osteogénica: células diferenciadas a osteocitos con depósitos extracelulares de calcio teñidos en rojo-anaranjado con *Alizarin Red S*. (D) Diferenciación condrogénica: células tipo condrocitos con la matriz teñida por el *Alcian Blue*. Las barras de escala corresponden a 100 μm . **MSC:** células madre mesenquimales. **SBF:** suero bovino fetal.

b) Implante ocular de MSC

Las MSC se adhirieron a la superficie de la membrana de fibrina de conejo y crecieron sobre la misma empleando el medio de cultivo suplementado con SBF. Las MSC mantuvieron su morfología fibroblástica y a los 2 días se mostraron confluentes como se pudo ver mediante fluorescencia (**Figura 31**). No se observó fibrinolisis de la membrana, pero sí retracción de ésta.

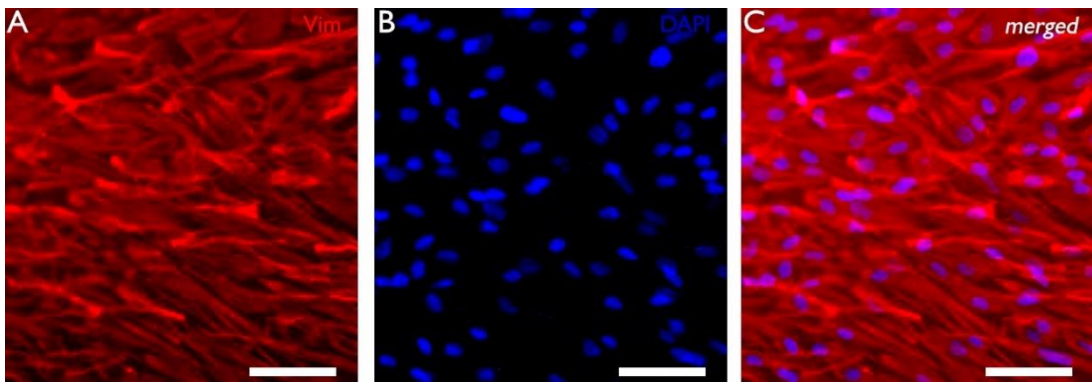


Figura 31. MSC de conejo cultivadas sobre una membrana de fibrina de conejo. Las células muestran morfología fibroblástica, con expresión de Vim (A, rojo) citoplasmática. Los núcleos se marcaron con DAPI (B, azul). La barra de escala corresponde a 200 μm . **DAPI:** 4',6-diamino-2-fenilindol. **Merged:** composición de las imágenes A y B. **MSC:** células madre mesenquimales **Vim:** vimentina.

8.2.2. Cultivo, caracterización e implante ocular de OMESC de conejo

a) Cultivo primario y caracterización de OMESC

Se obtuvieron OMESC a partir de la mucosa oral de conejo empleando el medio de cultivo suplementado con PRGF de conejo. Las células expandidas a partir de la mucosa oral de conejo presentaron morfología epitelial como las OMESC humanas (**Figura 32 A**) y expresó CK5 (**Figura 32 B**) y P63 (**Figura 32 C**).

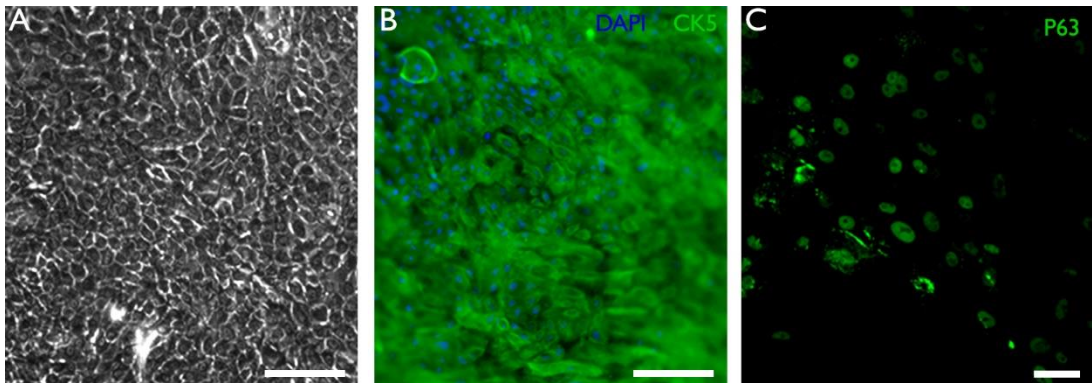


Figura 32. Cultivo primario y caracterización de OMESC de conejo. (A) Cultivo de OMESC confluyente en pase 0 sobre plástico de cultivo. (B) Células con expresión positiva de CK5 (verde) con los núcleos marcados con DAPI (azul) (C) Expresión positiva de P63 (verde). Las barras de escala corresponden a 100 μm . **CK**: citoqueratina. **DAPI**: 4',6-diamino-2-fenilindol. **OMESC**: células madre epiteliales de mucosa oral. **P63**: proteína tumoral p63.

b) Implante ocular de OMESC

Las OMESC de conejo se adhirieron a la membrana de fibrina de conejo y crecieron sobre ésta, alcanzando la confluencia a los 3 días de cultivo. Según el estudio de IF (**Figura 33**), las OMESC mantuvieron su morfología epitelial y expresión de CK5 sobre la membrana. No se observó degradación ni retracción de la membrana de fibrina de conejo.

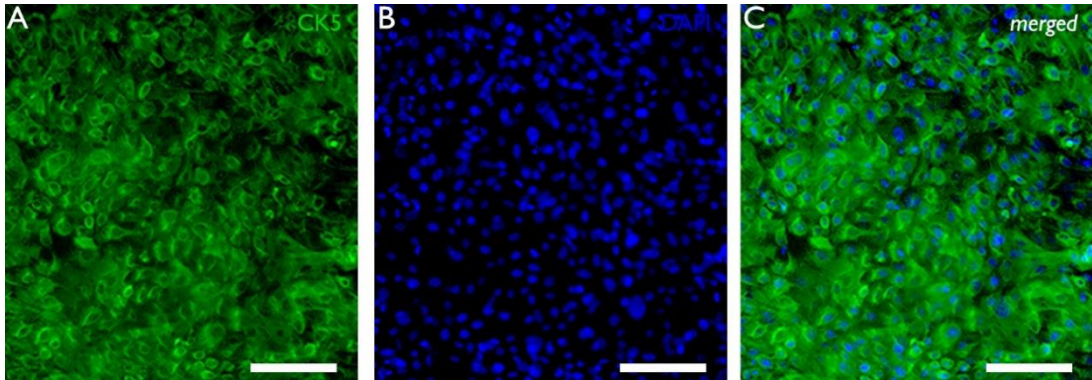


Figura 33. Implante ocular de OMESC de conejo. Muestra células de morfología epitelial y expresión de CK5 (verde) confluentes y con núcleos teñidos con DAPI (azul). La barra de escala corresponde a 100 μm . **CK:** citoqueratina. **DAPI:** 4',6-diamino-2-fenilindol.

8.2.3. Traumatismos ocular por causticación alcalina

No se registraron bajas experimentales y no se apreció alteración relevante del bienestar y comportamiento animal tras la causticación alcalina.

La córnea del conejo antes de la lesión se observó transparente, sin presencia de úlceras o leucomas y ausencia de vasos, penachos fibrovasculares (**Figura 34 A**) y defectos epiteliales. Su tinción de fluoresceína fue negativa, viéndose la córnea teñida de azul (**Figura 34 B**).

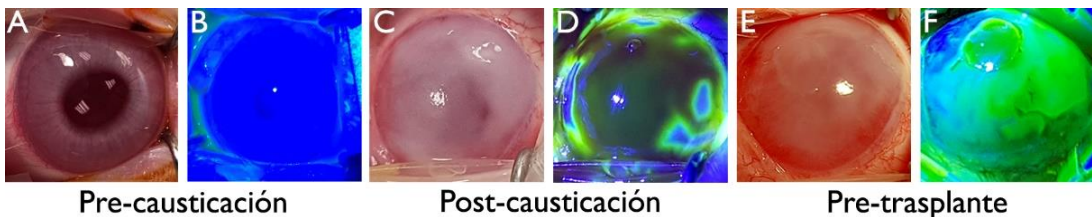


Figura 34. Aspecto clínico de la córnea y su prueba de fluoresceína antes y después de la lesión. (A, B) Pre-causticación: antes de aplicar el cáustico, la córnea se observó trasparente con ausencia de tinción de fluoresceína. (C, D) Post-causticación: inmediatamente después del aplicar el cáustico, se observó opacificación corneal y tinción en verde con fluoresceína. (E, F) Pre-trasplante: previamente al trasplante, se observaron las cuatro variables clínicas estudiadas en la **Tabla 4** y tinción en verde con fluoresceína. Se muestra un caso representativo en cada momento.

Inmediatamente tras la lesión con NaOH (post-causticación), se produjo una alteración de la fisiología sana de la córnea, se observó un epitelio irregular, opacificación corneal grave de 360° (3.94 ± 0.24), hiperemia conjuntival (**Figura 34 C**) y tinción corneal extensa en verde por la fluoresceína (3.67 ± 0.59) que confirmó la ausencia de células epiteliales de la córnea

(Figura 34 D). No se observaron neovasos ni penachos fibrovasculares. Las lesiones se valoraron en grado IV (mal pronóstico) en la clasificación de Hughes modificada por Roper-Hall.

Después de 7 días de tratamiento médico y tarsorrafia (pre-trasplante), se observaron epitelios irregulares y friables, la transparencia corneal y los defectos epiteliales mejoraron ligeramente dejando una opacidad moderada-severa (3.06 ± 0.80) en toda la córnea (Figura 34 E) con defectos epiteliales evidenciables teñidos en verde por la fluoresceína (2.39 ± 1.29) (Figura 34 F). La neovascularización (2.89 ± 0.76) y los penachos fibrovasculares (1.28 ± 1.07) empeoraron dejando vasos sanguíneos finos de hasta 4 mm que entraban en la córnea afectando de 180° a 360° , una hiperemia conjuntival alrededor del limbo y hasta 2 penachos fibrovasculares en algunas córneas. Las lesiones se valoraron en grado III-IV (pronóstico reservado-malo) en la clasificación de Hughes modificada por Roper-Hall.

La evaluación clínica de las cuatro variables estudiadas (opacificación, neovascularización, penachos fibrovasculares y defectos epiteliales) permitió comparar las lesiones de todos los conejos siguiendo la Tabla 4. Antes de aplicar los tratamientos (post-causticación y pre-trasplante), todos los conejos mostraron valoraciones muy similares para las cuatro variables clínicas estudiadas, y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p -valores $> 0,05$) entre los conejos que finalmente pertenecieron a cada grupo (GCTM: conejos del número uno al cinco, GCM: conejos del número seis al diez, GMSC: conejos del número once al catorce, y GOMESC: conejos del número quince al dieciocho) (Tabla 5). Todos los valores se expresan como $M \pm SD$.

Tabla 5. Evaluación clínica de los conejos antes del tratamiento. P0-P4: puntuaciones definidas en la **Tabla 4**.

G	Co	Opacidad					Neovascularización					Penachos fibrovasculares					Defectos epiteliales				
		P0	P1	P2	P3	P4	P0	P1	P2	P3	P4	P0	P1	P2	P3	P4	P0	P1	P2	P3	P4
1	1					❖/●	❖				●	❖/●								●	❖
	2					❖/●	❖				●	❖		●					●		❖
	3			●		❖	❖				●	❖/●							❖/●		❖
	4		●			❖	❖				●	❖/●								❖	
	5					❖	❖				●	❖			●						❖/●
2	6					❖/●	❖				●	❖/●							❖/●		❖
	7					❖	❖			●	❖			●					●		❖
	8					❖	❖			●	❖		●						●		❖
	9			●		❖	❖				●	❖			●				●		❖
	10					❖	❖				●	❖			●						❖/●
3	11					❖	❖			●	❖			●						●	❖
	12					❖	❖			●	❖			●						●	❖
	13					❖	❖			●	❖					●				●	❖
	14					❖	❖			●	❖/●									●	❖
4	15					❖	❖			●	❖		●						●		❖
	16					❖	❖			●	❖					●				●	❖
	17					❖/●	❖			●	❖/●								●		❖
	18					❖	❖			●	❖			●							❖/●
p ¹				0,312						1,00										0,522	
p ²				0,924						0,185											0,543

No hubo diferencias estadísticamente significativas (p-valores > 0,05). ❖: post-causticación. ●: pre-trasplante. Co: conejo. G1: GCTM. G2: GCM. G3: GMSC. G4: GOMESC. GCM: grupo control tratado con membrana de fibrina de PRGF. GCTM: grupo control tratado con tratamiento médico exclusivo. GMSC: grupo tratado con MSC. GOMESC: grupo tratado con OMESC. P0-P4: puntuación de 0 a 4. p1: p-valor para las puntuaciones en ❖. p2: p-valor para las puntuaciones en ●.

8.2.4. Análisis clínico

Todos los conejos de los grupos controles superaron los procedimientos quirúrgicos correspondientes sin registrar bajas experimentales por mortalidad o alteración del bienestar del animal al final del periodo de seguimiento (42 días) (post-trasplante). Todos los ojos se presentaron tranquilos y sin signos de irritación o infección en los anexos del ojo, donde se incluye la conjuntiva bulbar, tarsal y los párpados.

Los conejos tratados con tratamiento médico exclusivo (GCTM, del conejo [Co] 1 al Co5) y con membrana de fibrina de PRGF humano (GCM, del Co6 al Co10) mantuvieron o empeoraron el diagnóstico clínico pre-trasplante sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (p-valores > 0,05) para las variables clínicas estudiadas de la **Tabla 4**. Los resultados clínicos post-trasplante más relevantes observados fueron: pérdida total o parcial de la transparencia corneal, epitelios con erosiones punteadas epiteliales (PEE), leucomas que afectaron ≥90° incluyendo el eje visual en muchos casos (**Figura 35 A, C, E**) evidenciados por la tinción de fluoresceína (**Figura 35 B, D, F**), y vasos profundos y/o superficiales formando uno o más penachos fibrovasculares de ≥90° que alcanzaron el eje visual (**Figura 35 A, C, E**). Además, se observó enfermedad corneal severa

en el Co1 del GCTM (**Figura 36 A, B**) y el Co7 del GCM (**Figura 36 C, D**) ya que mostraron hallazgos clínicos compatibles con la conjuntivalización y queratinización de 360° afectando al eje visual (puntuaciones ≥ 2 en todas las variables clínicas de estudio).

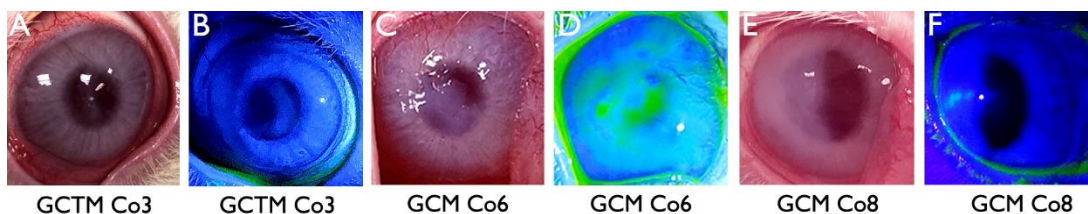


Figura 35. Evaluación clínica final de los ojos del GCTM y GCM. (A, C, E) Aspecto clínico de la córnea caracterizada por la presencia de PEE, leucomas, neovasos y penachos fibrovasculares. (B, D, F) Pruebas de fluoresceína positivas que muestran los defectos epiteliales remanentes teñidos en verde. Se muestran tres casos (Cos 3, 6 y 8) representativos para ambos grupos. **Co:** conejo. **GCM:** grupo control tratado con una membrana de fibrina de PRGF humano. **GCTM:** grupo control tratado con tratamiento médico exclusivo. **PEE:** erosiones punteadas epiteliales. **PRGF:** plasma rico en factores de crecimiento.

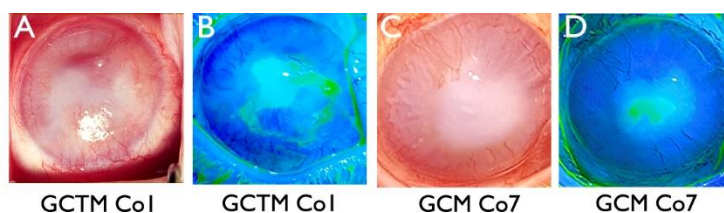


Figura 36. Casos graves de GCTM y GCM. Se observó epitelio conjuntival, neovascularización y queratinización central cubriendo la superficie corneal del Co1 del GCTM (A, B) y del Co7 del GCM (C, D). Se observó tinción verde en las pruebas de fluoresceína. **Co:** conejo. **GCM:** grupo control tratado con una membrana de fibrina de PRGF humano. **GCTM:** grupo control tratado con tratamiento médico exclusivo. **PRGF:** plasma rico en factores de crecimiento.

En cambio, los conejos de los demás grupos de tratamiento (**Figura 37**) mejoraron el diagnóstico clínico pre-trasplante sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (p -valores $> 0,05$) para las variables clínicas estudiadas de la **Tabla 4**. Los conejos mostraron una córnea totalmente clara (puntuaciones ≤ 1) en ausencia o presencia mínima de PEE. Del mismo modo, los conejos trasplantados no mostraron defectos epiteliales, pannus fibrovascular y neovascularización (puntuaciones 0) o se vieron afectados mínimamente (puntuaciones 1) en el Co13 del GMSC y los Cos 17 y 18 del GOMESC.

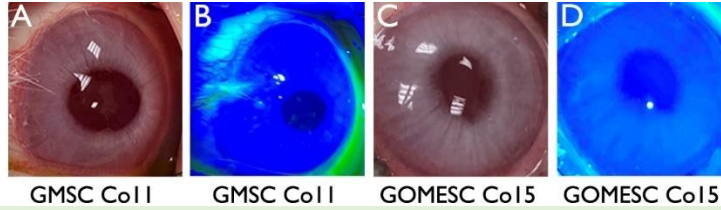


Figura 37. Evaluación final del GMSC y el GOMESC. (A, C) Aspecto clínico de la córnea caracterizada por su transparencia. (B, D) Prueba de fluoresceína. Se muestra un caso representativo de cada grupo. **Co:** conejo. **GMSC:** grupo tratado con MSC. **GOMESC:** grupo tratado con OMESC. **MSC:** células madre mesenquimales. **OMESC:** células madre epiteliales de la mucosa oral.

El Co13 presentó hallazgos compatibles con la conjuntivalización corneal parcial de 90-180° y con vasos sanguíneos superficiales y profundos formando un penacho fibrovascular que alcanzó el eje visual (**Figura 38 A, B**). En el Co17 (**Figura 38 C, D**) se observaron 3-4 vasos gruesos y superficiales afectando <90° que alcanzaron el eje visual, y en el Co18 (**Figura 38 E, F**) se observaron 2 vasos sanguíneos finos y aislados sin alcanzar el eje visual.

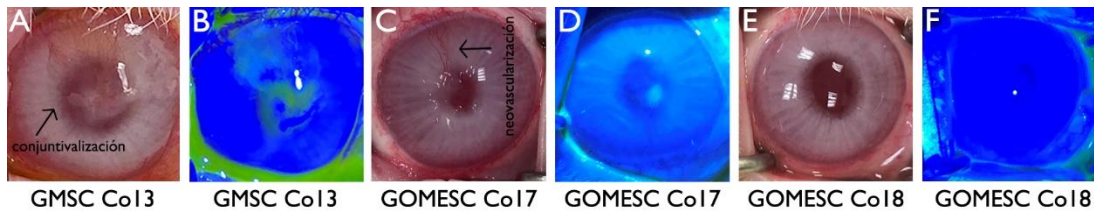


Figura 38. Secuelas posteriores al tratamiento del GMSC y el GOMESC. (A, B) Penacho fibrovascular sobre la córnea del Co13 del GMSC y su prueba de fluoresceína. (C, D) Neovascularización <90° y leucoma pequeño sobre el eje visual en la córnea del Co17 y su prueba de fluoresceína. (E, F) Presencia de 2 vasos aislados y finos en la córnea del Co18 y su prueba de fluoresceína. **Co:** conejo. **GMSC:** grupo tratado con MSC. **GOMESC:** grupo tratado con OMESC. **MSC:** células madre mesenquimales. **OMESC:** células madre epiteliales de la mucosa oral.

Las principales diferencias clínicas entre los cuatro tratamientos se observaron en el grado de opacificación (p -valor = 0,009), de neovascularización (p -valor = 0,006) y de defectos epiteliales (p -valor = 0,026) entre los grupos controles y los trasplantados con células madre (**Tabla 6**). Los conejos trasplantados con MSC y OMESC mostraron puntuaciones medias más bajas de opacificación (GMSC, GOMESC: $0,25 \pm 0,50$), neovascularización (GMSC: $0,25 \pm 0,50$ y GOMESC: $0,50 \pm 0,58$) y defectos epiteliales (GMSC: $0,50 \pm 0,58$ y GOMESC: $0,25 \pm 0,50$) que los conejos del GCTM (opacidad: $2,60 \pm 1,14$; neovascularización: $2,80 \pm 1,30$; defectos epiteliales: $2,20 \pm 0,84$) y del GCM (opacidad: $2,60 \pm 1,52$; neovascularización:

RESULTADOS

3,00 ± 0,71; defectos epiteliales: 1,16 ± 1,14) con diferencias estadísticamente significativas (p-valores < 0,05) (**Figura 39**). Todos los valores se expresan como M ± SD.

Tabla 6. Evaluación clínica de los conejos antes y después del periodo de seguimiento clínico. P0-P4: puntuaciones definidas en la **Tabla 4**.

G	Co	Opacidad					Neovascularización					Penachos fibrovasculares					Defectos epiteliales				
		P0	P1	P2	P3	P4	P0	P1	P2	P3	P4	P0	P1	P2	P3	P4	P0	P1	P2	P3	P4
1	1				◊	●			●		◊	●			◊				◊	●	
	2			◊		●		◊	●			◊	●			●		◊	●		
	3			●		◊			●		◊	●/◊				●		◊	●		
	4		●/◊						◊	●		●				◊		◊	●		
	5				●/◊					●/◊					●/◊				◊	●	
2	6					●/◊		◊		●		●		◊	●		◊		●		
	7				●	◊			●					◊			●	◊			
	8				●/◊			●	◊			●/◊				●		◊	●		
	9		◊	●					●	◊			●/◊			●		◊	●		
	10		◊		●				◊	●			◊			●				●	
3	11	◊			●		◊		●			◊		●		◊		●	●		
	12	◊			●		◊		●			◊		●		◊		●	●		
	13		◊			●		◊	●			◊		●		◊		●	●		
	14	◊			●				●		●/◊			●		◊		●	●		
4	15	◊			●		◊		●			◊	●		●		◊	●	●		
	16	◊			●		◊		●			◊		●		◊		●	●		
	17		◊			●		◊	●			◊				●/◊			●		
	18	◊			●			◊	●			◊		●		◊			●		
p		0,009*					0,006*					0,076					0,026*				

* Diferencias estadísticamente significativas (p-valores < 0,05). ●: pre-trasplante. ◊: post-trasplante. Co: conejo. G1: GCTM. G2: GCM. G3: GMSC. G4: GOMESC. GCM: grupo control tratado con membrana de fibrina de PRGF humano. GCTM: grupo control tratado con tratamiento médico exclusivo. GMSC: grupo tratado con MSC. GOMESC: grupo tratado con OMESC. P0-P4: puntuación de 0 a 4. p: p-valor.

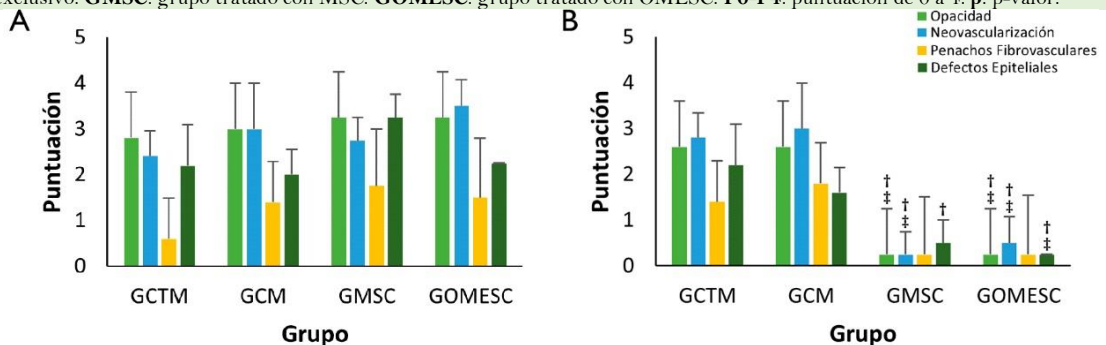


Figura 39. Evaluación clínica al inicio (A, pre-trasplante) y al final (B, post-trasplante) del periodo de seguimiento. *Opacificación:* se encontraron diferencias estadísticas entre GCTM (†) con el GMSC (p-valor = 0,016) y el GOMESC (p-valor = 0,017), y entre el GCM (‡) con el GMSC (p-valor = 0,022) y el GOMESC (p-valor = 0,022). *Neovascularización:* se encontraron diferencias estadísticas entre el GCTM con el GMSC (p-valor = 0,016) y el GOMESC (p-valor = 0,024), y entre el GCM con el GMSC (p-valor = 0,011) y el GOMESC (p-valor = 0,012). *Defectos epiteliales:* se encontraron diferencias estadísticas entre el GCTM con el GMSC (p-valor = 0,032) y el GOMESC (p-valor = 0,016), y entre el GCM con el GOMESC (p-valor = 0,071). Las barras representan M ± SD. †: se refiere al GCTM. ‡: se refiere al GCM. GCM: grupo control tratado con membrana de fibrina de PRGF humano. GCTM: grupo control tratado con tratamiento médico exclusivo. GMSC: grupo tratado con MSC. GOMESC: grupo tratado con OMESC. MSC: células madre mesenquimales. OMESC: células madre epiteliales de la mucosa oral.

8.2.5. Análisis histológico

Antes de la lesión (pre-causticación), las córneas presentaron un epitelio escamoso estratificado no queratinizado y compuesto por 4-5 capas de células en su parte periférica (CP) y central (CC) (**Figura 40**). Entre las capas del epitelio se distinguieron las células apicales aplanadas, las células alares intermedias y las células basales columnares. El epitelio se observó continuo con ausencia de úlceras o tejido cicatricial. Por encima del epitelio se observó un marcaje PAS intenso correspondiente a la capa del glicocálix, y por debajo del epitelio, en contacto con las células basales, se observó una membrana basal bien definida, lineal y continua con tinción PAS fuerte. Además, no se observaron células caliciformes teñidas de morado intenso con PAS en el epitelio corneal, cuya presencia se vio exclusivamente en el epitelio conjuntival. A nivel estromal, se observó una matriz extracelular avascular formada por fibras muy compactas con aspecto eosinofílico uniforme en toda su extensión. Además, se observó una pequeña cantidad de células fusiformes dispersas entre las fibras de la matriz con ausencia de células inmunes. Por otra parte, el epitelio de la conjuntiva (CONJ) bulbar mostró su morfología característica, es decir, un epitelio no queratinizado estratificado con células caliciformes teñidas por morado intenso mediante PAS e inferiormente un estroma de tejido conectivo laxo (**Figura 40**).

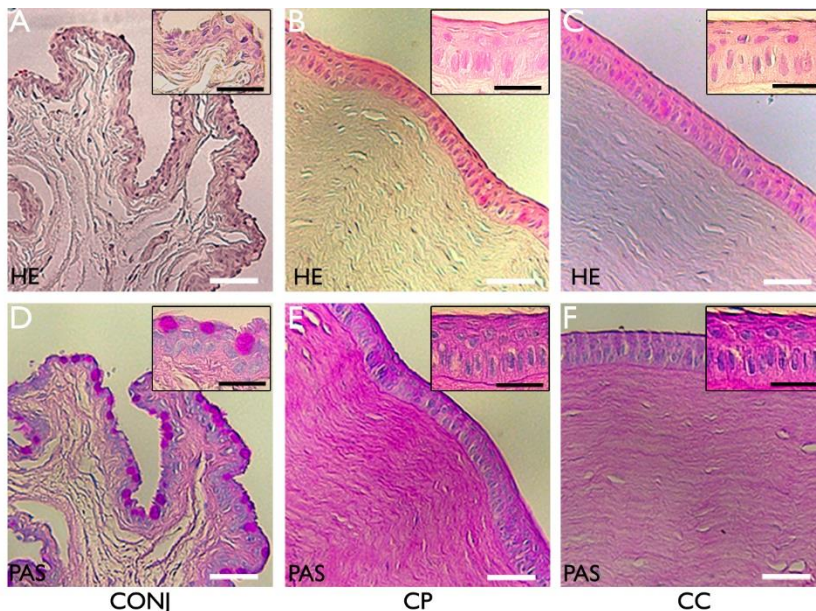


Figura 40. Morfología del epitelio y el estroma de la superficie ocular previamente a la lesión. Tinción de H&E de la conjuntiva bulbar (A), la córnea periférica (B) y central (C). Tinción de PAS de la

conjuntiva bulbar (D), la córnea periférica (E) y central (F). Se muestra un campo aumentado de cada epitelio en la esquina superior derecha. Las barras de escalas corresponden a 50 μm (blancas) y 25 μm (negras). **CC**: córnea central. **CONJ**: conjuntiva. **CP**: córnea periférica. **H&E**: hematoxilina y eosina. **PAS**: ácido periódico-Schiff.

Al final del periodo de seguimiento (post-trasplante), los conejos tratados con tratamiento médico exclusivo y membrana de fibrina de PRGF humano mostraron alteraciones morfológicas del epitelio y estroma corneal. Se observaron epitelios corneales reorganizados, con menos capas celulares (**Figura 41 A, B**); la membrana basal se observó en algunos casos adelgazada o ausente, con o sin pérdida de su linealidad horizontal y con tinción PAS suave o negativa (**Figura 41 C, D**); el glicocáliz presentó una tinción PAS suave o negativa en algunas zonas de la córnea (**Figura 41 E, F**); y se observaron úlceras epiteliales abiertas interrumpiendo la continuidad del epitelio (**Figura 41 G, H**). A nivel estromal, se observó edema separando las fibras de colágeno de la matriz estromal, infiltración de células inflamatorias y vasos sanguíneos en su espesor (**Figura 42**).

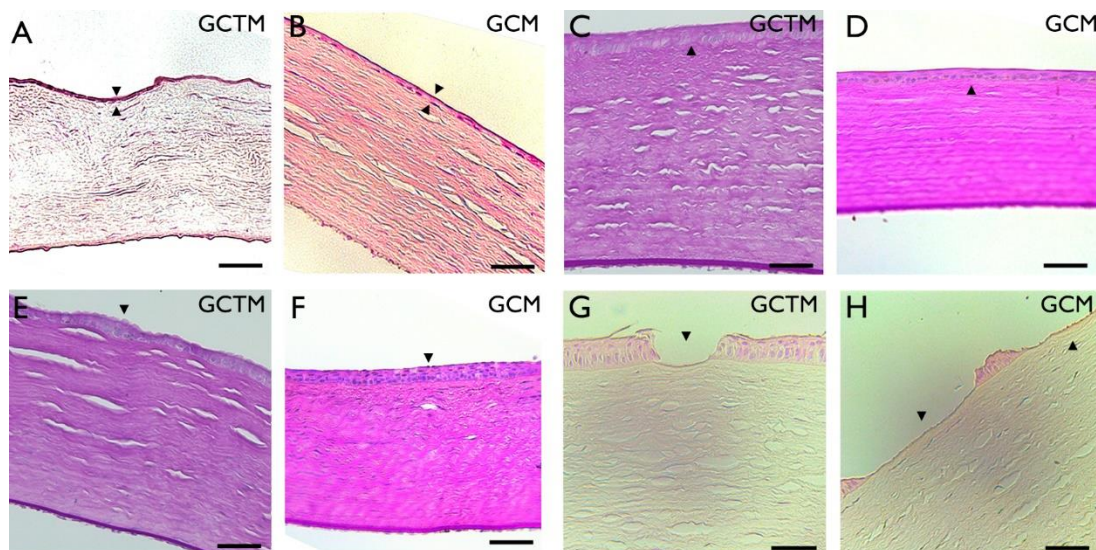


Figura 41. Estudio morfológico del epitelio corneal en el GCTM y el GCM. (A, B) Alteración del número de capas celulares y su morfología en la tinción de H&E. (C, D) Alteración de la membrana basal que mostró una tinción PAS leve o ausente. (E, F) Alteración del glicocáliz en la tinción PAS. (G, H) Presencia de úlceras abiertas observadas en la tinción de H&E. Se muestran casos representativos de cada grupo. Las barras de escala corresponden a 50 μm . \blacktriangleleft : señala las respectivas alteraciones. **GCM**: grupo control tratado con una membrana de fibrina de PRGF humano. **GCTM**: grupo control tratado con tratamiento médico exclusivo. **H&E**: hematoxilina y eosina. **PAS**: ácido periódico-Schiff. **PRGF**: plasma rico en factores de crecimiento.

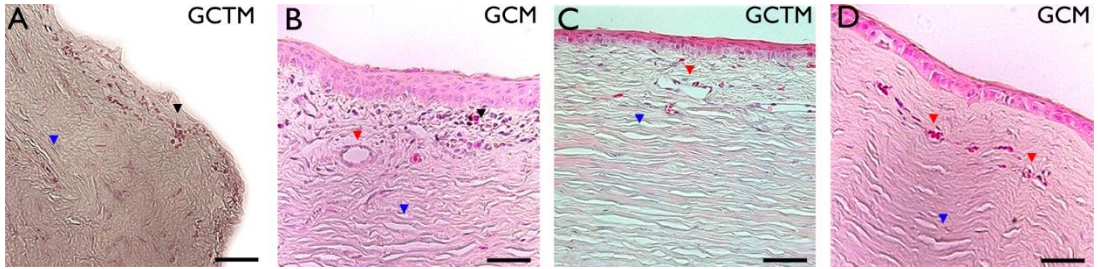


Figura 42. Estudio morfológico del estroma corneal en el GCTM y el GCM. Se observaron alteraciones del estroma corneal: presencia de edema (◄), infiltración de células inmunes (◄) y vascularización (◄) en la tinción de H&E del GCTM (A, C) y del GCM (B, D). Se presentan casos representativos de cada grupo. Las barras de escala corresponden a 50 μm. **GCM:** grupo control tratado con una membrana de fibrina de PRGF humano. **GCTM:** grupo control tratado con tratamiento médico exclusivo. **H&E:** hematoxilina y eosina. **PRGF:** plasma rico en factores de crecimiento.

Los resultados más relevantes se observaron en el Co3 (**Figura 43 A, B**) y en el Co9 (**Figura 43 C, D**) que presentaron células caliciformes teñidas por PAS en el epitelio de la CP; y en el Co1 (**Figura 44 A, B**) y el Co7 (**Figura 44 C, D**), que presentaron queratinización del epitelio apical y zonas con necrosis en la capa basal asociada a una membrana basal patológica con tinción PAS suave.

Por otra parte, no se observaron alteraciones morfológicas relevantes en el epitelio de la conjuntiva bulbar con respecto a su morfología previa a la lesión.

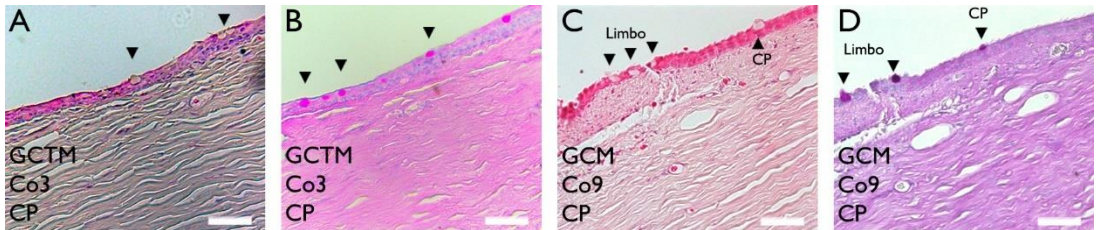


Figura 43. Células caliciformes en la córnea del Co3 del GCTM y del Co9 del GCM. (A, C) Tinción de H&E: células caliciformes (◄) en CP. (B, D) Tinción de PAS: células caliciformes teñidas en morado intenso (◄). Las barras de escala corresponden a 50 μm. **Co:** conejo. **CP:** córnea periférica. **GCM:** grupo control tratado con una membrana de fibrina de PRGF humano. **GCTM:** grupo control tratado con tratamiento médico exclusivo. **H&E:** hematoxilina y eosina. **PAS:** ácido periódico-Schiff. **PRGF:** plasma rico en factores de crecimiento.

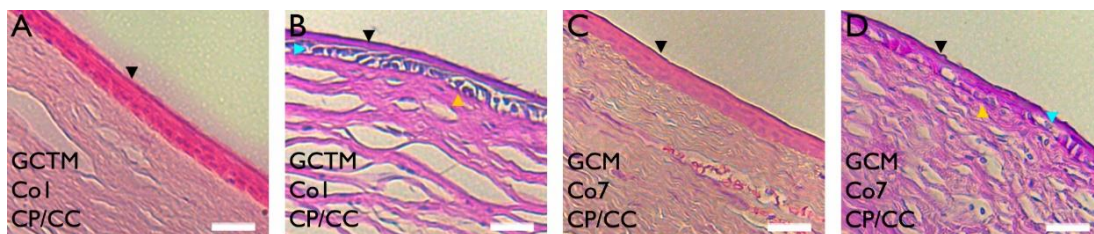


Figura 44. Epitelio queratinizado en la córnea del Co1 del GCTM y del Co7 del GCM. (A, C) Tinción de H&E: capa apical formada por células sin núcleo (◄), que sugiere queratinización del epitelio corneal, sobre 1-2 capas de células aplanadas con núcleo. (B, D) Tinción de PAS: capa apical formada por células sin núcleo (◄) sobre una capa basal con signos de necrosis (◄) y membrana basal con tinción PAS negativa (◄). Las barras de escala corresponden a 50 µm. CC: córnea central. Co: conejo. CP: córnea periférica. GCM: grupo control tratado con una membrana de fibrina de PRGF humano. GCTM: grupo control tratado con tratamiento médico exclusivo. H&E: hematoxilina y eosina. PAS: ácido periódico-Schiff. PRGF: plasma rico en factores de crecimiento.

En cambio, los ojos tratados como MSC y OMESC presentaron una morfología corneal normal con mínimas alteraciones cuando se vieron. Se observaron epitelios y estromas normales en toda su continuidad (**Figura 45 A, C**). Se observó tinción PAS normal en el glicocáliz y la membrana basal, y no se encontraron células caliciformes en la córnea teñidas en morado intenso por PAS (**Figura 45 B, D**).

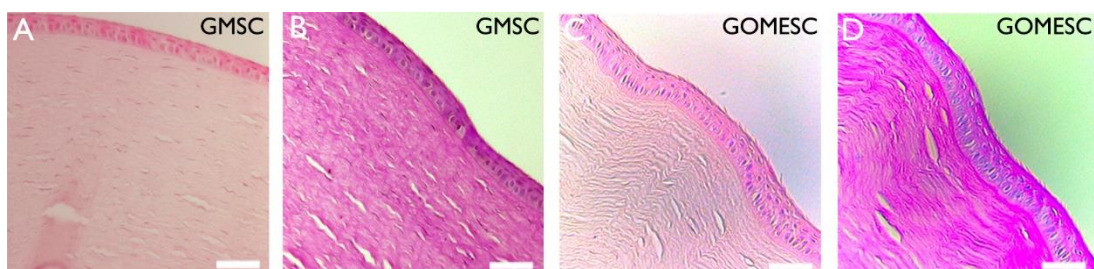


Figura 45. Morfología del epitelio y estroma corneal del GMSC y GOMESC. Epitelio y estroma con morfología normal en la tinción de H&E del GMSC (A) y del GOMESC (C). La membrana basal y el glicocáliz mostraron morfología normal y tinción intensa en morado con PAS en el GMSC (B) y el GOMESC (D) Se muestra un caso representativo de cada grupo. Las barras de escala corresponden a 50 µm. GMSC: grupo tratado con MSC. GOMESC: grupo tratado con OMESC. H&E: hematoxilina y eosina. MSC: células madre mesenquimales. OMESC: células madre epiteliales de la mucosa oral. PAS: ácido periódico-Schiff.

Las alteraciones más relevantes se encontraron en el Co13 del GMSC, en el cual se observó alteración del número de capas del epitelio corneal periférico y central, presencia de células caliciformes en el epitelio de la CP teñidas por PAS, edema estromal y vasos (**Figura 46**).

Mientras que, se encontraron alteraciones menos relevantes en el Co14 del GMSC (**Figura 47 A**) y en los Cos 15-18 (**Figura 47 B**) del GOMESC, que consistió en unos pocos vasos de pequeño calibre aislados y profundos en el estroma de la CP que se acompañaron de edema estromal leve en algunos casos.

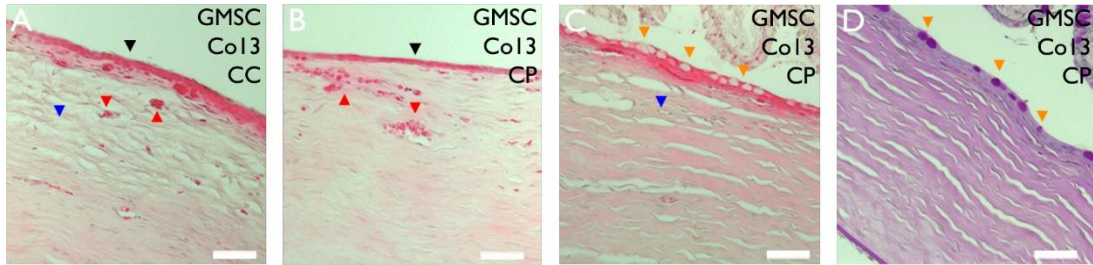


Figura 46. Morfología del epitelio y el estroma del Co13 del GMSC. Se muestra la histología del penacho fibrovascular mediante tinción con H&E (A-C) y PAS (D). Se ven alteraciones morfológicas del epitelio (◄) y del estroma que incluyen células caliciformes (◄) en el espesor del epitelio corneal que se tiñeron de morado intenso con PAS, edema estromal (◄) y vascularización (◄) superficial y profunda del estroma. Las barras de escalas corresponden a 50 μ m. CC: córnea central. Co: conejo. CP: córnea periférica. GMSC: grupo tratado con MSC. H&E: hematoxilina y eosina. MSC: células madre mesenquimales. PAS: ácido periódico-Schiff.

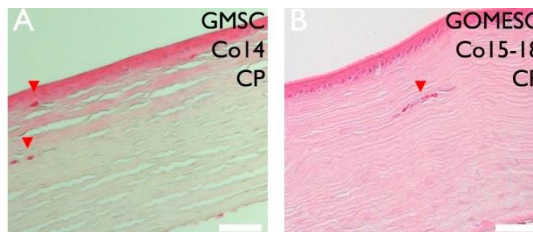


Figura 47. Morfología de las secuelas del GMSC y GOMESC. En las tinciones de H&E se ve mínima vascularización (◄) del estroma corneal. Se muestra un caso representativo para el GOMESC. Las barras de escalas corresponden a 50 μ m. Co: conejo. CP: córnea periférica. GMSC: grupo tratado con MSC. GOMESC: grupo tratado con OMESC. MSC: células madre mesenquimales. OMESC: células madre epiteliales de la mucosa oral. H&E: hematoxilina y eosina.

8.2.6. Análisis fenotípico

Previamente a la lesión (pre-causticación), se observó el siguiente patrón de expresión molecular en el epitelio corneal: CK3 positiva en las células intermedias y apicales de la CP y CC, y tanto CK13 como MUC5AC negativas en todos los estratos de la CP y CC (**Figura 48 a.2 – c.2, a.3 – c.3**). Mientras que en el epitelio de la CONJ bulbar se observó: expresión

CK13 positiva, MUC5C positiva y CK3 negativa (Figura 48 a.1 – c.1). No se observó marcaje de CK10 ni en la CONJ (Figura 49 a.1) ni en la córnea (Figura 49 a.2 – a.3).

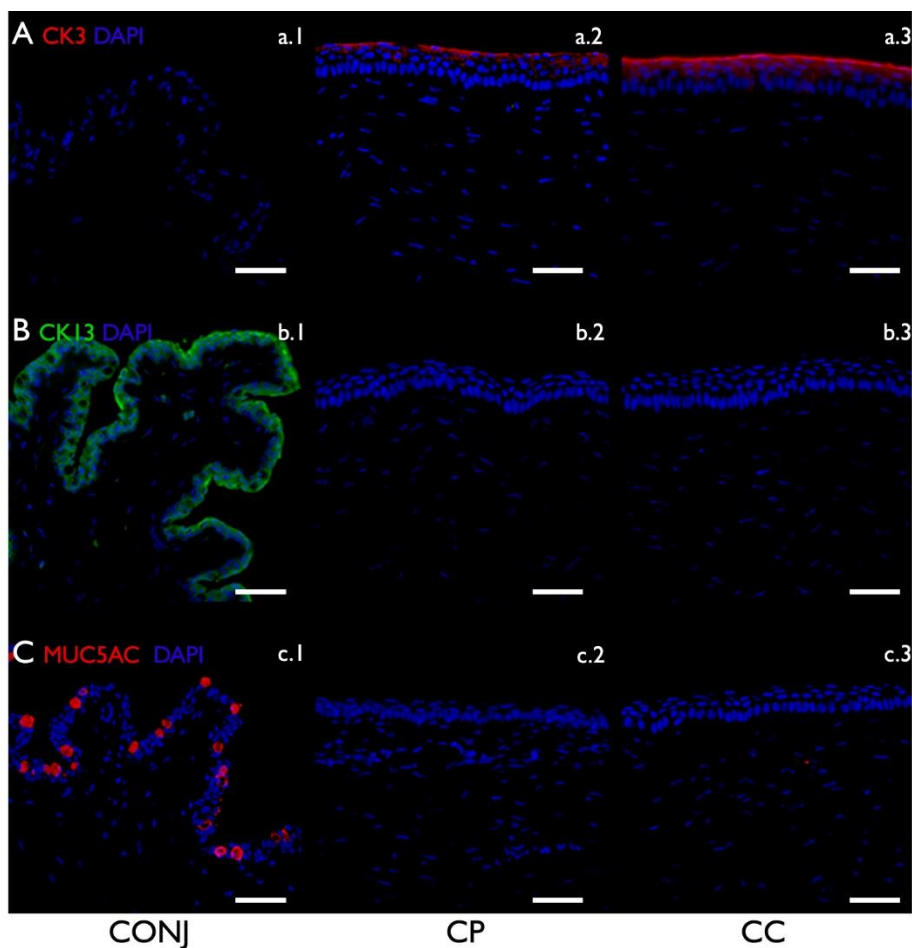


Figura 48. Fenotipo del epitelio de la superficie ocular previamente a la lesión (pre-cauterización). (A) CK3 (rojo) negativa en la CONJ (a.1) y positiva en CP (a.2) y CC (a.3). (B) CK13 (verde) positiva en la CONJ (b.1) y negativa en CP (b.2) y CC (b.3). (C) MUC5AC (rojo) positiva la CONJ (c.1) y negativa en CP (c.2) y CC (c.3). Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). Las barras de escala corresponden a 50 μ m. **CC:** córnea central. **CK:** citoqueratina. **CONJ:** conjuntiva. **CP:** córnea periférica. **DAPI:** 4',6-diamino-2-fenilindol. **MUC5AC:** proteína mucina 5AC.

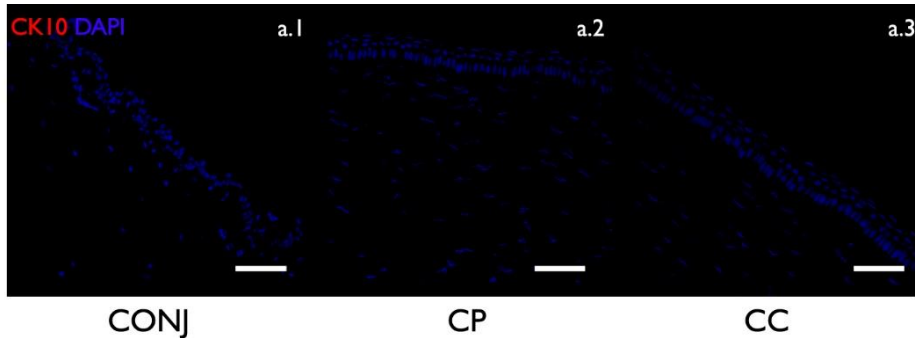


Figura 49. Ausencia de CK10 en la superficie ocular previamente a la lesión. La CK10 (roja) fue negativa en la CONJ (a.1), la CP (a.2) y la CC (a.3). Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). Las barras de escala corresponden a 50 μm. **CC:** córnea central. **CK:** citoqueratina. **CONJ:** conjuntiva. **CP:** córnea periférica. **DAPI:** 4',6-diamino-2-fenilindol.

Tabla 7. Marcadores moleculares alterados en el epitelio corneal de los conejos 42 días después de los tratamientos (post-trasplante). Fenotipo normal: MUC5AC⁻, CK13⁻, CK3⁺, CK10⁻.

G	Co	CP				CC			
		MUC5AC	CK13	CK3	CK10	MUC5AC	CK13	CK3	CK10
1	1								
	2								
	3								
	4								
	5								
2	6								
	7								
	8								
	9								
	10								
3	11								
	12								
	13								
	14								
4	15								
	16								
	17								
	18								

Se marca en negro cuando se vio expresión del marcador distinta a la normal. **CC:** córnea central. **CK:** citoqueratina. **Co:** conejo. **CP:** córnea periférica. **G1:** GCTM. **G2:** GCM. **G3:** GMSC. **G4:** GOMESC. **MUC5AC:** mucina 5AC.

Al final del periodo de seguimiento (post-trasplante), los conejos tratados con tratamiento médico exclusivo (GCTM) y membrana de fibrina de PRGF humano (GCM) mostraron alteraciones fenotípicas del epitelio de la CP y CC similares, siendo el GCTM en el que mostró peores resultados (**Tabla 7**). La CK3 se observó en 3/5 de los casos (Cos 1, 2 y 4 del GCTM y Cos 6, 7 y 8 del GCM), pero su ausencia se encontró en las CPs y CCs (total) de

RESULTADOS

2/5 de los casos (Cos 3 y 5 del GCTM y Cos 9 y 10 del GCM) (**Figura 50**). La expresión de CK13 se observó en las CPs (parcial) de 4/5 de los casos (Cos 1, 2, 3 y 5 del GCTM y Cos 6, 7, 9 y 10 del GCM), de los cuales tres casos del GCTM (Cos 1, 2 y 5) y un caso del GCM (Co7) también mostraron expresión de CK13 en sus CCs (total) (**Figura 51**). La expresión de MUC5AC sólo se observó en el Co3 del GCTM (**Figura 52**) confirmando la presencia de células caliciformes teñidas con PAS. Y la expresión de CK10 se observó en 1/5 de los casos (Co1 del GCTM -**Figura 53**- y Co8 del GCM -**Figura 54**-) afectando a la CP y CC.

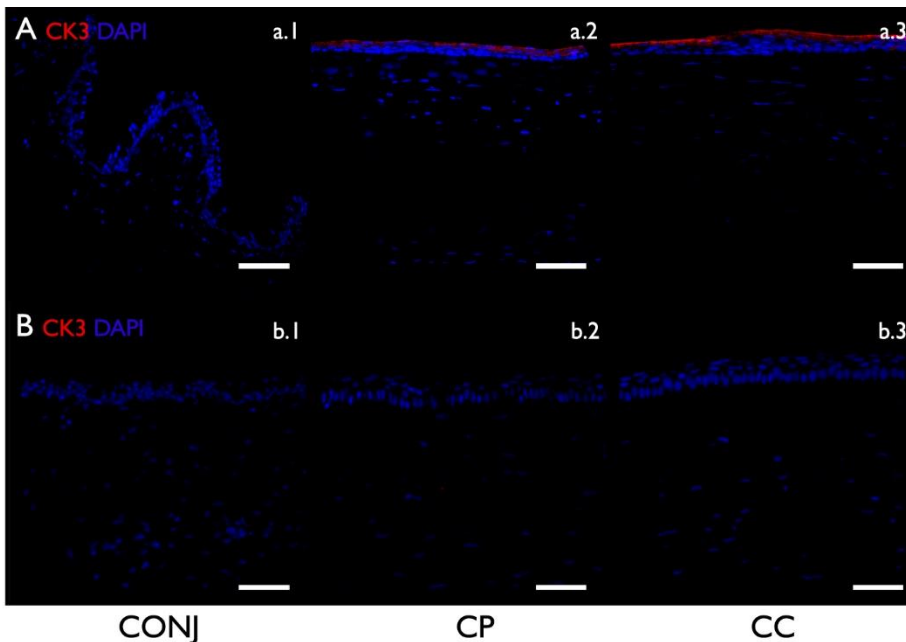


Figura 50. Estudio de CK3 en el GCTM y el GCM. (A) Expresión normal: CK3 (rojo) negativa en la CONJ (a.1) y positiva en CP (a.2) y CC (a.3). (B) Pérdida total: CK3 (rojo) negativa en la CONJ (b.1), CP (b.2) y CC (b.3). Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). Se muestran casos representativos para ambos grupos. Las barras de escala corresponden a 50 μ m. **CC**: córnea central. **CK**: citoqueratina. **CP**: córnea periférica. **CONJ**: conjuntiva. **DAPI**: 4',6-diamino-2-fenilindol. **GCM**: grupo control tratado con una membrana de fibrina de PRGF humano. **GCTM**: grupo control tratado con tratamiento médico exclusivo. **PRGF**: plasma rico en factores de crecimiento.

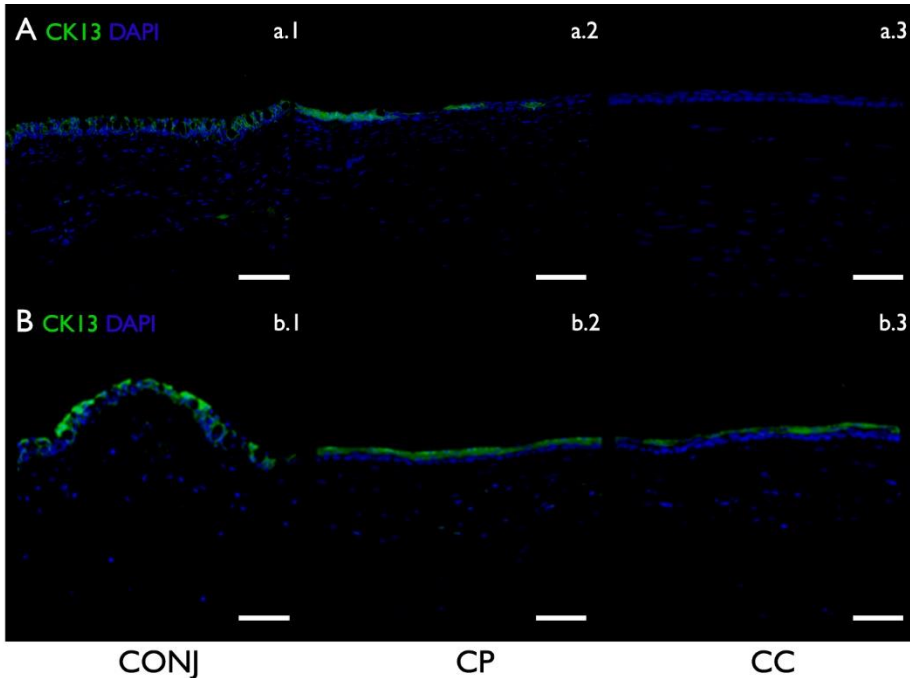


Figura 51. Estudio de CK13 en el GCTM y el GCM. (A) Expresión parcial: CK13 (verde) positiva en la CONJ (b.1) y CP (b.2), y negativa en la CC (b.3) (B) Expresión total: CK13 (verde) positiva en la CONJ (a.1), CP (a.2) y CC (a.3). Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). Se muestran casos representativos para ambos grupos. Las barras de escala corresponden a 50 μ m. **CC:** córnea central. **CK:** citoqueratina. **CP:** córnea periférica. **CONJ:** conjuntiva. **DAPI:** 4',6-diamino-2-fenilindol. **GCM:** grupo control tratado con una membrana de fibrina de PRGF humano. **GCTM:** grupo control tratado con tratamiento médico exclusivo. **PRGF:** plasma rico en factores de crecimiento.

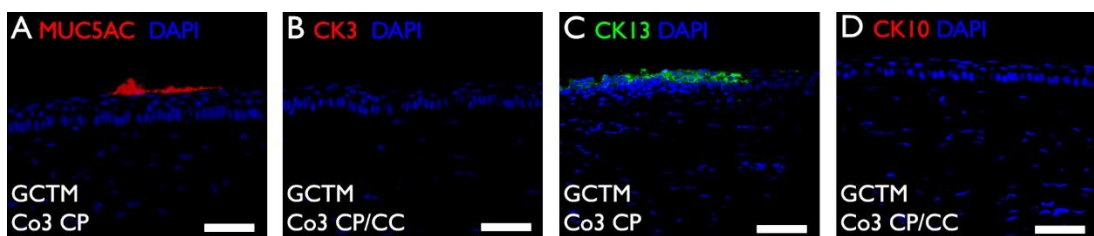


Figura 52. Fenotipo del Co3 del GCTM. (A) MUC5AC (rojo) positiva en CP. (B) CK3 (rojo) negativa en CP y CC. (C) CK13 (verde) positiva en CP cerca del limbo esclerocorneal. (D) CK10 (rojo) negativa en CP y CC. Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). Las barras de escala corresponden a 50 μ m. **CC:** córnea central. **CK:** citoqueratina. **Co:** conejo. **CP:** córnea periférica. **DAPI:** 4',6-diamino-2-fenilindol. **GCTM:** grupo control tratado con tratamiento médico exclusivo. **MUC5AC:** proteína mucina 5AC.

RESULTADOS

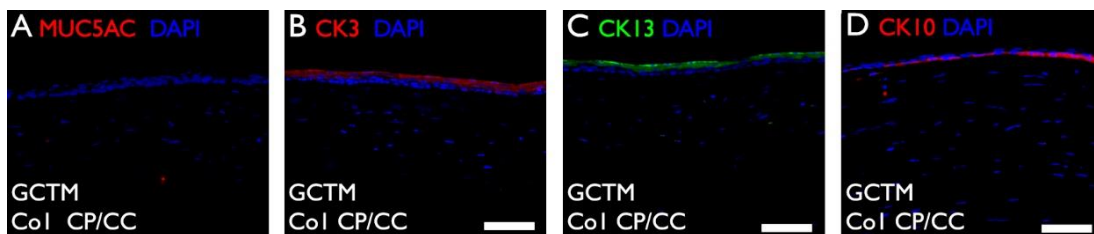


Figura 53. Fenotipo del Co1 del GCTM. (A) MUC5AC (rojo) negativa en CP y CC. (B) CK3 (rojo) positiva en CP y CC. (C) CK13 (verde) positiva en CP y CC. (D) CK10 (rojo) positiva en CP y CC. Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). Se muestra una imagen representativa de la CP y CC para cada marcador. Las barras de escala corresponden a 50 μ m. **CC:** córnea central. **CK:** citoqueratina. **Co:** conejo. **CP:** córnea periférica. **DAPI:** 4',6-diamino-2-fenilindol. **GCTM:** grupo control tratado con tratamiento médico exclusivo. **MUC5AC:** proteína mucina 5AC.

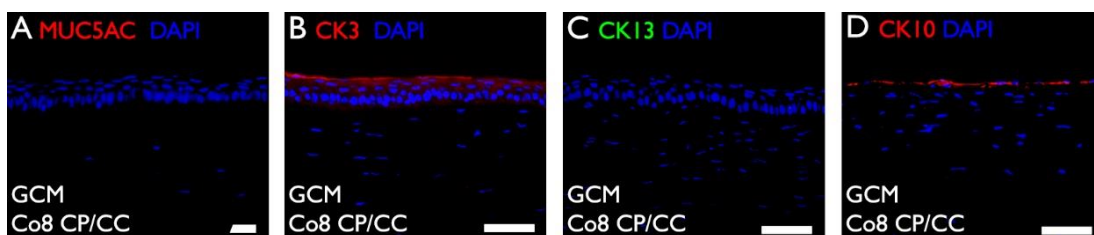


Figura 54. Fenotipo del Co8 del GCM. (A) MUC5AC (rojo) negativa en CP y CC. (B) CK3 (rojo) positiva en CP y CC. (C) CK13 (verde) negativa en CP y CC. (D) CK10 (rojo) positiva en CP y CC. Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). Las barras de escala corresponden a 50 μ m. **CC:** córnea central. **CK:** citoqueratina. **Co:** conejo. **CP:** córnea periférica. **DAPI:** 4',6-diamino-2-fenilindol. **GCM:** grupo control tratado con una membrana de fibrina de PRGF humano. **MUC5AC:** proteína mucina 5AC. **PRGF:** plasma rico en factores de crecimiento.

En cambio, los conejos trasplantados con MSC y OMESC mostraron un fenotipo corneal normal con alteraciones mínimas, mostrando el GOMESC los mejores resultados (**Tabla 7**). La CK3 fue normal, se observó en todo el epitelio de las CPs y CCs de todos los conejos (**Figura 55 A**). La expresión de CK13 fue negativa en la mayoría de los conejos (**Figura 55 B**), sin embargo, se encontró expresión positiva parcial en las CPs de 1/4 de los casos (el Co12 del GMSC -**Figura 56 A**- y el Co18 del GOMESC -**Figura 56 B**-), y total en la CP y CC del Co13 del GMSC (**Figura 57**). La expresión de MUC5AC fue negativa en todos los conejos (**Figura 55 C**), a excepción del Co13 del GMSC (**Figura 57**). Y la expresión de CK10 fue negativa en las CPs y CCs de todos los conejos del GMSC y GOMESC.

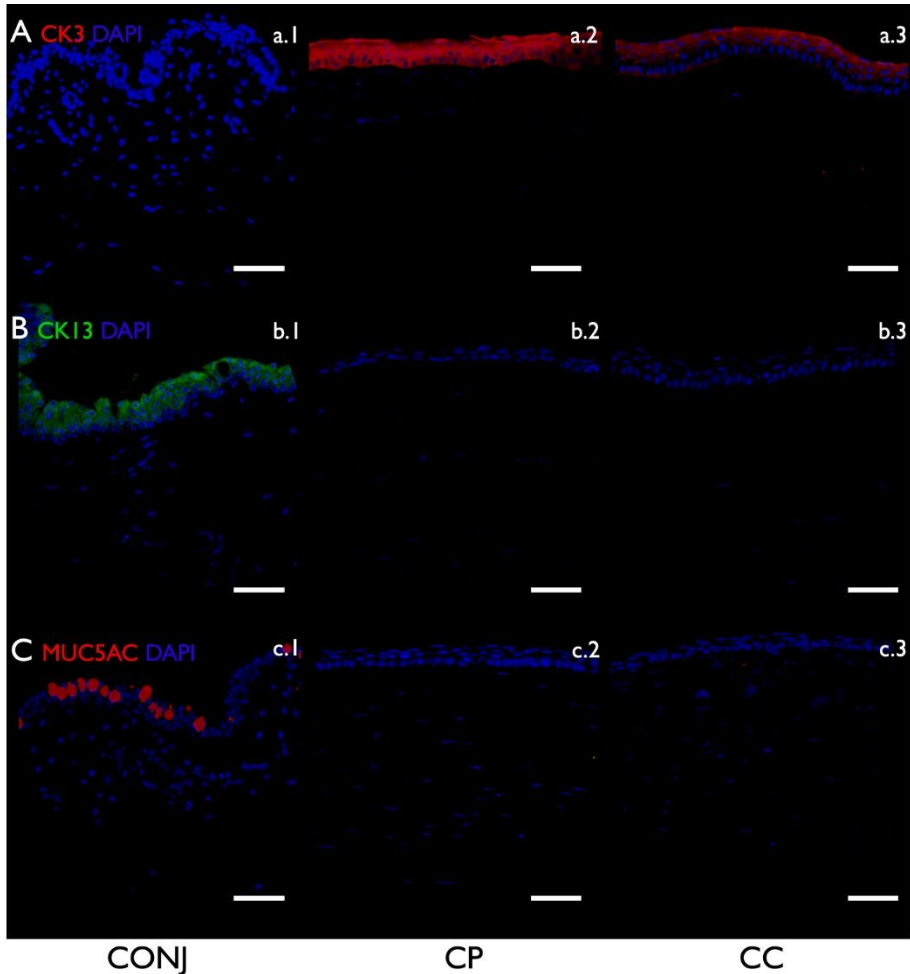


Figura 55. Fenotipo del epitelio corneal en los grupos tratados con los implantes oculares de células madre. (A) CK3 (rojo) negativa en la CONJ (a.1) y positiva en CP (a.2) y CC (a.3). (B) CK13 (verde) positiva en la CONJ (b.1) y negativa en CP (b.2) y CC (b.3). (C) MUC5AC (rojo) positiva en la CONJ (c.1) y negativa en CP (c.2) y CC (c.3). Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). Se muestra un caso representativo para ambos grupos. Las barras de escala corresponden a 50 μm . **CC:** córnea central. **CONJ:** conjuntiva. **CP:** córnea periférica. **CK:** citoqueratina. **DAPI:** 4',6-diamino-2-fenilindol **GMSC:** grupo tratado con MSC. **GOMESC:** grupo tratado con OMESC. **MUC5AC:** proteína mucina 5AC.

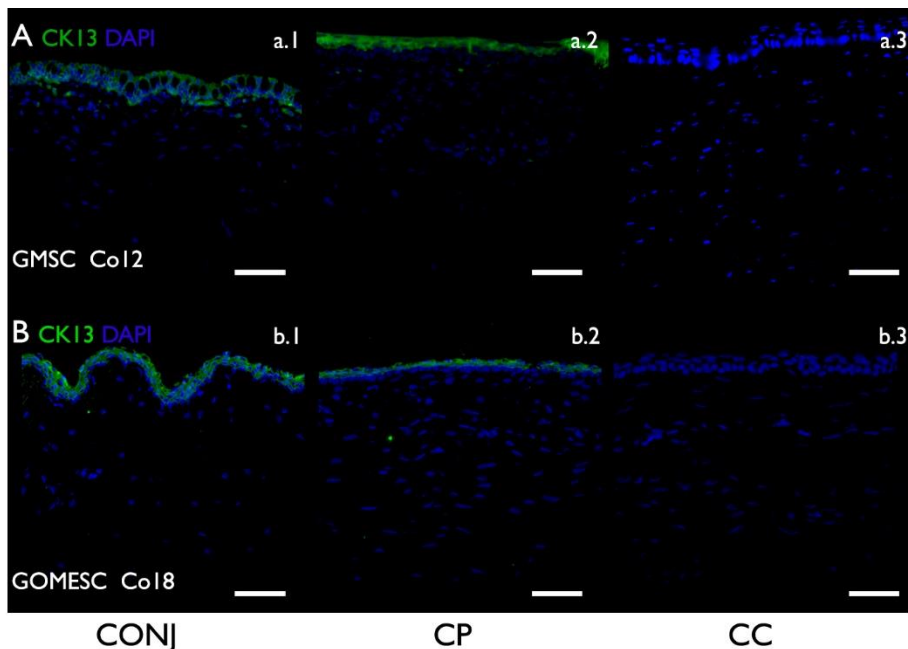


Figura 56. Alteraciones fenotípicas en el GMSC y el GOMESC. (A) CK13 (verde) positiva en la CONJ (a.1) y CP (a.2) y negativa en CC (a.3) del Co12 del GMSC. (B) CK13 (verde) positiva en la CONJ (b.1) y CP (b.2) y negativa en CC (b.3). Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). Las barras de escala corresponden a 50 μm . **CC:** córnea central. **CK:** citoqueratina. **Co:** conejo. **CONJ:** conjuntiva. **CP:** córnea periférica. **DAPI:** 4',6-diamino-2-fenilindol. **GMSC:** grupo tratado con MSC. **GOMESC:** grupo tratado con OMESC.

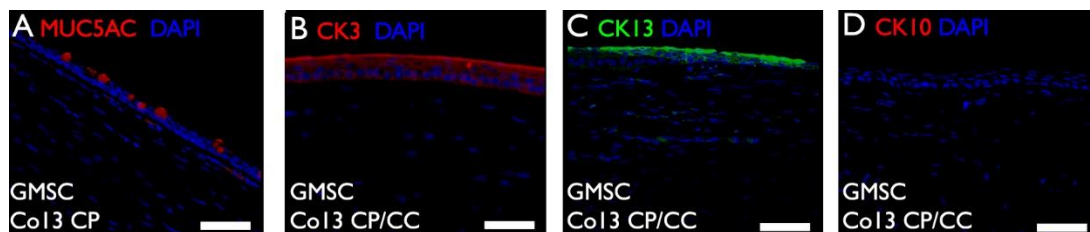


Figura 57. Fenotipo de la córnea del Co13 del GMSC. (A) MUC5AC (rojo) positiva en CP. (B) CK3 (rojo) positiva en CP y CC. (C) CK13 (verde) positiva en CP y CC. (D) CK10 (rojo) negativa en CP y CC. Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). Las barras de escala corresponden a 50 μm . **CC:** córnea central. **CK:** citoqueratina. **Co:** conejo. **CP:** córnea periférica. **DAPI:** 4',6-diamino-2-fenilindol. **GMSC:** grupo tratado con MSC. **MUC5AC:** proteína mucina 5AC.

Finalmente, el epitelio de la conjuntiva bulbar mostró su fenotipo característico sin alteraciones: MUC5AC positiva marcando la mucina de las células caliciformes, CK3 negativa, CK13 positiva y CK10 negativa (**Figura 58**).

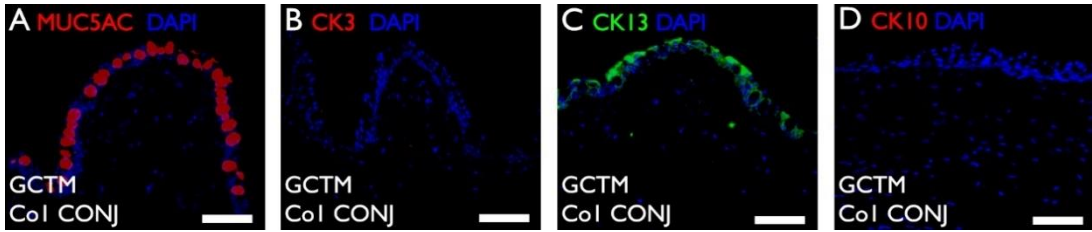


Figura 58. Estudio fenotípico del epitelio de la conjuntiva bulbar. (A) MUC5AC (rojo) positiva. (B) CK3 (rojo) negativa. (C) CK13 (verde) positiva. (D) CK10 (rojo) negativa. Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). Las barras de escala corresponden a 50 μ m. Se muestra el Co1 como caso representativo de los grupos controles. **CK:** citoqueratina. **Co:** conejo. **CONJ:** conjuntiva. **DAPI:** 4',6-diamino-2-fenilindol. **GCTM:** grupo control tratado con tratamiento médico exclusivo. **MUC5AC:** proteína mucina 5AC.

9. DISCUSIÓN

La córnea está formada por tres tejidos (epitelio, estroma y endotelio) cuya principal función es permitir la visión dejando pasar las imágenes hacia la retina. La transparencia corneal es aportada principalmente por el estroma gracias a su alta especialización estructural. A su vez, el epitelio protege el estroma del medio externo para que conserve su transparencia formando una barrera celular que se mantiene íntegra gracias a su continua autorrenovación a expensas de las células basales del propio epitelio y de las LSC localizadas en el limbo esclerocorneal. Cuando se produce una agresión del epitelio que daña las LSC, la renovación del epitelio se ve comprometida, se pierde la integridad del epitelio dejando el estroma expuesto al medio exterior, el cual se vuelve reactivo cambiando su morfología y adquiriendo un aspecto opaco. Además, las lesiones desepitelizantes se asocian a dolores intensos ya que el estroma corneal es uno de los tejidos más inervados y sensibles del cuerpo [9]. De manera que, ante un traumatismo ocular, favorecer la reepitelización de la córnea lo antes posible es uno de los abordajes prioritarios.

Los tratamientos quirúrgicos van desde la aplicación de varias membranas para promover la reepitelización y reducir la inflamación, la cicatrización y neovascularización, o el trasplante de tejido limbar, de queratoplastias lamelar y penetrante, y hasta el uso de queratoprótesis como último recurso en pacientes recidivantes. Disponer de alternativas que favorezcan la reepitelización corneal es fundamental para tratar al paciente de manera inmediata y no tener que depender del autotrasplante o alotrasplante de limbo, debido a la cantidad limitada de limbo autólogo, a alta demanda que existe de córneas de donante y a los riesgos que supone un trasplante autólogo y alogénico [67,68].

En el presente trabajo, se presentan dos MTA potencialmente autólogos basados en el cultivo de células madre no limbares a partir de biopsias mínimas de tejido y empleando un sistema de cultivo sencillo y libre de factores xenogénicos con la finalidad de restaurar el epitelio de córneas con el limbo gravemente dañado, para prevenir la ceguera por opacidad corneal o la LSCD. Las células madre se expandieron *in vitro* usando el PRGF como única fuente de factores de crecimiento, y posteriormente, se trasplantaron usando la membrana de fibrina de PRGF como soporte y vehículo celular. La viabilidad y respuesta de los MTA se evaluó *in vivo* en un modelo de ratón atímico, mientras que la eficacia de las MSC y de las OMESC regenerando el epitelio corneal se evaluaron *in vivo* en conejos con traumatismo ocular. El modelo de traumatismo ocular elegido para estudiar la eficacia fue la quemadura

química por álcali. Las quemaduras oculares suponen hasta el 18 % de los traumatismos oculares [31,32], y se ha visto que la intervención quirúrgica temprana disminuye el riesgo de complicaciones que acaban progresando hacia una lesión severa relacionada con la quemadura ocular [85].

Para desarrollar los MTA se han utilizado dos tipos de células madre no limbares: MSC y OMESC. Ambos tipos celulares se pueden obtener de fuentes de tejidos muy accesibles y que se pueden biopsiar mediante procedimientos mínimamente invasivos, la grasa subcutánea y la mucosa oral respectivamente; además, estas fuentes de tejidos están ampliamente disponibles en adulto permitiendo terapias autólogas que no dependen de donaciones de donantes vivos emparentados o cadavéricos (alógenicas).

Las MSC han sido utilizadas en una gran variedad de aplicaciones clínicas gracias a su plasticidad, actividad paracrina, inmunomodulación y actividad quimiotáctica [86]. Estudios previos han descrito la seguridad y eficacia del uso clínico de MSC en trastornos inflamatorios y defectos epiteliales oculares [74], ya que estas células contribuyen a mejorar la regeneración de la superficie ocular modulando tanto la inflamación como la angiogénesis [87,88] y potenciando la proliferación de células madre locales para reconstruir el tejido dañado [89,90]. Sin embargo, los mecanismos subyacentes responsables de tales efectos se han dilucidado recientemente [89], cuando se describieron que los efectos de las MSC podrían estar mediados por la acción de la IL-10, el TGF- β , la IL-6 y la TSP-1 secretados por las propias MSC. En los últimos años, el potencial terapéutico de las MSC para el tratamiento de la superficie ocular está ganando interés [74,88,91,92]. Para el uso oftálmico, la médula ósea y el tejido adiposo [90] son las fuentes más comunes para obtener MSC, aunque aún se desconoce cuál es más efectiva y adecuada para la terapia celular [93]. Estas fuentes comparten características similares, morfología y fenotipo inmunológico [94,95], y diferentes estudios han descrito a ambas como adecuadas para una potencial aplicación clínica [96,97].

Por otra parte, la mucosa oral de la cavidad bucal es una fuente de células madre adultas con una extracción más accesible y menos invasiva que la grasa subcutánea, de la cual es posible realizar múltiples extracciones, con escasas complicaciones asociadas, y que se emplea como autoinjerto en muchas especialidades clínicas para evitar los riesgos de los injertos alógenicos [59]. El uso de injertos de mucosa oral en Oftalmología se ha descrito en

numerosas publicaciones para la reconstrucción de la córnea [75,98], la conjuntiva bulbar [99], o los párpados [100], como tratamiento del simbléfaron después de un traumatismo ocular [101], en enfermedad crónica ocular [102], o como soporte en queratoprótesis [103]. Además, las OMESC comparten el marcador molecular CK3 con el epitelio corneal [104,105], y son el tipo celular no limbal más comúnmente estudiado y aplicado en el tratamiento de la LSCD después de las LSC. El autoinjerto de OMESC cultivadas *ex vivo* en pacientes con LSCD fue descrito por primera vez en 2004 como un avance en la Medicina Regenerativa de la córnea [75]. Se ha demostrado que las OMESC pueden reconstruir la superficie corneal actuando como un andamio para la proliferación de las células epiteliales con la ventaja de que no contiene las células caliciformes que están presentes en la conjuntiva bulbar [106]. Además, las OMESC podrían proporcionar un microambiente con los factores de crecimientos y estímulos quimiotácticos necesarios para la revitalización y proliferación de las LSC remanentes, dando lugar a una mejora de la función visual [107].

Cultivo celular y trasplante libre de factores xenogénicos

Las terapias celulares empleadas en la regeneración del epitelio corneal utilizan en su preparación y trasplante componentes tanto xenogénicos como alogénicos, que, aunque no están prohibidos, deben evitarse. Evitar el uso de componentes derivados de animales (como el SBF, los fibroblastos murinos 3T3 o la tripsina gástrica porcina) es importante en un contexto clínico porque se ha demostrado que pueden aumentar la producción de citoquinas proinflamatorias y profibrogénicas en las células cultivadas, y que pueden provocar el rechazo del injerto debido a los componentes xenogénicos y la posibilidad de transmisión de patógenos como los priones [108]. Por esta misma razón, es preferible el uso de soportes/productos de origen humano para el trasplante de las células, siendo la membrana amniótica humana el *gold standard* actual en cirugía corneal. Sin embargo, la membrana amniótica tiene algunas desventajas como son la dependencia de un banco de tejidos para su producción, su disponibilidad limitada por la donación altruista, la necesidad de almacenamiento, conservación y transporte, y siempre resultará en un tratamiento alogénico, lo que significa que la transmisión de enfermedades y la respuesta inmune en el receptor siguen siendo un riesgo importante [74,88,90].

Para garantizar las condiciones libres de xenogénicos y alogénicos, en este trabajo se ha reemplazado los componentes animales del cultivo celular (SBF, fibroblastos murinos 3T3) y la membrana amniótica. Éstos cambios consistieron en (1) utilizar de una técnica de cultivo sencilla, conocida como ‘cultivo por explantes’, que ha demostrado previamente [80,81] una buena capacidad de expansión de células madre; (2) se ha sustituido el SBF por factores de crecimiento de origen plasmático humano [79]; (3) se ha reemplazado la tripsina gástrica porcina por una tripsina de origen recombinante (la TrypLE™ Express Enzyme); (4) se ha eliminado la capa alimentadoras de fibroblastos murinos 3T3 del cultivo de mucosa oral; y (5) se ha sustituido la membrana amniótica por la membrana de fibrina de PRGF humano [58,79]. Los factores de crecimiento para suplementar los medios de cultivo y la membrana de fibrina de PRGF para el trasplante se prepararon utilizando el kit oftalmológico Endoret®(PRGF®) de BTI. Se trata de un kit que permite preparar derivados hemáticos para uso humano aprobado (PS/2015/1276) por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) y que combinándolo con tejido autólogo permitiría preparar terapias celulares completamente autólogas donde todos los componentes son obtenidos del propio paciente [108–111]. El principal beneficio que nos aporta este kit es que nos permite obtener el PRGF con un rango de características biológicas definido, mediante un método reproducible y que ha sido estudiado en multitud de publicaciones.

Los resultados obtenidos en este trabajo con el sistema de cultivo basado en PRGF demuestran que es posible preparar un implante ocular de MSC y OMESC empleando derivados hemáticos. Nuestros resultados son consistentes con estudios previos que demuestran la efectividad del PRGF en medios de cultivo para crecer tanto MSC [112] como OMESC [79], y la efectividad de la membrana de fibrina como soporte y vehículo para trasplantar las células madre manteniendo su estadio indiferenciado [58,79]. Empleando este sistema, el paciente se beneficiaría no sólo del poder regenerativo de las células madre sino también de las propiedades demostradas del suero y la fibrina plasmática tales como los factores de crecimiento fundamentales, propiedades antiinfecciosas y proliferativas e inhibición de la fibrosis [111,113]. Se ha descrito que el suero autólogo humano promueve la regeneración y por tanto el crecimiento epitelial no solo en los cultivos celulares, sino también en la clínica, siendo indicado como colirio tópico en la clínica oftalmológica para úlceras corneales [114–117] y otras patologías. Así mismo, se ha descrito el uso de la fibrina

como injerto o apósito en el tratamiento adyuvante de pacientes sometidos a cirugía filtrante de glaucoma [118], en diferentes patologías conjuntivales y corneales como las úlceras en la superficie ocular [79,117,119]. Esto es gracias a la compleja composición del PRGF entre los que destacan el EGF, el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), los cuales presentan receptores en las células del epitelio corneal y línico que promueven la proliferación, migración y diferenciación celular del epitelio [114].

Medicamentos de Terapias Avanzadas libres de factores xenogénicos

Las MSC de origen adiposo se expandieron *in vitro* con éxito por el método de explante a partir de la biopsia de grasa subcutánea sin ninguna digestión enzimática previa y en presencia de un medio suplementado solo con PRGF y antibióticos. Las MSC cultivadas cumplieron los criterios mínimos definidos por la ISCT [83]. Las células crecieron adheridas al plástico de cultivo con morfología fibroblástica y alta proliferación ya que alcanzaban en pocos días la confluencia. Los resultados del fenotipado inmunológico fueron consistentes con estudios anteriores [120–122] en los que las MSC de origen adiposo entre el tercer y el quinto pase (o subcultivo) fueron positivas para los principales marcadores específicos asociados a las MSC (CD105, CD73 y CD90) y negativas para los asociados a las células madre hematopoyéticas o a las células endoteliales (CD45, CD34, CD14, CD19 y HLA-DR). Además, mediante el método descrito se obtienen poblaciones celulares homogéneas y por tanto sería posible la estandarización del método de cultivo. Las MSC demostraron su capacidad de diferenciación multilínea, ya que pudieron diferenciarse en adipocitos, produciendo vesículas lipídicas intracelulares; osteocitos, produciendo depósitos de calcio extracelulares; y condrocitos, produciendo glicosaminoglicanos y mucopolisacáridos.

Por otra parte, las OMESC se expandieron *in vitro* con éxito en el medio de cultivo suplementado entre otros componentes con EGF, puesto que uno de los riesgos de los cultivos epiteliales es el probable crecimiento de fibroblastos que pueden llegar a sobrecrecer respecto a las células epiteliales. De esta manera se obtuvieron cultivos epiteliales con mínima o ninguna contaminación de fibroblastos. Las células expandidas *in vitro* presentaron la morfología epitelial esperada (poliédricas, aplanadas, pequeñas y empaquetadas con forma

de adoquín), y fenotípicamente se caracterizaron como células madre epiteliales por la presencia del marcador nuclear P63 que es característico de célula indiferenciada [123] y la expresión de la CK5 característica del epitelio basal de la mucosa oral en el cual se alojan las células más indiferenciadas [124]. Además, las OMESC obtenidas mediante el método descrito, han mostrado similitud fenotípica con las LSC, pues se ha descrito la expresión de P63 y CK5 en el epitelio basal del limbo esclerocorneal donde se localizan las LSC [10].

El implante ocular de MSC se pudo preparar con la metodología descrita, compuesto por una membrana de fibrina de PRGF cubierta por una capa de MSC. Los resultados de IF sobre el implante ocular permitieron observar que las MSC pudieron adherirse a la superficie de las membranas de fibrina de PRGF, manteniendo su morfología (tipo fibroblástica). Estos resultados están en consonancia con otros estudios donde describen el uso de geles de fibrina para trasplantar MSC que posteriormente demostraron potencial para reparar el epitelio corneal [125].

Con composición similar a la del implante ocular de MSC, el implante ocular de OMESC se pudo preparar con la metodología descrita. Los resultados de IF sobre el implante ocular de OMESC muestran que las OMESC se adhirieron a la superficie de las membranas de fibrina de PRGF, manteniendo la morfología epitelial en monocapa. Estos resultados están en consonancia con otros autores [79,126,127], que demostraron que las células madre epiteliales conservan sus características morfológicas, el marcador P63 y las CKs del epitelio, cuando se cultivan sobre fibrina.

Las MSC cuentan en su superficie con receptores del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) que en su forma activa provoca proteólisis pericelular al convertir el plasminógeno en plasmina [128]. En el caso de las OMESC, su actividad fibrinolítica no parece ser tan relevante dada la escasez de estudios acerca de ésta. No obstante, en los trabajos precedentes de Ingeniería Tisular de OMESC cultivada sobre fibrina destaca el empleo de antifibrinolíticos para evitar la degradación de la fibrina [127]. Y según un estudio publicado [129], el activador del plasminógeno tipo tisular (tPA) ha sido detectado en saliva por lo que las células de la mucosa oral podrían contar con un sistema proteolítico que convierte el plasminógeno en plasmina. La plasmina es una proteasa fibrinolítica capaz de digerir la fibrina de la membrana de PRGF que usamos para trasplantar las células. La incorporación del ácido tranexámico en los medios de cultivo inhibe el uPA y tPA para evitar

la digestión de la fibrina que compone las membranas, así como la pérdida de las células que soporta dado que pierden el sustrato al que se adhieren. Gracias al uso de este antifibrinolítico, se prepararon implantes oculares de MSC y de OMESC sobre membranas de fibrina de PRGF íntegras, que se pudieron manipular fácilmente con pinzas y suturas durante los trasplantes.

Viabilidad y respuesta de los MTA

Las MSC y las OMESC se mantuvieron viables tras el trasplante a ratón atímico durante 21 días sin provocar respuestas inflamatorias, migración e hiperplasias, como lo demuestra la tinción de H&E y los estudios de IHQ con anti-Vim y anti-CKhmw. Este hallazgo sugiere que durante 21 días los MTA no provocan respuestas adversas y las células permanecen viables actuando a nivel local. En un estudio similar se describe que las MSC, no son inflamatorias a nivel subcutáneo, sobreviven hasta 12 semanas en la dermis de ratones atímicos y mejoran la regeneración del tejido en comparación con el mismo injerto sin células [130]. En cuanto a los resultados con el implante ocular de OMESC, éstos son coherentes dado que los injertos de mucosa oral son comúnmente empleados en la reconstrucción diversos epitelios [131], por su gran capacidad de reepitelización sin procesos inflamatorios o neoplásicos relevantes reportados, y dando procesos de curación con mínimas cicatrices y caracterizados por la escasa presencia de macrófagos, mastocitos y TGF- β [132].

Eficacia en la regeneración del epitelio corneal

Las MSC y las OMESC trasplantadas sobre membrana amniótica permiten restaurar el epitelio de la córnea mejorando la transparencia en pacientes con LSCD ya instaurada por distintas etiologías y recidivantes con fracaso de los tratamientos y cirugías previas [74,75,77,78]. Sin embargo, los pacientes no acuden normalmente con una pérdida total de la transparencia corneal o una LSCD severa ya instaurada en la primera consulta, sino que acuden con síntomas y signos de una patología ocular aguda (en caso de traumatismo reciente) o crónica en su fase temprana. En estos casos, la primera intención del oftalmólogo es estudiar los síntomas, realizar un diagnóstico diferencial, emitir un diagnóstico principal, tratar la causa y los síntomas aplicando los tratamientos y medios pertinentes para evitar

que el cuadro clínico empeore causando la ceguera del paciente. Es por ello por lo que, en este trabajo, se estudia el tratamiento temprano de las quemaduras químicas alcalinas para evitar la evolución de dicho traumatismo hacia una opacidad corneal por una LSCD grave que cause ceguera.

El modelo animal elegido para el estudio de eficacia fue el conejo por las características y ventajas que ofrece. La córnea del conejo es similar a la córnea humana en cuanto a dimensiones [133] (diámetro en torno a 15 mm horizontalmente y 14 mm verticalmente), morfología histológica [134] (epitelio, membrana basal, estroma, membrana Descemet y endotelio) y fenotipo (expresión del CK3 en córnea). Además, gracias al tamaño del animal, la estabulación y el mantenimiento de los conejos son más sencillas que en otros modelos animales (como, por ejemplo, el cerdo), convirtiéndolo en una de las especies de experimentación animal más comunes en los animalarios de investigación clínica. El inconveniente de usar un modelo animal inmunocompetente para estudiar terapias celulares de origen humano es la incompatibilidad inmunológica entre donante y receptor. Además, esta incompatibilidad se ve agravada si las lesiones se tratan en su fase aguda ya que se caracteriza por presentar grandes procesos inflamatorios y cicatriciales en los cuales podría quedar atrapado el implante ocular [3]. Esto explicaría los resultados obtenidos en las primeras pruebas que realizamos (resultados no mostrados, incluidos en el Anexo III), en las cuales observamos que 2/3 de los conejos tratados con el MTA de MSC humanas y membrana de fibrina de PRGF humano desarrollaron en los primeros días tras recibir el trasplante una LSCD total con conjuntivalización de 360° alcanzando el eje visual y produciendo ceguera en el animal, todo esto a pesar de las características inmunoprivilegiadas de las MSC. Las MSC expandidas *in vitro* se han descrito como hipoinmunogénicas o células supresoras inmunogénicas porque no expresan el HLA de clase II ni moléculas co-estimuladoras como son la CD40, CD80, CD83, CD86 y CD154 [135]. Si bien es cierto que la eficacia de los xenotrasplantes humanos en conejos se ha demostrado con MSC y OMESC humanas, éstas son trasplantadas 3 semanas e incluso meses después de la lesión que puede ser mediante una limbectomía (escisión quirúrgica del limbo) o quemadura química. Durante este tiempo se permite que los procesos inflamatorios y de regeneración del ojo actúen y se estabilicen. En nuestro estudio, el trasplante se realiza una semana después de la lesión, por lo que los ojos estarían en plena fase inflamatoria aguda de

la lesión. Para evitar los resultados falsos-negativos debidos a la incompatibilidad inmunológica entre donante y receptor, se prepararon los MTA con tejidos de conejo (sangre, grasa y oral) para posteriormente tratar los traumatismos corneales por causticación y valorar la regeneración del epitelio corneal.

Durante la preparación de los MTA a partir de tejidos de conejo se sustituyó el tejido de grasa subcutánea infrapatelar humana por tejido adiposo subcutáneo inguinal de conejo, la mucosa oral humana por mucosa oral de conejo, y el PRGF humano como suplemento del cultivo y la membrana de fibrina de PRGF humano por PRGF de conejo y membrana de fibrina de conejo respectivamente. Las MSC [125] y las OMESC [107] de conejo se han descrito homólogas a las humanas y con propiedades similares mediante diversos estudios, pero la sangre de conejo, aunque tiene la misma composición que la sangre humana, los niveles de proteínas y factores son ligeramente diferentes. En especial, los niveles de plaquetas y fibrinógeno son importantes por los beneficios que suponen para nuestros MTA. Las plaquetas, una vez activadas con calcio, son la fuente principal de factores de crecimiento y de regeneración tisular, y el fibrinógeno es la fuente de fibrina que soporta el crecimiento celular *in vitro*. El PRGF humano preparado con Endoret®(PRGF®) tiene una concentración de plaquetas (entre 481 ± 114 y $663 \pm 156 \times 10^6$ plaquetas/mL) [111] moderadamente superior a la fisiológica ($150 - 400 \times 10^6$ plaquetas/mL), y éste ha sido relacionado con beneficios biológicos muy buenos [136]. El rango normal de plaquetas en la sangre de conejo (entre $170 - 1.120 \times 10^6$ plaquetas/mL) [137] es superior al humano, pudiendo concentrarse desde $372 \pm 76 \times 10^6$ plaquetas/mL mediante centrifugación a 1.600 rpm durante 10 min hasta $1.177 \pm 981 \times 10^6$ plaquetas/mL mediante doble centrifugación de la sangre (10 min a 1.600 rpm y 10 min a 2.000 rpm). En este trabajo, el PRGF de conejo se prepara centrifugando una vez a 460 g (que equivale a aproximadamente 1.700 rpm) durante 8 min empleando la centrífuga de BTI, ya que preparar PRGF de conejo mediante doble centrifugación aumentaría excesivamente la concentración de plaquetas respecto al PRGF humano. Además, el método de doble centrifugación no parece muy reproducible si se tiene en cuenta la SD que ofrece el método en un experimento con quince pruebas. Por otra parte, la concentración de fibrinógeno plasmático del conejo depende del sexo y aumenta con la edad del conejo desde $1,23 \pm 0,26$ g/L durante el primer mes de vida hasta $1,66 \pm 0,39$ g/L después de los 6 meses en el caso de los conejos machos [138]. Estas concentraciones son

inferiores a la concentración de fibrinógeno plasmática normal en humanos (2,5-4,5 g/L), lo cual supuso para este trabajo aumentar un 50 % el volumen de plasma usado para preparar las membranas de PRGF de conejo con respecto a las membranas de PRGF humano.

Las MSC de origen adiposo y las OMESC de conejo se expandieron *in vitro* presentando una morfología celular y un fenotipo similares a los observados en sus homólogas humanas. Las MSC crecieron adheridas al plástico de cultivo con morfología fibroblástica y multipotencialidad demostrada a adipocitos, osteocitos y condrocitos. Estos resultados son consistentes con otros autores [139] que han caracterizado MSC de conejo y humanas de manera similar, con morfología fibroblástica y capacidad de diferenciación multilínea *in vitro*, así mismo, estos autores demuestran que las MSC de conejo además de cumplir estas condiciones también expresarían el fenotipo CD105, CD95 y CD73. En este trabajo asumimos que las células expandidas de tejido adiposo de conejo son MSC basándonos en los resultados de caracterización mediante multidiferenciación, ya que los marcadores de superficie celular no han podido ser identificados debido a que los epítomos de las células de conejo no fueron reconocidos (resultados no mostrados, incluidos en el Anexo IV) por los anticuerpos de citometría de flujo que disponíamos. No obstante, la diferenciación multilínea parece ser el método de caracterización más usado para las MSC de distintos orígenes (tisular y especie) en la bibliografía previa. Por otra parte, las OMESC han mostrado morfología tipo epitelial (pequeñas, en adoquín y de núcleo grande) y expresión de los marcadores de célula epitelial basal e indiferenciada de la mucosa oral, CK5 y P63, de manera similar a otros trabajos [107].

Los implantes oculares de conejo mostraron resultados similares a los observados en sus homólogos de componentes humanos. En consonancia con los estudios previos [58,125], las células madre de conejo han mostrado adherencia a la fibrina conservando su morfología celular y alcanzando la confluencia sobre ella en el tiempo estimado y sin fibrinólisis en presencia del ácido tranexámico en el medio de cultivo.

Cabe resaltar que se encontraron algunas limitaciones para preparar los MTA usando tejidos de conejo y en su estudio ulterior, que se abordaron como se describe a continuación. Primero, las células expandidas de la grasa usando PRGF de conejo no se diferenciaron a los tres linajes empleando los medios de inducción adipogénica y osteogénica suplementados con 10 % PRGF y el medio comercial de condrogénesis. Sin embargo, cuando las células se

expandieron usando SBF al 20 % sí cumplieron el criterio de multipotencialidad posteriormente. Se desconoce la razón, pero parece que el efecto del plasma rico en plaquetas sobre la proliferación de las MSC es mayor cuando se usa al 5 - 10 % , pero podría ser importante en la diferenciación *in vitro* condrogénica [140] o endotelial [141]. Los autores de estos estudios sugieren que la compleja composición de moléculas bioactivas y de factores de crecimiento plaquetarios, como el PDGF en el caso de la condrogénesis, y el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) en el caso de la diferenciación endotelial, podrían ser las responsables de estas diferenciaciones. Segundo, la membrana de fibrina de conejo se preparó con un volumen superior de plasma (7,5 mL) a la humana (5 mL) debido a que las membranas preparadas con 5 mL de plasma de conejo eran más pequeñas que las humanas, y, además, más frágiles a la manipulación. Para garantizar obtener membranas lo suficientemente grandes para cubrir toda la córnea en el trasplante y lo suficientemente resistentes, se aumentó un 50 % el volumen de plasma durante su preparación. Creemos que esto se debe a la diferencia de concentración de fibrinógeno plasmática entre conejos y humanos [138]. Por último, la CKhmw (que marca las CKs 1, 5, 10 y 14) empleada durante el estudio de los MTA humanos, no se empleó en el estudio de los MTA de conejo porque es un anticuerpo específico contra epítomos humanos de acuerdo con las indicaciones de especificidad del fabricante. En su lugar se empleó la CK5 para marcar las OMESC tanto *in vitro* sobre el plástico de cultivo como sobre la membrana de fibrina de conejo.

A continuación, se valoró la eficacia de los MTA de conejo en el modelo animal de conejo con traumatismo ocular no mecánico inducido de manera controlada en el quirófano aplicando superficialmente NaOH sobre el epitelio corneal y el limbo, y evitando que el álcali alcanzara el endotelio. El primer paso en el tratamiento de las lesiones oculares químicas fue lavar con abundante solución salina balanceada la córnea para eliminar el NaOH. Después, se aplicó un tratamiento médico con antibióticos, analgésicos y anti-inflamatorios para prevenir infecciones y reducir la inflamación durante la fase aguda (7 días). Simultáneamente, se realizó una tarsorrafia durante los 7 días para favorecer la reepitelización de la córnea.

Se han descrito distintos sistemas de clasificación para predecir el pronóstico de las lesiones en base a su severidad [56,57,142,143]. En este trabajo se empleó la clasificación de Hughes modificada por Roper-Hall [56] (**Tabla 1**) para clasificar el pronóstico de las lesiones antes del tratamiento (post-causticación y pre-trasplante), y cinco parámetros clínicos

seleccionados del espectro de manifestaciones clínicas descrito para las lesiones químicas [142,144,145] para valorar clínicamente las córneas antes y después (post-trasplante) del tratamiento: la integridad epitelial (defectos epiteliales), la neovascularización corneal, el número de penachos fibrovasculares y la opacidad corneal (**Tabla 4**).

La evaluación clínica post-causticación de los conejos mostró que todos ellos presentaron opacidad corneal de 360° y descamación del epitelio que dejó defectos epiteliales importantes. Siete días después de la quemadura química, pre-trasplante, la opacidad corneal y los defectos epiteliales mejoraron ligeramente con el tratamiento aplicado, pero no lo suficiente para recuperar la regularidad del epitelio y su transparencia. Además, se observó el desarrollo de neovasos cortos que entraban en la córnea y de uno o más penachos fibrovasculares cortos a pesar del tratamiento con corticoides y la tarsorrafia. El pronóstico de las lesiones post-causticación y pre-trasplante fue de grado III-IV en la clasificación de Hughes modificada por Roper-Hall que significa mal pronóstico o reservado. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las valoraciones de los conejos de los diferentes grupos de tratamiento, lo cual indica que las características de la quemadura química y su evolución fueron similares en todos los conejos antes de recibir el trasplante.

En este estudio, se estudió la eficacia de la membrana de fibrina de PRGF humano sin células (GCM) que se emplea en los MTA humanos, ya que según estudios previos reduciría la inflamación, vascularización y estimularía la proliferación de las LSC [58,116,118]. Paralelamente, se ha estudiado la eficacia de las células madre, MSC (GMSC) y OMESC (GOMESC), obtenidas de conejos para evitar reacciones inmunológicas tempranas y el rechazo del implante ocular. Estos tres tratamientos se compararon entre ellos y con un grupo control que recibió el tratamiento médico exclusivo (GCTM).

Al final del seguimiento clínico, post-trasplante, se observaron bajo la lámpara de hendidura epitelios estables y regulares, transparentes y con ninguna o mínimas secuelas de vasos remanentes en los conejos trasplantados con MSC y OMESC. Mientras que, en el GCM y el grupo control se observaron epitelios estables, pero sin mejoría o empeoramiento de los signos clínicos (opacidad, neovascularización, defectos epiteliales y penachos fibrovasculares) que evolucionaron hacia una opacidad corneal de moderada a severa y una LSCD parcial o completa que limitó la visión de los conejos, generando ceguera en algunos

casos. Solo un conejo del grupo GMSC mostró alteraciones similares al GCTM en una sección de su córnea de $< 180^\circ$, manteniendo la córnea restante clínicamente normal.

En consonancia con las observaciones clínicas, se observaron las córneas cubiertas por un glicocálix normal (teñido por PAS), seguido de un epitelio escamoso estratificado no queratinizado que presentó el fenotipo corneal (CK3 positivo), con una membrana basal normal (teñida por PAS) y un estroma avascular en el 50 % de los casos de los conejos tratados con MSC, pero con mínimas secuelas de vasos remanentes en el resto de los conejos tratados con MSC y en todos los conejos tratados con OMESC. Mientras que los conejos del GCM y GCTM mostraron córneas heterogéneas, reteniendo la expresión de CK3 en el 60 % de los casos, pero con muchas alteraciones que confirmaron sus signos clínicos patológicos: alteración del número de capas epiteliales, de la membrana basal, del glicocálix y de sus morfologías que afectaron al fenotipo corneal (CK3 negativa y/o CK13 positivo), presencia de células caliciformes teñidas por PAS o marcadas por MUC5AC que indican conjuntivalización clínica (o subclínica en algunos casos), discontinuidad del epitelio que confirma la presencia de úlceras y de los defectos epiteliales teñidos en verde por la fluoresceína, presencia de capas apicales de queratina en los conejos con LSCD severa, queratinización corneal u opacidad corneal severa que afectaron al fenotipo corneal (CK10 positiva) [146], vasos estromales superficiales que se correspondieron con la neovascularización clínica y los penachos fibrovasculares, vasos estromales profundos, y edema e inflamación a nivel del estroma en los ojos más afectados.

Los resultados del GCTM indicarían que el modelo animal empleado es apropiado para nuestro estudio, ya que cumpliría la fisiopatología descrita para lesiones graves [34]. Es decir, el daño corneal es lo suficientemente grave y/o extenso como para ser restaurado mediante los mecanismos propios de la córnea con ayuda del tratamiento médico, pudiendo incluso llegar a estar dañadas las LSC. Esto está en consonancia con estudios previos [147] que demuestran que la lesión del limbo altera la capacidad regenerativa normal de la córnea que acaba desarrollando opacidades densas, neovascularización y termina con una LSCD completa con su correspondiente alteración histológica y de marcadores moleculares.

Los resultados del GCM parecen indicar que la membrana de fibrina de PRGF humano, pese a sus propiedades beneficiosas, no es un tratamiento efectivo para restaura la correcta función de una córnea normal por sí sola. Estos resultados coinciden con los obtenidos para el

trasplante de la membrana de fibrina de conejo en este mismo modelo animal en un estudio realizado previamente por nuestro grupo y con el que ha colaborado esta Tesis [58].

En consonancia con otros estudios, nuestros resultados mostraron que el trasplante de MSC y OMESC son efectivos para tratar lesiones de quemaduras alcalinas. Restaurar la superficie ocular usando células madre no limbares representa un hito alentador dado que permitiría tratar lesiones oculares sin comprometer la salud del ojo sano donante del paciente o del ojo sano del donante vivo emparentado. De acuerdo con un estudio previo publicado [147], los autores estudiaron el trasplante de MSC de médula ósea cultivadas sobre una membrana de amniótica en conejos con LSCD parciales y completas inducidas previamente mediante extirpación quirúrgica del limbo. Los autores observaron que las MSC consiguieron mejorar la neovascularización, la opacidad, los defectos epiteliales y la invasión conjuntival a diferencia del grupo control cuyos signos clínicos patológicos se mantuvieron e incluso progresaron hacia una LSCD completa. Por otra parte, existen numerosos estudios previos [78,105,148] en los que se demuestran que el trasplante directo de tejido de mucosa oral, similar a la técnica SLET, o indirecto de sus OMESC expandidas *in vitro* permiten restablecer la córnea en casos con LSCD establecida, consiguiendo remisión de la vascularización, opacidad y defectos epiteliales. Esto mismo se demostró en tres estudios de casos clínicos [75,77,98] en pacientes con quemadura química, térmica y síndrome de Stevens–Johnson. Otros autores también demuestran que las córneas tratadas con MSC [147] y OMESC [149] mostraron epitelios corneales que conservaron el marcador CK3 característico, mientras que las córneas no tratadas con LSCD no mostraron expresión de CK3 o se observó solo en 1-2 capas del epitelio. Aunque los mecanismos de actuación de las MSC y las OMESC en la córnea aún no son claros, estos resultados parecen apoyar las características de las células madre previamente descritas, que las MSC actúan reduciendo la inflamación y la angiogénesis y potencia la proliferación celular [87–89], mientras que las OMESC favorecen más la reepitelización de las células epiteliales con las que comparte el marcador molecular CK3 [104,105,107]. En nuestro trabajo hemos visto que el MTA de OMESC podría presentar una mayor capacidad de reepitelización corneal para evitar la conjuntivalización, ya que se observaron más casos de córneas con características fenotípicas tanto del epitelio corneal (CK3 positiva) como del epitelio conjuntival (CK13 positiva) en el GMSC que en el GOMESC. Además, se observaron células caliciformes en el epitelio

periférico y un penacho fibrovascular ocupando $< 180^\circ$ en un caso del GMSC y ninguno en el GOMESC. El primer hallazgo sería el más relevante ya que un estudio [150] propone que no existen células epiteliales corneales que expresen CK3 y CK13, sino que la CK13 es expresada específicamente por las células del epitelio conjuntival. De manera que la presencia del marcador CK13 en córnea podría indicar la reepitelización de la córnea a expensas del epitelio conjuntival ante la ausencia de suficientes LSC que lo evite. En el caso del MTA de MSC, éstas podrían presentar mayor capacidad antiangiogénica, ya que, solo en 1/4 de sus casos, frente al 100 % de los casos del GOMESC, se observaron vasos remanentes de pequeño calibre asilados y profundos en el estroma de las córneas no visibles mediante lámpara de hendidura, pero sí con la H&E. Esto se explicaría por la capacidad de las OMESC para disminuir la expresión de factores antiangiogénicos [151,152] que favorecería la neovascularización corneal. De hecho, la neovascularización parece ser uno de los signos más comprometidos tras el tratamiento con OMESC, puesto que la vascularización periférica podría mantenerse [98].

Otro punto que destacar es que parece que la mayoría de los autores estudian la población del LSC después del tratamiento mediante IF usando el marcador P63. Sin embargo, en este trabajo no se contempló porque el mecanismo exacto por el que las MSC y las OMESC restablecen el epitelio corneal es incierto. Hay autores que defienden la transdiferenciación de las MSC en LSC o células epiteliales [125] y otros que apoyan la actividad inmunomoduladora de las MSC para aumentar la población de LSC remanentes tras el daño [87-90]. En el caso de OMESC existen las mismas discrepancias [106,107]. Por ello, este trabajo se centró en la estudiar la restauración del epitelio corneal y sus características más que en estudiar la población de LSC. No obstante, estudiar la población de las LSC tras el tratamiento es un estudio interesante que debería plantearse más adelante. Además, también sería interesante detectar y seguir la migración de las MSC y las OMESC dentro de la superficie ocular tras su trasplante. Para ello sería necesario preparar *in vitro* MSC y OMESC marcadas genéticamente [124,125] para que podamos diferenciarlas de las células del receptor aunque se transdiferencien, estudiarlas en un mayor número de animales y realizar un estudio fenotípico más amplio que incluyan los marcadores de las LSC (como P63, Vim, integrina $\alpha 9\beta 1$, CK 19, 5 y 14, la caderina 342 y el transportador ABC) [10].

10. CONCLUSIONES

- 1-** Se pueden cultivar MSC humanas a partir de grasa usando exclusivamente factores plaquetarios obtenidos a partir del kit Endoret®(PRGF®) como sustituto del SBF.
- 2-** Se pueden cultivar OMESC humanas usando factores plaquetarios obtenidos a partir del kit Endoret®(PRGF®) como sustituto del SBF.
- 3-** Ambas extirpes celulares conservan su viabilidad cuando se cultivan sobre membranas de fibrina de PRGF obtenidas con la tecnología de Endoret®(PRGF®) y se trasplantan en animal atómico.
- 4-** Tanto las MSC como las OMESC son capaces de revertir la evolución natural de una quemadura alcalina en un modelo animal.
- 5-** Se pueden producir Medicamentos de Terapias Avanzadas libres de componentes xenogénicos y completamente autólogos a partir de pequeñas biopsias de mucosa oral o de grasa subcutánea como tratamiento de lesiones de la superficie ocular para prevenir la ceguera por insuficiencia límica.
- 6-** Estos Medicamentos de Terapias Avanzadas autólogos pueden ser una alternativa de tratamiento de la insuficiencia limbar bilateral.

11. HITOS

Desde hace décadas, el plasma sanguíneo ha sido empleado como fuente de factores de crecimiento, fibrinógeno/fibrina, proteínas de adhesión como la fibronectina, enzimas bioactivas como la trombina, entre otras. Muchos de estos derivados plasmáticos son accesibles a través de distintas empresas que los producen y comercializan, y tienen aplicaciones muy interesantes. La principal desventaja de estos productos comerciales son su indudable elevación del costo de la terapia y su origen animal o de mezclas masivas de plasmas humanos donados.

Durante el estudio del plasma sanguíneo en esta Tesis Doctoral, se observó la posibilidad de desarrollar hidrogeles de fibrina de polimerización rápida, con cierta capacidad adhesiva y capaces de albergar células viables en su matriz (Anexo VI). Estos hidrogeles demostraron capacidad regenerativa de heridas dérmicas críticas en un modelo de ratón atómico usando queratinocitos y fibroblastos dérmicos [153]. Posteriormente, se implementó el hidrogel para desarrollar un polímero de fibrina y trombina de origen plasmático, de polimerización instantánea y altamente adhesivo (Anexo VII). Este polímero presenta la composición característica de un pegamento tisular de fibrina (FG) y demostró buena capacidad de adhesión en el autotrasplante de conjuntiva bulbar permitiendo la regeneración de la propia conjuntiva con mínimos o ningún efectos secundarios [154].

Ambos hitos los consideramos relevantes porque se tratan de dos estudios originales publicados y que suponen un avance para las Terapias Avanzadas y Medicina Regenerativa, y en las técnicas de cirugía oftalmológica. Además, la posibilidad de que tanto los hidrogeles polimerizables como los FG se puedan fabricar de manera sencilla, con pocos reactivos y materiales, como tratamientos individualizados y de origen autólogo, los hace altamente costo-efectivos, accesibles y seguros.

A la luz de los resultados de estos dos estudios, se podría seguir implementando los distintos métodos de trasplante de las MSC expandidas, las OMESC expandidas, los MTA de MSC u OMESC y los tejidos estudiados en esta Tesis Doctoral. Las MSC y las OMESC se podría aplicar individualmente cargados en un hidrogel polimerizable. Los MTA de MSC y OMESC desarrollados se podrían trasplantar sobre la córnea reemplazando la sutura por FG [155–157]. Y el tejido de mucosa oral o el propio tejido de limbo (autólogo o alogénico) se podría trasplantar directamente sobre la superficie de la córnea empleando un FG potente en lugar de una membrana y sutura como en la técnica del SLET [158].

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Mannis, M.J.; Holland, E.J. *Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management*; 4th ed.; Elsevier Inc.: Philadelphia, 2017; ISBN 0323357571.
2. Kanski, J.; Bowling, B. *Clinical Ophthalmology. A Systematic Approach*; 8th ed.; Elsevier: Sydney, 2016; ISBN 9781119130536.
3. Reinhard, T.; Larkin, F. *Essentials in Ophthalmology: Cornea and External Eye Disease*; Springer: Berlin, 2006; ISBN 9783540226000.
4. Del Monte, D.W.; Kim, T. Anatomy and Physiology of the Cornea. *J. Cataract Refract. Surg.* **2011**, *37*, 588–598, doi:10.1016/j.jcrs.2010.12.037.
5. Eghrari, A.O.; Riazuddin, S.A.; Gottsch, J.D. Overview of the Cornea: Structure, Function, and Development. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2015**, *134*, 7–23, doi:10.1016/bs.pmbts.2015.04.001.
6. González González, O. Caracterización Electrofisiológica de Las Fibras Sensoriales de La Córnea En Ratones Jóvenes y Envejecidos y Su Papel En La Sensibilidad Ocular, 2019.
7. Müller, L.J.; Marfurt, C.F.; Kruse, F.; Tervo, T.M. Corneal Nerves: Structure, Contents and Function. *Exp. Eye Res.* **2003**, *76*, 521–542, doi:10.1016/S0014-4835(03)00050-2.
8. Rózsa, A.J.; Beuerman, R.W. Density and Organization of Free Nerve Endings in the Corneal Epithelium of the Rabbit. *Pain* **1982**, *14*, 105–120, doi:10.1016/0304-3959(82)90092-6.
9. Aggarwal, S.; Colon, C.; Kheirkhah, A.; Hamrah, P. Efficacy of Autologous Serum Tears for Treatment of Neuropathic Corneal Pain. *Ocul. Surf.* **2019**, *17*, 532–539, doi:10.1016/j.jtos.2019.01.009.
10. Holland, E.J.; Mannis, M.J.; Lee, W.B. *Ocular Surface Disease: Cornea, Conjunctiva and Tear Film*; Philadelphia, 2013; ISBN 9781455728763.
11. Wilson, S.E.; Torricelli, A.A.M.; Marino, G.K. Corneal Epithelial Basement Membrane: Structure, Function and Regeneration. *Exp. Eye Res.* **2020**, *194*, 108002, doi:10.1016/j.exer.2020.108002.

12. Torricelli, A.A.M.; Singh, V.; Santhiago, M.R.; Wilson, S.E. The Corneal Epithelial Basement Membrane: Structure, Function, and Disease. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2013**, *54*, 6390–6400, doi:10.1167/iovs.13-12547.
13. Hughes, R.C. Adhesive Glycoproteins and Receptors. In *New Comprehensive Biochemistry*; Elsevier, 1997; Vol. 29, pp. 507–570.
14. Saikia, P.; Medeiros, C.S.; Thangavavivel, S.; Wilson, S.E. Basement Membranes in the Cornea and Other Organs That Commonly Develop Fibrosis. *Cell Tissue Res.* **2018**, *374*, 439–453, doi:10.1007/s00441-018-2934-7.
15. Barrera, V.; Troughton, L.D.; Iorio, V.; Liu, S.; Oyewole, O.; Sheridan, C.M.; Hamill, K.J. Differential Distribution of Laminin N-Terminus A31 across the Ocular Surface: Implications for Corneal Wound Repair. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2018**, *59*, 4082–4093, doi:10.1167/iovs.18-24037.
16. Medeiros, C.S.; Marino, G.K.; Santhiago, M.R.; Wilson, S.E. The Corneal Basement Membranes and Stromal Fibrosis. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2018**, *59*, 4044–4053, doi:10.1167/iovs.18-24428.
17. Wilson, S.E. Bowman's Layer in the Cornea— Structure and Function and Regeneration. *Exp. Eye Res.* **2020**, *195*, 108033, doi:10.1016/j.exer.2020.108033.
18. Parker, J.; Dockery, P.; Preda-Naumescu, A.; Jager, M.; Van Dijk, K.; Dapena, I.; Melles, G. Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty and Bowman Layer Transplantation: An Anatomic Review and Historical Survey. *Ophthalmic Res.* **2021**, *64*, 532–553, doi:10.1159/000516093.
19. Hassell, J.R.; Birk, D.E. The Molecular Basis of Corneal Transparency. *Exp. Eye Res.* **2010**, *91*, 326–335.
20. Espana, E.M.; Birk, D.E. Composition, Structure and Function of the Corneal Stroma. *Exp. Eye Res.* **2020**, *198*, 108137.
21. Lagali, N. Corneal Stromal Regeneration: Current Status and Future Therapeutic Potential. *Curr. Eye Res.* **2020**, *45*, 278–290, doi:10.1080/02713683.2019.1663874.
22. de Oliveira, R.C.; Wilson, S.E. Descemet's Membrane Development, Structure,

- Function and Regeneration. *Exp. Eye Res.* 2020, 197.
23. Holly, F.J.; Lemp, M.A. Tear Physiology and Dry Eyes. *Surv. Ophthalmol.* **1977**, *22*, 69–87, doi:10.1016/0039-6257(77)90087-X.
 24. Liang, L.; Sheha, H.; Li, J.; Tseng, S.C.G. Limbal Stem Cell Transplantation: New Progresses and Challenges. *Eye* **2009**, *23*, 1946–1953, doi:10.1038/eye.2008.379.
 25. Tseng, S.C.G. Concept and Application of Limbal Stem Cells. *Eye* **1989**, *3*, 141–157, doi:10.1038/eye.1989.22.
 26. Shields, C.L.; Shields, J.A. Tumors of the Conjunctiva and Cornea. *Indian J. Ophthalmol.* **2019**, *67*, 1930–1948, doi:10.4103/ijo.IJO_2040_19.
 27. Dilly, P.N.; Mackie, I.A. Surface Changes in the Anaesthetic Conjunctiva in Man, with Special Reference to the Production of Mucus from a Non-Goblet-Cell Source. *Br. J. Ophthalmol.* **1981**, *65*, 833–842, doi:10.1136/bjo.65.12.833.
 28. Gipson, I.K.; Argüeso, P. Role of Mucins in the Function of the Corneal and Conjunctival Epithelia. *Int. Rev. Cytol.* **2003**, *231*, 1–49, doi:10.1016/S0074-7696(03)31001-0.
 29. Balasopoulou, A.; Kokkinos, P.; Pagoulatos, D.; Plotas, P.; Makri, O.E.; Georgakopoulos, C.D.; Vantarakis, A.; Li, Y.; Liu, J.J.; Qi, P.; et al. Symposium Recent Advances and Challenges in the Management of Retinoblastoma Globe - Saving Treatments. *BMC Ophthalmol.* **2017**, *17*, 1, doi:10.4103/ijo.IJO.
 30. Kuhn, F.; Morris, R.; Witherspoon, C.D.; Heimann, K.; Jeffers, J.B.; Treister, G. A Standardized Classification of Ocular Trauma. *Ophthalmology* **1996**, *103*, 240–243, doi:10.1016/S0161-6420(96)30710-0.
 31. Merle, H.; Gérard, M.; Schrage, N. Brûlures Oculaires. *J. Fr. Ophtalmol.* **2008**, *31*, 723–734, doi:10.1016/S0181-5512(08)74391-2.
 32. Moreno-Arrones Quesada, J.; Merayo-Llodes, J.; Varillas Delgado, D. Ocular Chemical Burns in the Workplace: Epidemiological Characteristics. *Burns* **2020**, *46*, 1212–1218, doi:10.1016/j.burns.2019.11.007.
 33. Bizrah, M.; Yusuf, A.; Ahmad, S. An Update on Chemical Eye Burns. *Eye* 2019, *33*,

1362–1377.

34. Pfister, R.R.; Koski, J. Alkali Burns of the Eye: Pathophysiology and Treatment. *South. Med. J.* **1982**, *75*, 417–422, doi:10.1097/00007611-198204000-00010.
35. Ahmad, S. Concise Review: Limbal Stem Cell Deficiency, Dysfunction, and Distress. *Stem Cells Transl. Med.* **2012**, *1*, 110–115, doi:10.5966/sctm.2011-0037.
36. Rama, P.; Matuska, S.; Paganoni, G.; Spinelli, A.; De Luca, M.; Pellegrini, G. Limbal Stem-Cell Therapy and Long-Term Corneal Regeneration. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 147–155, doi:10.1056/nejmoa0905955.
37. Deng, S.X.; Borderie, V.; Chan, C.C.; Dana, R.; Figueiredo, F.C.; Gomes, J.A.P.; Pellegrini, G.; Shimmura, S.; Kruse, F.E. Global Consensus on Definition, Classification, Diagnosis, and Staging of Limbal Stem Cell Deficiency. *Cornea* **2019**, *38*, 364–375, doi:10.1097/ICO.0000000000001820.
38. Hoskin, A.K.; Watson, S.L.; Mackey, D.A.; Agrawal, R.; Keay, L. Eye Injury Registries – A Systematic Review. *Injury* **2019**, *50*, 1839–1846, doi:10.1016/j.injury.2019.07.019.
39. Iftikhar, M.; Latif, A.; Farid, U.Z.; Usmani, B.; Canner, J.K.; Shah, S.M.A. Changes in the Incidence of Eye Trauma Hospitalizations in the United States from 2001 Through 2014. *JAMA Ophthalmol.* **2019**, *137*, 48–56, doi:10.1001/jamaophthalmol.2018.4685.
40. Vazirani, J.; Nair, D.; Shanbhag, S.; Wurity, S.; Ranjan, A.; Sangwan, V. Limbal Stem Cell Deficiency—Demography and Underlying Causes. *Am. J. Ophthalmol.* **2018**, *188*, 99–103, doi:10.1016/j.ajo.2018.01.020.
41. Wong, T.Y.; Klein, B.E.K.; Klein, R. The Prevalence and 5-Year Incidence of Ocular Trauma: The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* **2000**, *107*, 2196–2202, doi:10.1016/S0161-6420(00)00390-0.
42. McGwin, G.; Hall, T.A.; Xie, A.; Owsley, C. Trends in Eye Injury in the United States, 1992–2001. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2006**, *47*, 521–527, doi:10.1167/iovs.05-0909.

43. Fong, L.P. Eye Injuries in Victoria, Australia. *Med. J. Aust.* **1995**, *162*, doi:10.5694/j.1326-5377.1995.tb138434.x.
44. Yong, G.Y.; Pan, S.W.; Akhter, F.H.; Law, T.N.H.; Toh, T.H. Determinant Factors of Poor Visual Outcome after Ocular Trauma: A Retrospective Study in Central Sarawak, Malaysia. *Asia-Pacific J. Ophthalmol.* **2016**, *5*, 137–142, doi:10.1097/APO.000000000000150.
45. Madhusudhan, P.; Evelyn-Tai, L.M.; Zamri, N.; Adil, H.; Wan-Hazabbah, W.H. Open Globe Injury in Hospital Universiti Sains Malaysia - A 10-Year Review. *Int. J. Ophthalmol.* **2014**, *7*, 486–490, doi:10.3980/j.issn.2222-3959.2014.03.18.
46. Maurya, R.P.; Srivastav, T.; Singh, V.P.; Mishra, C.P.; Al-Mujaini, A. The Epidemiology of Ocular Trauma in Northern India: A Teaching Hospital Study. *Oman J. Ophthalmol.* **2019**, *12*, 78, doi:10.4103/OJO.OJO_149_2018.
47. Park, J.; Yang, S.C.; Choi, H.Y. Epidemiology and Clinical Patterns of Ocular Trauma at a Level 1 Trauma Center in Korea. *J. Korean Med. Sci.* **2021**, *36*, doi:10.3346/jkms.2021.36.e5.
48. Larque-Daza, A.B.; Peralta-Calvo, J.; Lopez-Andrade, J. Epidemiology of Open-Globe Trauma in the Southeast of Spain. *Eur. J. Ophthalmol.* **2010**, *20*, 578–583, doi:10.1177/112067211002000307.
49. Belmonte-Grau, M.; Garrido-Ceca, G.; Marticorena-Álvarez, P. Ocular Trauma in an Urban Spanish Population: Epidemiology and Visual Outcome. *Int. J. Ophthalmol.* **2021**, *14*, 1327–1333, doi:10.18240/ijo.2021.09.06.
50. Teixeira, S.M.; Bastos, R.R.; Falcão, M.S.; Falcão-Reis, F.M.; Rocha-Sousa, A.A. Open-Globe Injuries at an Emergency Department in Porto, Portugal: Clinical Features and Prognostic Factors. *Eur. J. Ophthalmol.* **2014**, *24*, 932–939, doi:10.5301/ejo.5000471.
51. Cillino, S.; Casuccio, A.; Di Pace, F.; Pillitteri, F.; Cillino, G. A Five-Year Retrospective Study of the Epidemiological Characteristics and Visual Outcomes of Patients Hospitalized for Ocular Trauma in a Mediterranean Area. *BMC Ophthalmol.* **2008**, *8*, 1–9, doi:10.1186/1471-2415-8-6.

52. Desai, P.; MacEwen, C.J.; Baines, P.; Minassian, D.C. Incidence of Cases of Ocular Trauma Admitted to Hospital and Incidence of Blinding Outcome. *Br. J. Ophthalmol.* **1996**, *80*, 592–596, doi:10.1136/bjo.80.7.592.
53. Cieza, A.; Keel, S.; Kocur, I.; Mccoy, M.; Paolo Mariotti, S. *Informe Mundial Sobre La Visión [World Report on Vision]*; Ginebra, 2020; Vol. 214; ISBN 978-92-4-000034-6.
54. Gil Hernández, F. Treatise on Occupational Medicine: Legal and Technical Aspects. *Med del Trab* **2012**, *1*.
55. Hughes, W. Alkali Burns of the Eye; Clinical and Pathologic Course. *Arch. Ophthalmol.* **1946**, *36*, 189–214, doi:10.1001/archophth.1946.00890210194005.
56. Roper-Hall, M.J. Thermal and Chemical Burns. *Trans. Ophthalmol. Soc. U. K.* **1965**, *85*, 631–653.
57. Dua, H.S.; King, A.J.; Joseph, A. A New Classification of Ocular Surface Burns. *Br. J. Ophthalmol.* **2001**, *85*, 1379–1383, doi:10.1136/bjo.85.11.1379.
58. Sánchez-Ávila, R.M.; Vázquez, N.; Chacón, M.; Persinal-Medina, M.; Brea-Pastor, A.; Berisa-Prado, S.; Fernández-Vega-cueto, L.; Anitua, E.; Meana, Á.; Merayo-Llodes, J. Fibrin-Plasma Rich in Growth Factors Membrane for the Treatment of a Rabbit Alkali-Burn Lesion. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5564, doi:10.3390/ijms22115564.
59. Ghareeb, A.E.; Lako, M.; Figueiredo, F.C. Recent Advances in Stem Cell Therapy for Limbal Stem Cell Deficiency: A Narrative Review. *Ophthalmol. Ther.* **2020**, *9*, 809–831, doi:10.1007/s40123-020-00305-2.
60. Rao, S.K.; Rajagopal, R.; Sitalakshmi, G.; Padmanabhan, P. Limbal Autografting: Comparison of Results in the Acute and Chronic Phases of Ocular Surface Burns. *Cornea* **1999**, *18*, 164–171, doi:10.1097/00003226-199903000-00004.
61. Dua, H.S.; Azuara-Blanco, A. Autologous Limbal Transplantation in Patients with Unilateral Corneal Stem Cell Deficiency. *Br. J. Ophthalmol.* **2000**, *84*, 273–278, doi:10.1136/bjo.84.3.273.
62. Moldovan, S.M.; Borderie, V.; Baudrimont, M.; Laroche, L. Treatment of Unilateral Limbal Stem Cell Deficiency Syndrome by Limbal Autograft. *J. Fr. Ophtalmol.* **1999**,

- 22, 302–309.
63. Sangwan, V.S.; Basu, S.; MacNeil, S.; Balasubramanian, D. Simple Limbal Epithelial Transplantation (SLET): A Novel Surgical Technique for the Treatment of Unilateral Limbal Stem Cell Deficiency. *Br. J. Ophthalmol.* **2012**, *96*, 931–934, doi:10.1136/bjophthalmol-2011-301164.
 64. Kenyon, K.R.; Tseng, S.C. Limbal Autograft Transplantation for Ocular Surface Disorders. *Ophthalmology* **1989**, *96*, 703–709, doi:10.1016/s0161-6420(89)32833-8.
 65. Daya, S.M.; Ilari, F.A. Living Related Conjunctival Limbal Allograft for the Treatment of Stem Cell Deficiency. *Ophthalmology* **2001**, *108*, 124–126, doi:10.1016/s0161-6420(00)00475-9.
 66. Biber, J.M.; Skeens, H.M.; Neff, K.D.; Holland, E.J. The Cincinnati Procedure: Technique and Outcomes of Combined Living-Related Conjunctival Limbal Allografts and Keratolimbal Allografts in Severe Ocular Surface Failure. *Cornea* **2011**, *30*, 765–771, doi:10.1097/ICO.0b013e318201467c.
 67. Mimouni, M.; Cole, E.; Kim, S.J.; Schiff, J.; Cardella, C.; Tinckam, K.J.; Slomovic, A.R.; Chan, C.C. Outcomes of Keratolimbal Allograft from ABO Compatible Donors for Severe Bilateral Limbal Stem Cell Deficiency. *Ocul. Surf.* **2022**, *27*, 48–53, doi:10.1016/j.jtos.2022.11.002.
 68. Eslani, M.; Haq, Z.; Movahedan, A.; Moss, A.; Baradaran-Rafii, A.; Mogilishetty, G.; Holland, E.J.; Djalilian, A.R. Late Acute Rejection after Allograft Limbal Stem Cell Transplantation: Evidence for Long-Term Donor Survival. *Cornea* **2017**, *36*, 26, doi:10.1097/ICO.0000000000000970.
 69. Holland, E.J.; Djalilian, A.R.; Schwartz, G.S. Management of Aniridic Keratopathy with Keratolimbal Allograft: A Limbal Stem Cell Transplantation Technique. *Ophthalmology* **2003**, *110*, 125–130, doi:10.1016/S0161-6420(02)01451-3.
 70. Krakauer, M.; Welder, J.D.; Pandya, H.K.; Nassiri, N.; Djalilian, A.R. Adverse Effects of Systemic Immunosuppression in Keratolimbal Allograft. *J. Ophthalmol.* **2012**, *2012*, doi:10.1155/2012/576712.
 71. Bakker, A.-C.; Langer, B. Cell-based therapies - an innovative therapeutic option in

- ophthalmology: Treating corneal diseases with stem cells. *Bundesgesundheitsblatt. Gesundheitsforschung. Gesundheitsschutz* **2015**, *58*, 1259–1264, doi:10.1007/s00103-015-2243-1.
72. Holostem Terapie Avanzate SRL Prospecto Holoclar 79.000-316.000 CELULAS/CM2 Equivalente de Tejido Vivo Available online: https://cima.aemps.es/cima/dohtml/p/114987001/P_114987001.html (accessed on 25 October 2021).
73. Rohban, R.; Pieber, T.R. Mesenchymal Stem and Progenitor Cells in Regeneration: Tissue Specificity and Regenerative Potential. *Stem Cells Int.* **2017**, *2017*, doi:10.1155/2017/5173732.
74. Calonge, M.; Pérez, I.; Galindo, S.; Nieto-Miguel, T.; López-Paniagua, M.; Fernández, I.; Alberca, M.; García-Sancho, J.; Sánchez, A.; Herreras, J.M.J.M. A Proof-of-Concept Clinical Trial Using Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Corneal Epithelial Stem Cell Deficiency. *Transl. Res.* **2019**, *206*, 18–40, doi:10.1016/j.trsl.2018.11.003.
75. Nakamura, T.; Inatomi, T.; Sotozono, C.; Amemiya, T.; Kanamura, N.; Kinoshita, S. Transplantation of Cultivated Autologous Oral Mucosal Epithelial Cells in Patients with Severe Ocular Surface Disorders. *Br. J. Ophthalmol.* **2004**, *88*, 1280–1284, doi:10.1136/bjo.2003.038497.
76. Groeger, S.; Meyle, J. Oral Mucosal Epithelial Cells. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1–22, doi:10.3389/fimmu.2019.00208.
77. Sotozono, C.; Inatomi, T.; Nakamura, T.; Koizumi, N.; Yokoi, N.; Ueta, M.; Matsuyama, K.; Kaneda, H.; Fukushima, M.; Kinoshita, S. Cultivated Oral Mucosal Epithelial Transplantation for Persistent Epithelial Defect in Severe Ocular Surface Diseases with Acute Inflammatory Activity. *Acta Ophthalmol.* **2014**, *92*, doi:10.1111/aos.12397.
78. Nishida, K.; Yamato, M.; Hayashida, Y.; Watanabe, K.; Yamamoto, K.; Adachi, E.; Nagai, S.; Kikuchi, A.; Maeda, N.; Watanabe, H.; et al. Corneal Reconstruction with Tissue-Engineered Cell Sheets Composed of Autologous Oral Mucosal Epithelium.

- N. Engl. J. Med.* **2004**, *351*, 1187–1196, doi:10.1056/nejmoa040455.
79. Riestra, A.C.; Vazquez, N.; Chacon, M.; Berisa, S.; Sanchez-Avila, R.M.; Orive, G.; Anitua, E.; Meana, A.; Merayo-Llodes, J. Autologous Method for Ex Vivo Expansion of Human Limbal Epithelial Progenitor Cells Based on Plasma Rich in Growth Factors Technology. *Ocul. Surf.* **2017**, *15*, 248–256, doi:10.1016/j.jtos.2017.01.003.
80. Promprasit, D.; Bumroongkit, K.; Tocharus, C.; Mevatee, U.; Tananuvat, N. Cultivation and Phenotypic Characterization of Rabbit Epithelial Cells Expanded Ex Vivo from Fresh and Cryopreserved Limbal and Oral Mucosal Explants. *Curr. Eye Res.* **2015**, *40*, 274–281, doi:10.3109/02713683.2014.917191.
81. Morino, T.; Takagi, R.; Yamamoto, K.; Kojima, H.; Yamato, M. Explant Culture of Oral Mucosal Epithelial Cells for Fabricating Transplantable Epithelial Cell Sheet. *Regen. Ther.* **2019**, *10*, 36–45, doi:10.1016/j.reth.2018.10.006.
82. Odabas, S.; Eser, A.; Murat, Y. Isolation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells. *Bone Marrow Stem Cell Transplant.* **2014**, *1109*, 47–63, doi:10.1007/978-1-4614-9437-9.
83. Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.C.; Krause, D.S.; Deans, R.J.; Keating, A.; Prockop, D.J.; Horwitz, E.M. Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy* **2006**, *8*, 315–317, doi:10.1080/14653240600855905.
84. Kolli, S.; Ahmad, S.; Mudhar, H.S.; Meeny, A.; Lako, M.; Figueiredo, F.C. Successful Application of Ex Vivo Expanded Human Autologous Oral Mucosal Epithelium for the Treatment of Total Bilateral Limbal Stem Cell Deficiency. *Stem Cells* **2014**, *32*, 2135–2146, doi:10.1002/stem.1694.
85. Klifto, K.M.; Elhelali, A.; Gurno, C.F.; Seal, S.M.; Asif, M.; Hultman, C.S. Acute Surgical vs Non-Surgical Management for Ocular and Peri-Ocular Burns: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Burn. Trauma* **2019**, *7*, doi:10.1186/s41038-019-0161-4.
86. Simonacci, F.; Bertozzi, N.; Grieco, M.; Raposio, E. Stem Cells Derived from Adipose

- Tissue: Possible Uses and Clinical Applications. *Gazz. Medica Ital. Arch. per le Sci. Mediche* **2018**, *177*, 311–323, doi:10.23736/S0393-3660.17.03606-3.
87. Ahmed, S.K.; Soliman, A.A.; Omar, S.M.M.; Mohammed, W.R. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation in a Rabbit Corneal Alkali Burn Model (A Histological and Immune Histo-Chemical Study). *Int. J. stem cells* **2015**, *8*, 69–78, doi:10.15283/ijsc.2015.8.1.69.
88. Ma, Y.; Xu, Y.; Xiao, Z.; Yang, W.; Zhang, C.; Song, E.; Du, Y.; Li, L. Reconstruction of Chemically Burned Rat Corneal Surface by Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* **2006**, *24*, 315–321, doi:10.1634/stemcells.2005-0046.
89. Oh, J.Y.; Kim, M.K.; Shin, M.S.; Lee, H.J.; Ko, J.H.; Wee, W.R.; Lee, J.H. The Anti-Inflammatory and Anti-Angiogenic Role of Mesenchymal Stem Cells in Corneal Wound Healing Following Chemical Injury. *Stem Cells* **2008**, *26*, 1047–1055, doi:10.1634/stemcells.2007-0737.
90. Sahu, A.; Foulsham, W.; Amouzegar, A.; Mittal, S.K.; Chauhan, S.K. The Therapeutic Application of Mesenchymal Stem Cells at the Ocular Surface. *Ocul. Surf.* **2019**, *17*, 198–207, doi:10.1016/j.jtos.2019.01.006.
91. Arnalich-Montiel, F.; Pastor, S.; Blazquez-Martinez, A.; Fernandez-Delgado, J.; Nistal, M.; Alio, J.L.; De Miguel, M.P. Adipose-Derived Stem Cells Are a Source for Cell Therapy of the Corneal Stroma. *Stem Cells* **2008**, *26*, 570–579, doi:10.1634/stemcells.2007-0653.
92. Zeppieri, M.; Salvetat, M.L.; Beltrami, A.; Cesselli, D.; Russo, R.; Alcalde, I.; Merayo-Llodes, J.; Brusini, P.; Parodi, P.C. Adipose Derived Stem Cells for Corneal Wound Healing after Laser Induced Corneal Lesions in Mice. *J. Clin. Med.* **2017**, *6*, 115, doi:10.3390/jcm6120115.
93. Xu, L.; Liu, Y.; Sun, Y.; Wang, B.; Xiong, Y.; Lin, W.; Wei, Q.; Wang, H.; He, W.; Wang, B.; et al. Tissue Source Determines the Differentiation Potentials of Mesenchymal Stem Cells: A Comparative Study of Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow and Adipose Tissue. *Stem Cell Res. Ther.* **2017**, *8*, 1–11,

- doi:10.1186/s13287-017-0716-x.
94. Izadpanah, R.; Trygg, C.; Patel, B.; Kriedt, C.; Dufour, J.; Gimble, J.M.; Bunnell, B.A. Biologic Properties of Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow and Adipose Tissue. *J. Cell. Biochem.* **2006**, *99*, 1285–1297, doi:10.1002/jcb.20904.
 95. Kern, S.; Eichler, H.; Stoeve, J.; Klüter, H.; Bieback, K. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem ce* **2006**, *24*, 1294–1301, doi:10.1634/stemcells.2005-0342.
 96. Elman, J.S.; Li, M.; Wang, F.; Gimble, J.M.; Parekkadan, B. A Comparison of Adipose and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cell Secreted Factors in the Treatment of Systemic Inflammation. *J. Inflammation-London* **2014**, *11*, 1, doi:10.1186/1476-9255-11-1.
 97. Rasmussen, J.G.; Frøbert, O.; Holst-Hansen, C.; Kastrop, J.; Baandrup, U.; Zachar, V.; Fink, T.; Simonsen, U. Comparison of Human Adipose-Derived Stem Cells and Bone Marrow-Derived Stem Cells in a Myocardial Infarction Model. *Cell Transplant.* **2014**, *23*, 195–206, doi:10.3727/096368912X659871.
 98. Inatomi, T.; Nakamura, T.; Koizumi, N.; Sotozono, C.; Yokoi, N.; Kinoshita, S. Midterm Results on Ocular Surface Reconstruction Using Cultivated Autologous Oral Mucosal Epithelial Transplantation. *Am. J. Ophthalmol.* **2006**, *141*, 267–276, doi:10.1016/j.ajo.2005.09.003.
 99. Mai, C.; Bertelmann, E. Oral Mucosal Grafts: Old Technique in New Light. *Ophthalmic Res.* **2013**, *50*, 91–98, doi:10.1159/000351631.
 100. Kerr, T.; Mancini, R. Shared Buccal Mucosal Graft for Simultaneous Repair of Severe Upper and Lower Eyelid Cicatricial Entropion. *Orbit* **2016**, *35*, 24–28, doi:10.3109/01676880.2015.1099693.
 101. Martinez-Osorio, H.; Schellini, S.A.; Marin-Muñoz, L.S. Long-Term Follow up of Oral Mucosa Autograft Sutured to the Sclera in Severe Symblepharon. *Am. J. Ophthalmol. case reports* **2021**, *23*, 101099, doi:10.1016/J.AJOC.2021.101099.
 102. Venugopal, R.; Nagpal, R.; Mohanty, S.; Sen, S.; Kashyap, S.; Agarwal, T.; Maharana, P.K.; Vajpayee, R.B.; Sharma, N. Outcomes of Cultivated Oral Mucosal Epithelial

- Transplantation in Eyes With Chronic Stevens-Johnson Syndrome Sequelae. *Am. J. Ophthalmol.* **2021**, *222*, 82–91, doi:10.1016/j.ajo.2020.08.022.
103. Tay, A.B.G.; Tan, D.T.H.; Lye, K.W.; Theng, J.; Parthasarathy, A.; Por, Y.M. Osteo-Odonto-Keratoprosthesis Surgery: A Combined Ocular-Oral Procedure for Ocular Blindness. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2007**, *36*, 807–813, doi:10.1016/j.ijom.2007.04.009.
104. Nakamura, T.; Endo, K.I.; Cooper, L.J.; Fullwood, N.J.; Tanifuji, N.; Tsuzuki, M.; Koizumi, N.; Inatomi, T.; Sano, Y.; Kinoshita, S. The Successful Culture and Autologous Transplantation of Rabbit Oral Mucosal Epithelial Cells on Amniotic Membrane. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2003**, *44*, 106–116, doi:10.1167/iovs.02-0195.
105. Burillon, C.; Huot, L.; Justin, V.; Nataf, S.; Chapuis, F.; Decullier, E.; Damour, O. Cultured Autologous Oral Mucosal Epithelial Cell Sheet (CAOMECS) Transplantation for the Treatment of Corneal Limbal Epithelial Stem Cell Deficiency. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2012**, *53*, 1325–1331, doi:10.1167/iovs.11-7744.
106. Utheim, T.P. Concise Review: Transplantation of Cultured Oral Mucosal Epithelial Cells for Treating Limbal Stem Cell Deficiency - Current Status and Future Perspectives. *Stem Cells* **2015**, *33*, 1685–1695, doi:10.1002/stem.1999.
107. Sugiyama, H.; Yamato, M.; Nishida, K.; Okano, T. Evidence of the Survival of Ectopically Transplanted Oral Mucosal Epithelial Stem Cells after Repeated Wounding of Cornea. *Mol. Ther.* **2014**, *22*, 1544–1555, doi:10.1038/mt.2014.69.
108. Halme, D.G.; Kessler, D.A. FDA Regulation of Stem-Cell-Based Therapies. *Bost. Med. Surg. J.* **2006**, *355*, 1730–1735, doi:10.1056/NEJMHpr063086.
109. Anitua, E. Plasma Rich in Growth Factors: Preliminary Results of Use in the Preparation of Future Sites for Implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **1999**, *14*, 529–535.
110. Merayo-Llodes, J.; Sanchez-Ávila, R.M.; Riestra, A.C.; Anitua, E.; Begoña, L.; Orive, G.; Fernandez-Vega, L. Autologous Plasma Rich in Growth Factors Eyedrops in

- Refractory Cases of Ocular Surface Disorders. *Ophthalmic Res.* **2016**, *55*, 53–61, doi:10.1159/000439280.
111. Anitua, E.; Muruzabal, F.; Alcalde, I.; Merayo-Llodes, J.; Orive, G. Plasma Rich in Growth Factors (PRGF-Endoret) Stimulates Corneal Wound Healing and Reduces Haze Formation after PRK Surgery. *Exp. Eye Res.* **2013**, *115*, 153–161, doi:10.1016/j.exer.2013.07.007.
112. Hemeda, H.; Giebel, B.; Wagner, W. Evaluation of Human Platelet Lysate versus Fetal Bovine Serum for Culture of Mesenchymal Stromal Cells. *Cytotherapy* 2014, *16*, 170–180.
113. Anitua, E.; de la Fuente, M.; Muruzabal, F.; Riestra, A.; Merayo-Llodes, J.; Orive, G. Plasma Rich in Growth Factors (PRGF) Eye Drops Stimulates Scarless Regeneration Compared to Autologous Serum in the Ocular Surface Stromal Fibroblasts. *Exp. Eye Res.* **2015**, *135*, 118–126, doi:10.1016/j.exer.2015.02.016.
114. Riestra, A.C. Plasma Rico En Factores de Crecimiento. Desarrollo y Estandarización de Su Aplicación Por Vía Oftálmica., 2016.
115. You, J.; Hodge, C.; Hoque, M.; Petsoglou, C.; Sutton, G. Human Platelets and Derived Products in Treating Ocular Surface Diseases – a Systematic Review. *Clin. Ophthalmol.* **2020**, *14*, 3195–3210, doi:10.2147/OPTH.S265701.
116. Sanchez-Avila, R.M.; Merayo-Llodes, J.; Riestra, A.C.; Berisa, S.; Lisa, C.; Sánchez, J.A.; Muruzabal, F.; Orive, G.; Anitua, E. Plasma Rich in Growth Factors Membrane as Adjuvant Treatment in the Surgery of Ocular Surface Disorders. *Medicine (Baltimore)*. **2018**, *97*, e0242, doi:10.1097/MD.0000000000010242.
117. Sanchez-Ávila, R.M.; Merayo-Llodes, J.; Riestra, A.C.; Anitua, E.; Muruzabal, F.; Orive, G.; Fernández-Vega, L. The Effect of Immunologically Safe Plasma Rich in Growth Factor Eye Drops in Patients with Sjögren Syndrome. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **2017**, *33*, 391–399, doi:10.1089/jop.2016.0166.
118. Rodríguez-Agirretxe, I.; Freire, V.; Muruzabal, F.; Orive, G.; Anitua, E.; Díez-Feijóo, E.; Acera, A. Subconjunctival PRGF Fibrin Membrane as an Adjuvant to Nonpenetrating Deep Sclerectomy: A 2-Year Pilot Study. *Ophthalmic Res.* **2017**, *59*,

- 45–52, doi:10.1159/000481535.
119. Merayo-Llodes, J.; Sanchez-Avila, R.M.; Riestra, A.C.; Anitua, E.; Begoña, L.; Orive, G.; Fernandez-Vega, L. Safety and Efficacy of Autologous Plasma Rich in Growth Factors Eye Drops for the Treatment of Evaporative Dry Eye. *Ophthalmic Res.* **2016**, *56*, 68–73, doi:10.1159/000444496.
120. Cowper, M.; Frazier, T.; Wu, X.; Curley, J.L.; Ma, M.H.; Mohiuddin, O.A.; Dietrich, M.; McCarthy, M.; Bukowska, J.; Gimble, J.M. Human Platelet Lysate as a Functional Substitute for Fetal Bovine Serum in the Culture of Human Adipose Derived Stromal/Stem Cells. *Cells* **2019**, *8*, 724, doi:10.3390/cells8070724.
121. Lensch, M.; Muise, A.; White, L.; Badowski, M.; Harris, D. Comparison of Synthetic Media Designed for Expansion of Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Biomedicines* **2018**, *6*, 1–7, doi:10.3390/biomedicines6020054.
122. Zeppieri, M.; Salvetat, M.L.; Beltrami, A.P.; Cesselli, D.; Bergamin, N.; Russo, R.; Cavaliere, F.; Varano, G.P.; Alcalde, I.; Merayo, J.; et al. Human Adipose-Derived Stem Cells for the Treatment of Chemically Burned Rat Cornea: Preliminary Results. *Curr. Eye Res.* **2013**, *38*, 451–463, doi:10.3109/02713683.2012.763100.
123. Pellegrini, G.; Dellambra, E.; Golisano, O.; Martinelli, E.; Fantozzi, I.; Bondanza, S.; Ponzin, D.; McKeon, F.; De Luca, M. P63 Identifies Keratinocyte Stem Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 3156–3161, doi:10.1073/pnas.061032098.
124. Lauer, G.; Siegmund, C.; Hübner, U. Influence of Donor Age and Culture Conditions on Tissue Engineering of Mucosa Autografts. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2003**, *32*, 305–312, doi:10.1054/ijom.2002.0333.
125. Gu S, Xing C, Han J, Tso MO, H.J. Differentiation of Rabbit Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Corneal Epithelial Cells in Vivo and Ex Vivo. *Mol Vis* **2009**, *15*, 99–107.
126. Llames, S.G.; Del Rio, M.; Larcher, F.; García, E.; Escamez, M.J.; Jorcano, J.L.; Holguín, P.; Meana, A. Human Plasma as a Dermal Scaffold for the Generation of a Completely Autologous Bioengineered Skin. *Transplantation* **2004**, *77*, 350–355, doi:10.1097/01.TP.0000112381.80964.85.

127. Sheth, R.; Neale, M.H.; Shortt, A.J.; Massie, I.; Vernon, A.J.; Daniels, J.T. Culture and Characterization of Oral Mucosal Epithelial Cells on a Fibrin Gel for Ocular Surface Reconstruction. *Curr. Eye Res.* **2015**, *40*, 1077–1087, doi:10.3109/02713683.2014.978477.
128. Heissig, B.; Dhahri, D.; Eiamboonsert, S.; Salama, Y.; Shimazu, H.; Munakata, S.; Hattori, K. Role of Mesenchymal Stem Cell-Derived Fibrinolytic Factor in Tissue Regeneration and Cancer Progression. *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72*, 4759–4770, doi:10.1007/s00018-015-2035-7.
129. Sindet-Pedersen, S.; Gram, J.; Jespersen, J. The Possible Role of Oral Epithelial Cells in Tissue-Type Plasminogen Activator-Related Fibrinolysis in Human Saliva. *J. Dent. Res.* **1990**, *69*, 1283–1286, doi:10.1177/00220345900690061201.
130. Hung, M.J.; Wen, M.C.; Huang, Y.T.; Chen, G. Den; Chou, M.M.; Yang, V.C. Fascia Tissue Engineering with Human Adipose-Derived Stem Cells in a Murine Model: Implications for Pelvic Floor Reconstruction. *J. Formos. Med. Assoc.* **2014**, *113*, 704–715, doi:10.1016/j.jfma.2013.04.017.
131. Kasai, Y.; Takagi, R.; Kobayashi, S.; Owaki, T.; Yamaguchi, N.; Fukuda, H.; Sakai, Y.; Sumita, Y.; Kanai, N.; Isomoto, H.; et al. A Stable Protocol for the Fabrication of Transplantable Human Oral Mucosal Epithelial Cell Sheets for Clinical Application. *Regen. Ther.* **2020**, *14*, 87–94, doi:10.1016/j.reth.2019.11.007.
132. Mak, K.; Manji, A.; Gallant-Behm, C.; Wiebe, C.; Hart, D.A.; Larjava, H.; Häkkinen, L. Scarless Healing of Oral Mucosa Is Characterized by Faster Resolution of Inflammation and Control of Myofibroblast Action Compared to Skin Wounds in the Red Duroc Pig Model. *J. Dermatol. Sci.* **2009**, *56*, 168–180, doi:10.1016/j.jdermsci.2009.09.005.
133. Andrew, S.E. Corneal Diseases of Rabbits. *Vet. Clin. North Am. - Exot. Anim. Pract.* **2002**, *5*, 341–356, doi:10.1016/S1094-9194(01)00003-2.
134. Matsubara, M.; Kamei, Y.; Takeda, S.; Mukai, K.; Ishii, Y.; Ito, S. Histologic and Histochemical Changes in Rabbit Cornea Produced by an Orthokeratology Lens. *Eye Contact Lens* **2004**, *30*, 198–204, doi:10.1097/01.ICL.0000143635.74169.42.

135. Naji, A.; Eitoku, M.; Favier, B.; Deschaseaux, F.; Rouas-Freiss, N.; Suganuma, N. Biological Functions of Mesenchymal Stem Cells and Clinical Implications. *Cell. Mol. Life Sci.* **2019**, *76*, 3323–3348, doi:10.1007/s00018-019-03125-1.
136. Anitua, E.; Muruzabal, F.; Tayebba, A.; Riestra, A.; Perez, V.L.; Merayo-Llodes, J.; Orive, G. Autologous Serum and Plasma Rich in Growth Factors in Ophthalmology: Preclinical and Clinical Studies. *Acta Ophthalmol.* **2015**, *93*, e605–e614.
137. Jenkins, J.R. Rabbit Diagnostic Testing. *J. Exot. Pet Med.* **2008**, *17*, 4–15, doi:10.1053/j.jepm.2007.12.003.
138. Petrova, Y.; Petrov, V.; Georgieva, T.M.; Ceciliani, F. Blood Fibrinogen Concentrations in New Zealand White Rabbits during the First Year of Life. *Bulg. J. Vet. Med.* **2018**, *21*, 286–291, doi:10.15547/bjvm.1064.
139. Tan, S.L.; Ahmad, T.S.; Selvaratnam, L.; Kamarul, T. Isolation, Characterization and the Multi-Lineage Differentiation Potential of Rabbit Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *J. Anat.* **2013**, *222*, 437–450, doi:10.1111/joa.12032.
140. Mohammadi, S.; Nikbakht, M.; Mohammadi, A.M.; Panah, M.Z.; Ostadali, M.R.; Nasiri, H.; Ghavamzadeh, A. Human Platelet Lysate as a Xeno Free Alternative of Fetal Bovine Serum for the in Vitro Expansion of Human Mesenchymal Stromal Cells. *Int. J. Hematol. Stem Cell Res.* **2016**, *10*, 161–171.
141. Tancharoen, W.; Aungsuchawan, S.; Markmee, R.; Narakornsak, S.; Pothacharoen, P. The Effects of Human Platelet Lysate versus Commercial Endothelial Growth Medium on the Endothelial Differentiation Potential of Human Amniotic Fluid Mesenchymal Stem Cells. *Heliyon* **2020**, *6*, doi:10.1016/j.heliyon.2020.e04873.
142. Ono, K.; Yokoo, S.; Mimura, T.; Usui, T.; Miyata, K.; Araie, M.; Yamagami, S.; Amano, S. Autologous Transplantation of Conjunctival Epithelial Cells Cultured on Amniotic Membrane in a Rabbit Model. *Mol. Vis.* **2007**, *13*, 1138–1143.
143. Pfister RR Chemical Injuries of the Eye. *Ophthalmology* **1983**, *90*, 1246–1253.
144. Eslani, M.; Baradaran-Rafii, A.; Movahedan, A.; Djalilian, A.R. The Ocular Surface Chemical Burns. *J. Ophthalmol.* **2014**, *2014*, doi:10.1155/2014/196827.

145. Ang, A.Y.; Chan, C.C.; Biber, J.M.; Holland, E.J. Ocular Surface Stem Cell Transplantation Rejection: Incidence, Characteristics, and Outcomes. *Cornea* **2013**, *32*, 229–236, doi:10.1097/ICO.0b013e318255eac4.
146. Matsuda, A.; Tagawa, Y.; Matsuda, H. Cytokeratin and Proliferative Cell Nuclear Antigen Expression in Superior Limbic Keratoconjunctivitis. *Curr. Eye Res.* **1996**, *15*, 1033–1038, doi:10.3109/02713689609017652.
147. Galindo, S.; Herreras, J.M.; López-Paniagua, M.; Rey, E.; de la Mata, A.; Plata-Cordero, M.; Calonge, M.; Nieto-Miguel, T. Therapeutic Effect of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Experimental Corneal Failure Due to Limbal Stem Cell Niche Damage. *Stem Cells* **2017**, *35*, 2160–2174, doi:10.1002/stem.2672.
148. Ma, D.H.K.; Kuo, M.T.; Tsai, Y.J.; Chen, H.C.J.; Chen, X.L.; Wang, S.F.; Li, L.; Hsiao, C.H.; Lin, K.K. Transplantation of Cultivated Oral Mucosal Epithelial Cells for Severe Corneal Burn. *Eye* **2009**, *23*, 1442–1450, doi:10.1038/eye.2009.60.
149. Tananuvat, N.; Bumroongkit, K.; Tocharusa, C.; Mevatee, U.; Kongkaew, A.; Ausayakhun, S. Limbal Stem Cell and Oral Mucosal Epithelial Transplantation from Ex Vivo Cultivation in LSCD-Induced Rabbits: Histology and Immunologic Study of the Transplant Epithelial Sheet. *Int. Ophthalmol.* **2017**, *37*, 1289–1298, doi:10.1007/s10792-016-0402-5.
150. Ramirez-Miranda, A.; Nakatsu, M.N.; Zarei-Ghanavati, S.; Nguyen, C. V.; Deng, S.X. Keratin 13 Is a More Specific Marker of Conjunctival Epithelium than Keratin 19. *Mol. Vis.* **2011**, *17*, 1652–1661, doi:10.22038/ijp.2014.2656.
151. Kanayama, S.; Nishida, K.; Yamato, M.; Hayashi, R.; Sugiyama, H.; Soma, T.; Maeda, N.; Okano, T.; Tano, Y. Analysis of Angiogenesis Induced by Cultured Corneal and Oral Mucosal Epithelial Cell Sheets in Vitro. *Exp. Eye Res.* **2007**, *85*, 772–781, doi:10.1016/j.exer.2007.08.011.
152. Sekiyama, E.; Nakamura, T.; Kawasaki, S.; Sogabe, H.; Kinoshita, S. Different Expression of Angiogenesis-Related Factors between Human Cultivated Corneal and Oral Epithelial Sheets. *Exp. Eye Res.* **2006**, *83*, 741–746,

- doi:10.1016/j.exer.2006.02.015.
153. Persinal-Medina, M.; Llamas, S.; Chacón, M.; Vázquez, N.; Pevida, M.; Alcalde, I.; Alonso-alonso, S.; Martínez-lópez, L.M.; Merayo-lloves, J.; Meana, Á. Polymerizable Skin Hydrogel for Full Thickness Wound Healing. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1–14, doi:10.3390/ijms23094837.
154. Fernández-Vega-Cueto, L.; Persinal-Medina, M.; Vázquez, N.; Chacón, M.; Alfonso-Bartolozzi, B.; Alonso-Alonso, S.; Sánchez, T.; Berisa-Prado, S.; Martínez-López, L.M.; Merayo-Lloves, J.; et al. A Simple, Safe, and Effective Method for Preparing Autologous Bio-Based Fibrin Glue for Ophthalmic Use. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1–12, doi:10.3390/pharmaceutics14112325.
155. Szurman, P.; Warga, M.; Grisanti, S.; Roters, S.; Rohrbach, J.M.; Aisenbrey, S.; Kaczmarek, R.T.; Bartz-Schmidt, K.U. Sutureless Amniotic Membrane Fixation Using Fibrin Glue for Ocular Surface Reconstruction in a Rabbit Model. *Cornea* **2006**, *25*, 460–466, doi:10.1097/01.ico.0000183493.00884.8f.
156. Sekiyama, E.; Nakamura, T.; Kurihara, E.; Cooper, L.J.; Fullwood, N.J.; Takaoka, M.; Hamuro, J.; Kinoshita, S. Novel Sutureless Transplantation of Bioadhesive-Coated, Freeze-Dried Amniotic Membrane for Ocular Surface Reconstruction. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2007**, *48*, 1528–1534, doi:10.1167/iovs.06-1104.
157. Higa, K.; Shimmura, S.; Kato, N.; Kawakita, T.; Miyashita, H.; Itabashi, Y.; Fukuda, K.; Shimazaki, J.; Tsubota, K. Proliferation and Differentiation of Transplantable Rabbit Epithelial Sheets Engineered with or without an Amniotic Membrane Carrier. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2007**, *48*, 597–604, doi:10.1167/iovs.06-0664.
158. Inamochi, A.; Tomioka, A.; Kitamoto, K.; Miyai, T.; Usui, T.; Aihara, M.; Yamagami, S. Simple Oral Mucosal Epithelial Transplantation in a Rabbit Model. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–11, doi:10.1038/s41598-019-54571-7.

13. ANEXOS

	<h2>CONSENTIMIENTO INFORMADO EXTRACCIÓN SANGRE PARA INVESTIGACIÓN</h2> <p>LEY 41/2002, BÁSICA REGULADORA DE LA AUTONOMÍA DEL PACIENTE Y DE DERECHOS Y OBLIGACIONES EN MATERIA DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN CLÍNICA (BOE 15-11-02)</p>
---	---

Nombre y apellidos del paciente

D.N.I. e historia

Nombre del médico/enfermero que le informa

 Fecha

Usted ha sido invitado a participar en extracción de sangre para investigación.

El fin último de este estudio es poder conocer los efectos del PRGF en diversas patologías. Este estudio está promovido por el Instituto Oftalmológico Fernández-Vega y su Fundación de Investigación Oftalmológica. Su decisión de participar es totalmente voluntaria y tendrá todo el tiempo que necesite para decidir si quiere donar sangre o no. Si decide no participar en este estudio esto no influirá negativamente de ningún modo en su futura asistencia médica. Si usted accede voluntariamente a donar sangre deberá firmar el formulario de **Consentimiento Informado**. La donación de muestra no implica visitas extraordinarias, ni exploraciones complementarias y en ningún caso la recogida de las muestras entrañará riesgo alguno para usted ni impedirá el diagnóstico y tratamiento de su enfermedad.

RIESGOS E INCONVENIENTES

La participación en este estudio de investigación no supone ningún riesgo para usted.

BENEFICIOS

Al tratarse de un estudio experimental, no va a obtener un beneficio directo por su participación en el estudio más que el que corresponde al avance de la medicina en beneficio de la sociedad y el saber que ha colaborado en este proceso. La información obtenida en este estudio puede ayudarle a usted y/o otras personas con dolor ocular o patología de la

superficie ocular en el futuro. En concreto a crear nuevas terapias para el tratamiento del déficit límbico.

La participación no tiene ninguna compensación económica y será de forma voluntaria y altruista. En ningún caso representará una carga económica para usted.

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

En cualquier momento podrá Vd. revocar el consentimiento. Se romperá irreversiblemente todo vínculo que permita relacionar los datos almacenados con Vd. No obstante, los efectos de la revocación no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que se hayan llevado a cabo previamente a la misma.

CONFIDENCIALIDAD

En ningún caso los datos personales serán dados a conocer ni puestos a disposición de terceros. Los datos recogidos pueden ser utilizados en el futuro en otros estudios o publicaciones (sin revelar su identidad), pudiendo ser cedidos y tratados conforme al Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 de Protección de Datos (RGPD), en relación con la finalidad prevista y la legislación aplicables en vigor. Dichos datos podrán ser comunicados a investigadores participantes o autoridades para fines directamente relacionados con el desarrollo del estudio. Vd. podrá ejercer previa acreditación de identidad, sus derechos de información, oposición, acceso, rectificación o cancelación de los datos ó dirigiéndose al investigador, el cual lo pondrá en conocimiento de responsable del fichero.

Se le garantiza la absoluta confidencialidad en la información obtenida y manejo de los datos a terceros según la Ley 14/2007 de investigación biomédica, reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica.

Salvo comunicación de lo contrario, se entiende que presta su consentimiento para el tratamiento de sus datos aquí vertidos, conforme a la Ley 14/2007 de investigación biomédica. Los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición puede ejercerlos ante el Instituto Oftalmológico Fernández-Vega

En a de

Firmado:

GOBIERNO DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS
CONSEJERÍA DE DESARROLLO RURAL Y RECURSOS NATURALES

RESOLUCIÓN de 16 de mayo de 2019, de la
Consejería de Desarrollo Rural y Recursos
Naturales, sobre autorización de proyectos
de investigación que utilicen animales de
experimentación.

PROAE 21/2019

Servicio de Sanidad y Producción Animal

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

CIF: Q3318001I

RESOLUCIÓN

ANTECEDENTES DE HECHO

Primero.- Con fecha 1 de abril de 2019, **JOSE RAMÓN OBESO SUÁREZ** en representación del **BIOTERIO DE LA UNIVERSIDAD DE OVIEDO**, presentó solicitud de autorización para la utilización de animales en el siguiente proyecto de experimentación **"AUTOCELL: DESARROLLO DE UN SISTEMA DE CULTIVO AUTÓLOGO PARA EL TRATAMIENTO DE LA INSUFICIENCIA LÍMBICA BILATERAL"**, constando como investigador principal D. **JESÚS MERAYO LLOVES** y como investigador responsable de los procedimientos con animales D. **ÁLVARO MEANA INFIESTA**.

Junto con la solicitud, aporta la propuesta del proyecto, el resumen no técnico e informe del comité ético y de evaluación del proyecto por el órgano habilitado.

Segundo.- El lugar donde se desarrollará el proyecto se encuentra autorizado como establecimiento usuario y está inscrito en el Registro de Explotaciones Ganaderas con el número **ES330440003591**.

Tercero.- Con fecha **27 de marzo de 2019**, el Comité de Ética del centro emite un informe favorable, conforme al RD 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.

Cuarto.- Con fecha **27 de marzo de 2019** el Comité Ético de Experimentación animal de **LA UNIVERSIDAD DE OVIEDO**, órgano habilitado, emite informe de evaluación favorable del proyecto, indicando que el proyecto cuyos datos y evaluación se proporcionan han sido evaluados con un nivel de detalle apropiados y que la evaluación ha consistido en verificar que el proyecto cumple los requisitos especificados en el artículo 34 del RD 53/2013 de 1 de febrero y que, tanto el investigador responsable del proyecto como las personas encargadas de la realización del mismo tienen capacitación para ello.

Quinto.- La solicitud se acompaña de la justificación científica para alojar individualmente a los animales por razones de bienestar animal.

Sexto.- Una vez revisada la solicitud y la documentación presentada, la Jefa del Servicio de Sanidad y Producción Animal elevó con fecha **10 de mayo de 2019** una propuesta de resolución de autorización de proyectos de investigación que utilicen animales de experimentación.

FUNDAMENTOS DE DERECHO

Primero.- El artículo 25 del 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, dispone:

“2. Los procedimientos solo se podrán realizar si están incluidos dentro del marco de un proyecto autorizado de acuerdo con la sección 2ª de este capítulo.

3. Los procedimientos deberán realizarse de forma que se evite a los animales cualquier dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero que sean innecesarios.

4. Los procedimientos se realizarán en centros usuarios autorizados, salvo autorización del órgano competente, previa justificación científica de la necesidad o conveniencia de que se realicen fuera de dichos centros.

5. Los procedimientos únicamente podrán ser realizados por personas capacitadas o autorizadas de forma temporal en las condiciones establecidas en el artículo 15.3 bajo supervisión responsable”.

Asimismo, el artículo 31 del citado Real Decreto, situado en su sección 2ª, regula la tipología de proyectos con arreglo a la siguiente clasificación:

“1. Proyectos de tipo I: Aquellos proyectos en los que se den simultáneamente las tres circunstancias siguientes:

- a) Implican exclusivamente procedimientos clasificados como «sin recuperación», «leves» o «moderados».
- b) No utilizan primates.
- c) Se realizan para cumplir requisitos legales o reglamentarios, o con fines de producción o diagnóstico por métodos establecidos.

Los proyectos tipo I podrán ser tramitados por un procedimiento simplificado y no ser sometidos a evaluación retrospectiva.

2. Proyectos de tipo II: Aquellos proyectos en los que se den simultáneamente las circunstancias siguientes:

- a) Implican exclusivamente procedimientos clasificados como «sin recuperación», «leves» o «moderados».
- b) No utilizan primates.

Los proyectos tipo II quedarán sujetos al procedimiento de autorización y podrán no ser sometidos a evaluación retrospectiva.

3. Proyectos de tipo III: Los proyectos diferentes de los tipos I o II. Sin perjuicio de las autorizaciones adicionales a las que puedan estar condicionados determinados proyectos, todos los proyectos tipo III quedarán sujetos al procedimiento de autorización y serán sometidos posteriormente a una evaluación retrospectiva”.

Segundo.- El proyecto para el que se solicita la autorización ha de ser considerado dentro del **tipo II**, puesto que implica procedimientos clasificados como “**moderados**”: **INJERTO DE MEMBRANA DE PRGF EN RATON INMUNODEPRIMIDO, DAÑO LIMBAR EN CORNEA DE CONEJO y TRATAMIENTO DE LA INSUFICIENCIA LÍMBICA MEDIANTE TRANSPLANTE DE MEMBRANA DE PRFG** y no utiliza primates.

El establecimiento donde se desarrollará tiene la correspondiente autorización.

Los informes emitidos al respecto son favorables, por lo que, cumpliendo con los requisitos previstos, ha de procederse a su autorización y deberá someterse a **evaluación retrospectiva** tras la finalización del proyecto prevista en **mayo de 2022**.

Tercero.- El artículo 6 del R.D. 53/2013, de 1 de febrero, regula las condiciones de alojamiento, que serán las definidas en el anexo II: los animales deben ser alojados en grupos

GOBIERNO DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS

CONSEJERÍA DE DESARROLLO RURAL Y RECURSOS NATURALES

estables. Los órganos competentes podrán conceder excepciones a lo anterior si está justificado por razones científicas, de bienestar o de sanidad de los animales.

RESUELVO

Primero.- Autorizar al **BIOTERIO DE LA UNIVERSIDAD DE OVIEDO**, el proyecto denominado: **"AUTOCELL: DESARROLLO DE UN SISTEMA DE CULTIVO AUTÓLOGO PARA EL TRATAMIENTO DE LA INSUFICIENCIA LÍMBICA BILATERAL"** en el que consta como investigador principal D. **JESÚS MERAYO LLOVES** y como investigador responsable de los procedimientos con animales D. **ÁLVARO MEANA INFIESTA**.

Esta autorización tendrá una validez que se corresponderá con la duración prevista en su memoria, con un máximo de cinco años, siempre y cuando no se produzca una modificación relevante en dicho proyecto, en cuyo caso sería necesario efectuar una nueva solicitud de autorización a la autoridad competente.

Segundo.- Asignar el código de autorización: **PROAE 21/2019**

Tercero.- Ordenar la notificación de la presente Resolución al interesado.

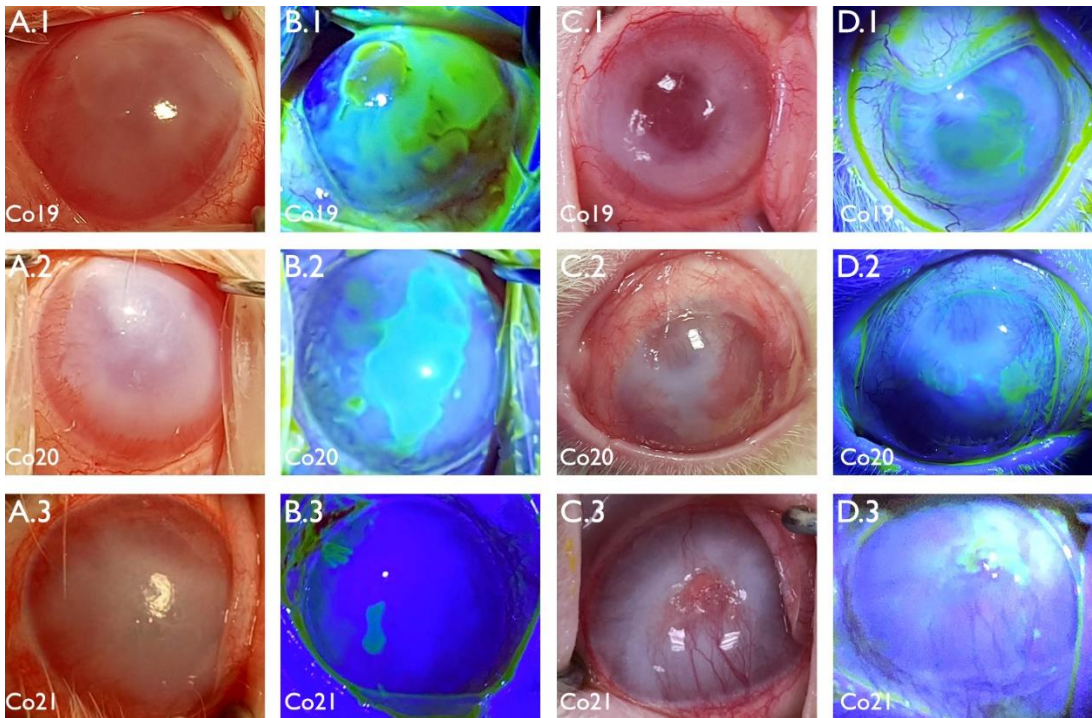
Cuarto.- La presente resolución pone fin a la vía administrativa y contra ella cabe interponer recurso contencioso-administrativo ante la Sala de lo Contencioso-Administrativo del Tribunal Superior de Justicia del Principado de Asturias en el plazo de dos meses, contados desde el día siguiente al de su notificación, de acuerdo con lo establecido en los artículos 10 y 46 de la Ley 29/1998, de 13 de julio, reguladora de la Jurisdicción Contencioso-Administrativa, sin perjuicio de la posibilidad de previa interposición del recurso potestativo de reposición ante el mismo órgano que dictó el acto, en el plazo de un mes contado desde el día siguiente al de su notificación, no pudiendo simultanearse ambos recursos, conforme a lo establecido en el artículo 28 de la Ley del Principado de Asturias 2/1995, de 13 de marzo, sobre Régimen Jurídico de la Administración y en el artículo 123 de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas. No obstante, los interesados podrán ejercitar, en su caso, cualquier otro recurso que estimen procedente.

LA CONSEJERA



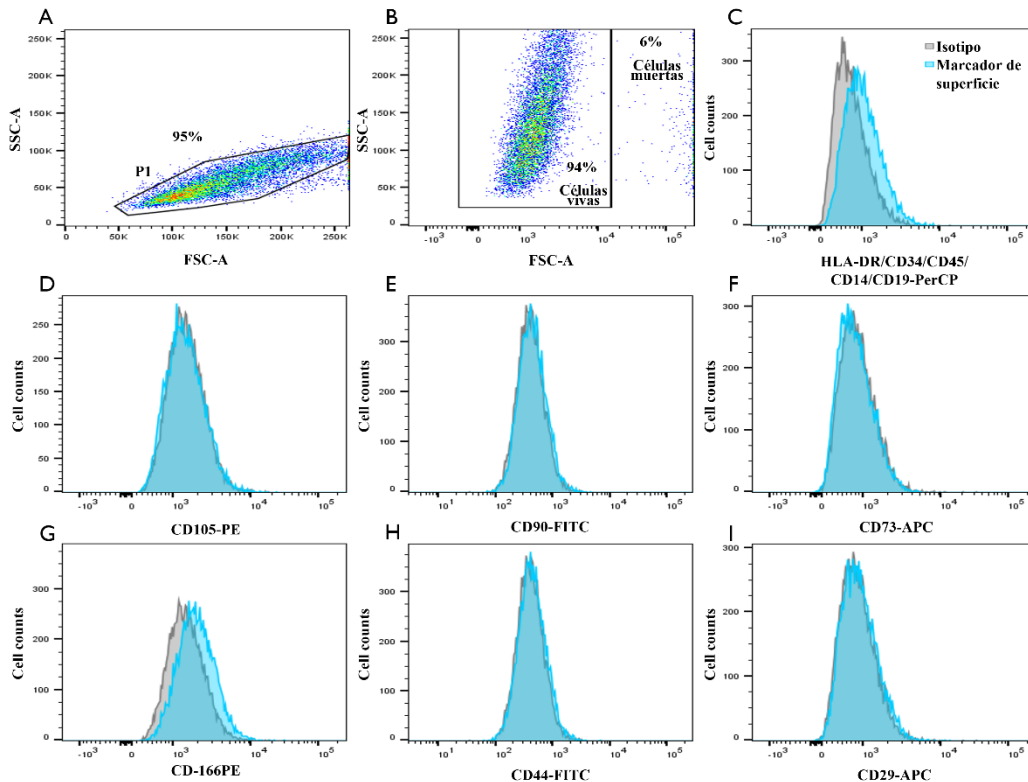
Maria Jesús Álvarez González

Resultados *in vivo* con el implante ocular de MSC humanas en 3 conejos (Cos 19, 20 y 21) con lesión por quemadura alcalina. Se muestra la clínica antes del trasplante (A) y al final del periodo de seguimiento de 42 días (C). Se muestra la prueba de fluoresceína antes del trasplante (B) y al final del periodo de seguimiento de 42 días (D).



Co: conejo. MSC: células madre mesenquimales.

Caracterización mediante citometría de flujo de las MSC de conejo expandidas con DMEM:F12, 20 % de SBF y 1 % de antibióticos. Se muestra para una población homogénea -P1- y con el 94 % de las células viables, expresión negativa para todos los marcadores de superficie estudiados, incluidos los específicos del linaje de las MSC (CD105, CD90 y CD73).



(A) La población analizada "P1" representa aproximadamente el 95 % de las células. (B) Viabilidad celular: entorno al 94 % de las células son viables. (C-I) Determinación de los marcadores de superficie celular CD105, CD90, CD73, CD166, CD44, CD29, CD45, CD34, CD14, CD19 y HLA-DR. Se muestran los resultados de un caso representativo. **APC**: alofocianina. **CD**: grupo o antígeno de diferenciación. **FITC**: fluoresceína-5-isotiocianato. **FSC**: detector de dispersión frontal. **HLA-DR**: antígeno leucocitario humano isotipo DR. **MSC**: células madre mesenquimales. **PE**: ficoeritrina. **PerCP**: complejo peridina-clorofila-proteína. **P1**: población 1. **SBF**: suero bovino fetal. **SSC**: detector de dispersión lateral.

14. DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

Publicaciones científicas directamente relacionadas con la tesis doctoral:

- A simple, safe and effective method to prepare autologous bio-based fibrin glue for ophthalmic use. **Persinal-Medina M***, Fernández-Vega Cueto-Felgueroso L*, Vázquez N, Chacón M, Alfonso-Bartolozzi B, Alonso-Alonso S, Sánchez T, Berisa-Prado S, Martínez-López LM, Merayo-Llves J, Meana A. *Pharmaceutics*. **2022** Oct 28;14(11):2325.

DOI: 10.3390/pharmaceutics14112325

PMID: 36365142

PHARMACEUTICS: Publisher name MDPI. Category rank: **51/277**. Category quartile: **Q1**. Journal Impact Factor™: **5.4** (2022) según Journal Citation Reports 2022.

*Ambos autores han contribuido igual en este trabajo

- Polymerizable skin hydrogel for full thickness wound healing. **Persinal-Medina M**, Llames S, Chacón M, Vázquez N, Pevida M, Alcalde I, Alonso-Alonso S, Martínez-López LM, Merayo-Llves J, Meana Á. *Int J Mol Sci*. **2022** Apr 27;23(9):4837.

DOI: 10.3390/ijms23094837

PMID: 35563225

INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES: Publisher name MDPI. Category rank: **66/285**. Category quartile: **Q1**. Journal Impact Factor™: **5.6** (2022) según Journal Citation Reports 2022.

- Fibrin-Plasma Rich in Growth Factors Membrane for the Treatment of a Rabbit Alkali-Burn Lesion. Sánchez-Ávila RM, Vázquez N, Chacón M, **Persinal-Medina M**, Brea-Pastor A, Berisa-Prado S, Fernández-Vega-Cueto L, Anitua E, Meana Á, Merayo-Llves J. *Int J Mol Sci*. **2021** May 25;22(11):5564.

DOI: 10.3390/ijms22115564

PMID:34070266

INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES: Publisher name MDPI. Category rank: **66/285**. Category quartile: **Q1**. Journal Impact Factor™: **5.6** (2021) según Journal Citation Reports 2022.

- Xeno-free approach for the expansion of human adipose derived mesenchymal stem cells for ocular therapies. **Persinal-Medina M**, Llames S, Vázquez N, Chacón M, Acebes-Huerta A, Uribe E, Alonso-Alonso S, Fernández-Vega González C, Baamonde B, Quirós L, Merayo-Llves J, Meana Á. *Exp Eye Res*. **2021** Jan;202:108358. (**Anexo V**).

DOI: 10.1016/j.exer.2020.108358

PMID: 33207223

EXPERIMENTAL EYE RESEARCH: Publisher name Academic press LTD- Elsevier Science LTD. Category rank: **21/62**. Category quartile: **Q2**. Journal Impact Factor™: **3.8** (2021) según Journal Citation Reports 2022.

Otras publicaciones científicas de la doctoranda:

- 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-Lloves J, Meana A. *Biosensors (Basel)*. **2023** Jan 20;13(2):162.

DOI: 10.3390/bios13020162

PMID: 36831928

BIOSENSORS-BASEL: Publisher name MDPI. Category rank: **14/86**. Category quartile: **Q1**. Journal Impact Factor™: **5.4** (2022) según Journal Citation Reports 2022.

- 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** Aug;82:105390.

DOI: 10.1016/j.tiv.2022.105390

PMID: 35595034

TOXICOLOGY IN VITRO: Publisher name Pergamon-Elsevier Science LTD. Category rank: **43/93**. Category quartile: **Q2**. Journal Impact Factor™: **3.2** (2022) según Journal Citation Reports 2022.

- Impedance-based non-invasive assay for ocular damage prediction on in vitro 3D reconstructed human corneal epithelium. *Bioelectrochemistry*. 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. **2022** Apr 2;146:108129.

DOI: 10.1016/j.bioelechem.2022.108129

PMID:35397437

BIOELECTROCHEMISTRY: Publisher name ELSEVIER SCIENCE SA. Category rank: **17/92**. Category quartile: **Q1**. Journal Impact Factor™: **5** (2022) según Journal Citation Reports 2022.

- 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** Aug 17;13(8):1282.

DOI: 10.3390/pharmaceutics13081282

PMID: 34452243

PHARMACEUTICS: Publisher name MDPI. Category rank: **51/277**. Category quartile: **Q1**. Journal Impact Factor™: **5.4** (2021) según Journal Citation Reports 2022.

- Reduced graphene oxide membranes in ocular regenerative medicine. Zambrano-Andazol I, Vázquez N, Chacón M, Sánchez-Avila RM, **Persinal M**, Blanco C, González Z, Menéndez R, Sierra M, Fernández-Vega Á, Sánchez T, Merayo-Lloves J, Meana Á. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. **2020** Sep;114:111075.

DOI: 10.1016/j.msec.2020.111075 PMID:32993970

MATERIALS SCIENCE & ENGINEERING C-MATERIALS FOR BIOLOGICAL APPLICATIONS: Publisher name Elsevier. Category rank: **7/47**. Category quartile: **Q1**. Journal Impact Factor™: **7.3** (2020) según Journal Citation Reports 2022.

- 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** Jun; 65:104779.

DOI: 10.1016/j.tiv.2020.104779 PMID:31962200

TOXICOLOGY IN VITRO: Publisher name Pergamon-Elsevier Science LTD. Category rank: **43/93**. Category quartile: **Q2**. Journal Impact Factor™: **3.5** (2020) según Journal Citation Reports 2022.

- Development of biological adhesives for use in ophthalmic surgery based on PRGF. Merayo-Lloves J, **Medina-Persinal M**. Ocular Surface Regeneration (Book). 04/10/2019. ISBN 978-84-09-15181-3.

- QobuR - A new in vitro human corneal epithelial model for preclinical drug screening. Chacón M, Vázquez N, Berisa S, **Persinal M**, Sánchez M, Baamonde B, Alfonso JF, Fernández-Vega Cueto L, Merayo-Lloves J, Meana Á. Eur J Pharm Biopharm. **2019** Mar; 136:164-173.

DOI: 10.1016/j.ejpb.2019.01.023 PMID:30690064

EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS: Publisher name Elsevier. Category rank: **40/271**. Category quartile: **Q1**. Journal Impact Factor™: **4.6** (2019) según Journal Citation Reports 2022.

- Silk Fibroin Films for Corneal Endothelial Regeneration: Transplant in a Rabbit Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. Vázquez N, Rodríguez-Barrientos

CA, Aznar-Cervantes SD, Chacón M, Cenis JL, Riestra AC, Sánchez-Avila RM, **Persinal M**, Brea-Pastor A, Fernández-Vega Cueto L, Meana Á, Merayo-Llodes J. Invest Ophthalmol Vis Sci. **2017** Jul 1;58(9):3357-3365.

DOI: 10.1167/iops.17-21797

PMID:28687847

INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE: Publisher name Assoc Research Vision Ophthalmology INC. Category rank: **9/59**. Category quartile: **Q1**. Journal Impact Factor™: **3.4** (2017) según Journal Citation Reports 2022.

Publicaciones en congresos directamente relacionadas con la tesis doctoral:

- 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.)
- Autologous tissue adhesive in ophthalmological surgery. **Mairobi Persinal-Medina**, Silvia Berisa, Manuel Chacón, Natalia Vázquez, Ignacio Blázquez, Álvaro Meana, Jesús Merayo Lloves, Luis Fernández Vega Cueto Felgueroso. 25th Congress of the European Association of Hospital Pharmacists (EAHP) (2020, Gothenburg, Suecia)
- 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 of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (2021, Virtual, 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-Lloves. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (2023, Nueva Orleans, EE.UU.)

Otras publicaciones y comunicaciones en congresos

- PRGF-Endoret®: A new approach in the treatment of limbal stem cell deficiency. Jesús Merayo-Lloves, Ana C Riestra, Álvaro Meana, Natalia Vázquez., Manuel Chacón, **Mairobi Persinal**, Gorka Orive, Eduardo Anitua. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (2016, Seattle, EE.UU.)
- Producción de biotintas a partir de tejidos humanos. Resultados preliminares. **Mairobi Persinal-Medina**, Sara Gómez Llamas, Manuel Chacón, Natalia Vázquez, Amanda Laca Pérez, Lucía Cárcaba García, Jesús Merayo Llovez, Álvaro Meana. XV Congreso de la Asociación Española de Bancos de Tejido (2017, Bilbao, España)
- Plasma bioink production for application in 3D bioprinting of human tissues. **Mairobi Persinal-Medina**, Sara Gómez Llamas, Álvaro Meana. VI Jornadas Internacionales de Doctorado (2017, Asturias, España)
- Opciones para la investigación en el sector privado [comunicación oral]. **Mairobi Persinal-Medina**. Workshop "Oportunidades profesionales para jóvenes en el campo de la Biotecnología" de la Sociedad Española de Biotecnología (SEBIOT) (2018, Salamanca, España)
- A new in vitro corneal epithelial model for preclinical drug screening. Manuel Chacón, Álvaro Meana, Natalia Vázquez, Silvia Berisa, **Mairobi Persinal**, Manuel Sánchez, Luís Fernández-Vega Cueto-Felgueroso, Jose F. Alfonso, Jesús Merayo-Lloves. 3rd Biennial International Symposium on Ocular Regeneration (2018, Boston, EE. UU.)
- Plasma Rich in Growth Factors membrane in the treatment of Limbal Stem Cell Deficiency. Jesús Merayo-Lloves, Ronald Sanchez-Ávila, Manuel Chacón, Natalia Vázquez, Silvia Berisa, **Mairobi Persinal-Medina**, Carlos Lisa, Miguel Naveiras, Álvaro Meana. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (2019, Vancouver, Canadá)
- Low scale production of advanced therapy medicinal products for limbal stem cell deficiency. Álvaro Meana, Silvia Berisa, Manuel Chacón, Natalia Vázquez, **Mairobi Persinal-Medina**, Begoña Baamonde, José Alfonso, Luis Fernández-Vega, Jesús Merayo-Lloves. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (2019, Vancouver, Canadá)
- Evaluating the safety of pharmaceutical drugs in a dual model of cell viability and barrier integrity. Manuel Chacón, Álvaro Meana, Natalia Vázquez, Silvia Berisa, **Mairobi Persinal**, Manuel Sánchez, Luís Fernández-Vega Cueto-Felgueroso, Jose F. Alfonso, Jesús Merayo-Lloves. 14th Congress on Ocular Pharmacology and Therapeutics (AOPT) (2019, Nueva Orleans, EE.UU.)
- 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.)
- 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-Llves, 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-Llves, Álvaro Meana. VII International Congress of Research in Retina and Vision (SIREV) (2021, Virtual, España)
 - 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-Llves, 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, **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-Llves, Álvaro Meana. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (2023, Nueva Orleans, EE.UU.)
 - 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-Llves. 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-Llves, Álvaro Meana. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (2021, Virtual, EE.UU.)

- 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.)
- Use of plasma rich in growth factors in a macular hole in vivo model. Susana del Olmo Aguado, Jaime Larrea González, Nagore de Pablo, **Mairobi Persinal Medina**, Enol Artime, Sergio Alonso-Alonso, Jesus Merayo-Lloves. Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) (2022, Denver, EE.UU.)
- 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.)
- Antifibrotic activity of Siempreviva sap for potential pterygium treatment. Katiana Flores Nucamendi, Alfredo Del Castillo, David E Rodríguez, **Mairobi Persinal-Medina**, Karla Carrasco, Daniel Dares, Alberto Castillo, Judith Zavala, Jorge E Valdez.



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Eye Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexer

Xeno-free approach for the expansion of human adipose derived mesenchymal stem cells for ocular therapies

M. Persinal-Medina^a, S. Llamas^{a,b,c,d}, N. Vázquez^a, M. Chacón^a, A. Acebes-Huerta^e, E. Uribe^a, S. Alonso-Alonso^a, C. Fernández-Vega González^{a,f}, B. Baamonde^a, L. Quirós^a, J. Merayo-Lloves^a, Á. Meana^{a,b,c,g}

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

^b Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER) U714, Madrid, Spain

^c Unidad de Ingeniería Tisular, Centro Comunitario Sangre y Tejidos (CCST), Oviedo, Spain

^d Grupo de Medicina Regenerativa e Ingeniería Tisular, Fundación Jiménez Díaz (IBS FJD), Madrid, Spain

^e Laboratorio de Investigación en Plaquetas, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Oviedo, Spain

^f Instituto Oftalmológico Fernández-Vega, Oviedo, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Mesenchymal stem cells
Autologous
Adipose tissue
Plasma rich in growth factors
PRGF
Stem cells
Regenerative medicine
Ocular surface

ABSTRACT

To restore corneal transparency and vision loss after an injury on the ocular surface, the use of human stem cells from different origins has been recently proposed. Mesenchymal stem cells (MSCs) seem to be an appropriate adult source of autologous stem cells due to their accessibility, high proliferation rate, and multipotent capacity. In this work, we developed a simple culture system to prepare a graft based on a fibrin membrane seeded with human MSCs. A commercial kit, PRGF Endoret®, was used to prepare both, the growth factors used as culture media supplement and the fibrin membrane grafts. Adipose-derived MSCs (Ad-MSCs) were expanded, characterised by flow cytometry and their multilineage differentiation potential confirmed by inducing adipogenesis, osteogenesis and chondrogenesis. Ad-MSCs seeded on the fibrin membranes were grafted onto athymic mice showing good biocompatibility with no adverse reactions observed during the follow up period. These findings support the assumption that a system in which all the biological components (cells, growth factors and carrier) are autologous, could potentially be used for future ex vivo expansion of Ad-MSCs to treat ocular conditions such as an inflammatory milieu, traumatic scars and loss of the regenerative capacity of the corneal epithelium that compromise the quality of vision.

1. Introduction

Injuries on the ocular surface tend to induce an inflammatory response or a disruption of the epithelial/stromal homeostasis in the cornea. If this injury is intense, the outcome may result in an inflammatory milieu (Sahu et al., 2019), stromal defects, scars or corneal opacification that reduce the quality of vision and could even lead to blindness (Nakamura et al., 2016). To heal traumatic scars and restore the regenerative capacity of the corneal epithelium, stem cells of different origins have already been used, including limbal epithelial stem cells (Tsay et al., 2000), conjunctival epithelial stem cells (Tanioka

et al., 2006), oral mucosal stem cells (Nakamura et al., 2003) and mesenchymal stem cells (MSCs) (Calonge et al., 2019; Rohaina et al., 2014).

Interest in the use of MSCs to treat corneal diseases has increased since the discovery of multipotent MSCs in the human corneal limbal stroma (Branch et al., 2012; Funderburgh et al., 2016). The presence of such cells of mesenchymal origin and their role during the wound healing of ocular injuries have been explored by many authors worldwide (Funderburgh et al., 2016; Katikireddy et al., 2014; Pinnamaneni and Funderburgh, 2012). The corneal therapeutic potential of MSCs has been evidenced in animal models of corneal damage by MSCs transplant

Abbreviations: MSCs, mesenchymal stem cells; Ad-MSCs, adipose derived-mesenchymal stem cells; PRGF, plasma rich in growth factors; SEM, scanning electron microscope.

* Corresponding author. Instituto Universitario Fernández-Vega, Fundación de Investigación Oftalmológica, Universidad de Oviedo, Avenida Doctores Fernández Vega 34, 33012, Asturias, Spain.

E-mail address: meana@fio.as (Á. Meana).

<https://doi.org/10.1016/j.yexer.2020.108358>

Received 21 August 2020; Received in revised form 5 November 2020; Accepted 9 November 2020

Available online 15 November 2020

0014-4835/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

on a cell carrier (Ma et al., 2006) or by intravenous injection (Arnalich-Montiel et al., 2008; Zeppieri et al., 2013). However, the current evidences of MSCs potential are not just limited to preclinical studies in animals. The first favourable results concerning the use of MSCs at the ocular surface were recently published in a phase I-II clinical trial, in which bone marrow derived MSCs cultured onto amniotic membrane were used to treat patients with limbal stem cell deficiency (Calonge et al., 2019). The role of MSCs in the cornea is based on their capacity to enhance tissue regeneration and their immunomodulatory, chemotactic, and paracrine properties (Simonacci et al., 2018). MSCs produce anti-inflammatory cytokines, anti-angiogenic factors, and growth factors that limit the progression of inflammatory corneal diseases and promote *in vivo* regeneration when implanted as corneal substitutes (Eslani et al., 2017; Oh et al., 2008; Sahu et al., 2019). Multipotent MSCs can be isolated from specific sources like the corneoscleral limbus (Branch et al., 2012), and perinatal tissues (Li et al., 2015), or from more abundant sources such as bone marrow (Morrison and Scadden, 2014), skin and foreskin (Dapkute et al., 2017), dental tissues (Tomasello et al., 2017) and adipose tissues (Priya et al., 2012). In this last case, the subcutaneous fat tissue represents an easily accessible source of Adipose-derived MSCs (Ad-MSCs) in adults. Besides, biopsies from subcutaneous fat tissue can be obtained under local anaesthesia by a less invasive and less painful procedure than all the other sources (Schäffler and Büchler, 2007).

However, although the use of MSCs is becoming a mainstream treatment approach, there is not a standardized methodology for Ad-MSCs isolation. Currently, subcutaneous fat collected by liposuction aspiration or needle biopsy is by far the most widely used source of adipose tissue (Balducci and Alessandri, 2016; Bunnell et al., 2008; Dubois et al., 2008). However, to prepare an autologous ocular therapy, collecting fat tissue by liposuction would be too invasive for the patient as it would require systemic anaesthesia (Matarasso et al., 2014) and large volumes of tissue in order to efficiently expand Ad-MSCs (Balducci and Alessandri, 2016; Dubois et al., 2008). Additionally, Ad-MSC expansion protocols are varied; the use of enzymatic digestions differs between authors (Bunnell et al., 2008), and it unnecessarily increases sample manipulation and procedural cost, while culture media composition also varies amongst authors as they may (Arnalich-Montiel et al., 2008) or may not (Cowper et al., 2019; Lensch et al., 2018) contain xenogenic components such as foetal bovine serum (FBS) and other growth factors.

In the present study, a simple culture system to expand Ad-MSCs from a minimal subcutaneous fat biopsy is developed. The novelty of this method is based on avoiding routine enzymatic digestion procedures and the use of a xeno-free culture medium. For this purpose, human Plasma Rich in Growth Factors (PRGF), isolated from a small volume of whole blood using the PRGF Endoret® kit in ophthalmology (BTI, Vitoria, Spain), is used as the only culture media supplement. Moreover, Ad-MSCs were expanded on a PRGF fibrin membrane, produced from the same blood donation, and grafted to a murine animal model.

In summary, this study describes an easy method to culture and transplant Ad-MSCs on a cell carrier that could potentially be used to restore the damaged ocular surface. This system sets the ground for the development of a fully autologous culture system in which all its components (MSCs, culture media supplements and transplant carrier) are obtained from the receptor.

2. Materials and methods

2.1. Ad-MSCs isolation and characterization

2.1.1. Blood collection and PRGF preparation

Whole blood was collected from healthy volunteers ($n = 12$; age range 23–64 years) by venipuncture after informed written consent from each individual.

Each whole blood sample was processed according to the method

described by Anitua et al. (Anitua, 1999). In brief, from each individual, 81 mL of blood was collected into 9 mL tubes containing 3.8% (w/v) sodium citrate (BTI® Biotechnology Institute, Vitoria, Spain). Blood tubes were centrifuged at 580 g for 8 min at room temperature and split in two parts. The upper 1–3 mL of the plasma column (F1) was drawn and incubated with 10% (w/v) calcium chloride (20 μ L/1 mL of plasma) at 37 °C for 1 h, and the released supernatant (hereafter PRGF) was collected by aspiration and stored at –20 °C until use for culture medium preparation. The lower 2 mL of the plasma column (F2) was pipetted avoiding the buffy coat and stored at –20 °C until used to prepare the PRGF fibrin membrane.

2.1.2. Ad-MSCs isolation and expansion

Subcutaneous fat tissue was obtained from the regional blood and tissue bank (Centro Comunitario de Sangre y Tejidos, Asturias, Spain) from 14 cadaveric donors [age range 18–78 years] of the Hospital Universitario Central de Asturias (Asturias, Spain). The samples were harvested from the peripatellar fat pads and the biopsy size was 0.5–1.5 cm² in all cases. All human tissues were handled according to the principles of the Declaration of Helsinki and following Spanish legislation concerning organ and tissue donation for research.

After tissue reception, samples were processed under sterile conditions. Biopsies were minced into fragments of 1–2 mm² and explants were placed individually in a 12-well culture plate (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific) and Ham's F12 mixture (F12, Thermo Fisher Scientific) (2:1) supplemented with 10% PRGF, 100 U/mL penicillin and 0.10 mg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) (hereafter PRGF medium). When confluent, the expanded cells were harvested with 0.25% trypsin-EDTA (T/E) (Sigma-Aldrich) and subsequently seeded in a 75 cm² culture flask (Thermo Fisher Scientific). Cells were cultivated until 80% confluence before sequential passaging up to passage 4. Cultures were observed using a Leica DMIL LED phase contrast microscope and photographs acquired using an attached EC3 camera (Leica, Wetzlar, Germany).

2.1.3. Flow cytometry

Flow cytometric immunophenotyping was assessed in passage 4 cells at 80–90% confluence ($n = 10$). Cells were harvested using 0.25% T/E and washed in phosphate buffered saline (PBS) containing 0.5% bovine serum albumin prior incubation with the following monoclonal antibodies according to manufacturer's instructions: FITC anti-human CD90 and CD44, PE anti-human CD105 and CD166, APC anti-human CD29 and CD73 and PerCP anti-human CD45, CD34, CD14, CD19 and HLA-DR (Mesenchymal Cell Kit; Immunostep, Salamanca, Spain). Cell viability was assessed by propidium iodide staining (BD Biosciences, California, USA). Data was acquired in a FACS Aria II™ flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo software (Tree Star, Oregon, USA).

2.1.4. Multilineage differentiation of Ad-MSCs

2.1.4.1. Adipogenesis. Cells at passage 4 were harvested with T/E and seeded at a density of 20,000 cells/cm² in PRGF medium. After 3 days, the medium was replaced with adipogenic medium containing DMEM: F12, 10% PRGF, 1 μ M dexamethasone, 10 μ M insulin, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 200 μ M indomethacin, 100 U/mL penicillin and 0.10 mg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich). The cultures were grown at 37 °C in humidified 5% CO₂ incubator with medium replacement every 2–3 days. After 21 days, cells were fixed in ice-cold methanol (Merck, Massachusetts, USA) for 10 min and stained with Oil Red O to detect intracellular lipid accumulation.

2.1.4.2. Osteogenesis. Cells at passage 4 were harvested with T/E and plated onto adherent plates containing PRGF medium. After 3 days, osteogenic differentiation was induced by replacing the culture medium

with an osteogenic differentiation medium consisting of DMEM:F12, 10% PRGF, 1 μ M dexamethasone, 50 μ M ascorbic acid, 10 mM β -glycerophosphate disodium salt hydrate, 100 U/mL penicillin and 0.10 mg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich). The cultures were grown at 37 °C in humidified 5% CO₂ incubator with medium replacement every 2–3 days. After 21 days of incubation, cultures were fixed in ice-cold methanol for 10 min and stained with Alizarin Red S to detect extracellular calcium accumulation.

2.1.4.3. Chondrogenesis. A cell solution of 1.6×10^7 viable cells/mL (at passage 4) was used to generate micromass cultures by seeding 5 μ L of cell solution in the centre of 48-well plate wells. Cultures were incubated for 2 h under high humidity conditions to allow cell attachment. Next, they were cultured at 37 °C in humidified 5% CO₂ incubator in chondrogenic differentiation with medium replacement every 2–3 days. The chondrogenic differentiation medium was composed of StemPro® Chondrocyte Differentiation Basal Medium supplemented with StemPro® Chondrogenesis Supplement Gibco™ (Thermo Fisher Scientific). After 21 days of incubation, micromass cultures were fixed with 2.5% (v/v) glutaraldehyde (Merck) for 30 min at room temperature and then rinsed carefully with PBS. Cells were stained with Alcian blue to detect glycosaminoglycans and mucopolysaccharides characteristic of cartilage tissue.

2.2. Culture of Ad-MSCs onto PRGF fibrin membrane

2.2.1. Preparation of PRGF fibrin membrane

For each membrane, 100 μ L of 10% CaCl₂ was mixed with 5 mL of thawed F2 (described in the previous section) and incubated in a 35-mm diameter dish at 37 °C for 30 min. Once a gel had formed, the PRGF fibrin membranes were obtained by flattening for 30 s using a 500 μ m fibrin membrane shaper (BTI® Biotechnology Institute). The membranes obtained were placed onto a nitrocellulose disk to improve their handling. Finally, the 500- μ m thick PRGF fibrin membranes were placed on a 0.4 μ m pore size 24 mm Corning® Transwell® insert (Sigma-Aldrich) in a 6-well culture plate (Fig. 1).

2.2.2. MSCs culture on PRGF fibrin membranes

Ad-MSCs at passage 4 were detached from the flask with 0.25% T/E and seeded on the PRGF fibrin membrane at a density of 2.1×10^5 cells/cm² in PRGF medium supplemented with 1.5 mg/mL tranexamic acid (B. Braun Medical S.A., Lugo, Spain) to avoid fibrinolysis. Cultures were grown at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator for 72 h and subsequently were either fixed in 4% paraformaldehyde (Thermo Fisher Scientific) for 30 min or transplanted to athymic mice.

2.2.3. In vitro characterization

The surface morphology PRGF fibrin membranes with and without cells were examined under a scanning electron microscope (SEM). Fixed membranes were dehydrated in a graded series of acetone (30%, 50%, 70%, 90% and 100%) for 10 min respectively and dried by the critical-point method. Finally, they were coated with gold under vacuum and observed in a JEOL 6610LV scanning microscope (JEOL Co., Tokyo, Japan) at 20 kV accelerated voltage.

Moreover, Ad-MSCs cultured on the PRGF fibrin membrane were examined by immunofluorescence. Briefly, fixed membranes were dehydrated and embedded in paraffin. Deparaffinized tissue sections (5 μ m) were rinsed with PBS solution twice for 10 min, and permeabilized in a PBS solution containing 0.3% Triton X-100 for another 5 min. The sections were then incubated at 4 °C overnight with primary mouse anti-vimentin monoclonal antibody (1:100, clone V9, DAKO, Glostrup, Denmark) containing 10% normal goat serum (Life Technologies, California, USA) as blocking agent. Next, cells were incubated with a secondary anti-mouse antibody (1:500) (Life Technologies) for 2 h at room temperature. To visualize nuclei, samples were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Photographs were taken using a Leica DM6000B fluorescence microscope with an attached DFC310FX camera (Leica, Wetzlar, Germany).

2.3. In vivo transplantation

2.3.1. PRGF fibrin membrane grafting

Athymic mice (n = 12, male, 6–7 weeks, 25–30 g) were assigned to two study groups (21 days and 35 days) of 6 animals each, and subdivided in two subgroups of 3 animals each: PRGF fibrin membranes or PRGF fibrin membranes seeded with Ad-MSCs. Implants were grafted subcutaneously on the back of each mouse previously anaesthetised with 2% isoflurane. Briefly, a 5 cm² subcutaneous pocket was opened on the dorsum of each mouse. Next, implants were placed upside down in contact with the thoracolumbar fascia. Finally, the nitrocellulose disks were removed, the implants were covered by the skin and the surgical wound was closed using non-resorbable 4-0 suture silk sutures (Covidien™ Medtronic, Dublin, Ireland).

Examinations were performed on each mouse on a weekly basis and a picture of the grafted site was taken at the end of the follow-up period. Finally, mice were euthanized by CO₂ inhalation and tissue samples were harvested for subsequent immunohistochemical analysis.

Mice were housed at the Animal Experimental Centre of the University of Oviedo (Asturias, Spain) in pathogen-free conditions. All animal experiments were approved by the competent regional authorities (Spanish registration code PROAE 21/2019) and were conducted according to European and Spanish laws and regulations (Directive 2010/

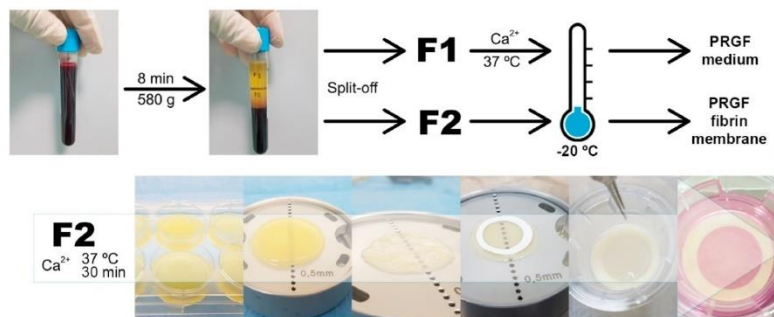


Fig. 1. Blood collection and PRGF fibrin membrane preparation process.

63/UE, Law 32/2007 and Real Decreto 1386/2018). Moreover, research was conducted following the ARVO guidelines for animal research.

2.3.2. Immunohistochemistry

Back skin samples were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Deparaffinized tissue sections (5 μ m) were immunostained with an antibody against human vimentin. Briefly, tissue sections were rinsed with PBS solution twice for 10 min, incubated 5 min in 3% hydrogen peroxide in absolute methanol to inactivate endogenous peroxidases, and permeabilized in a PBS solution containing 0.3% Triton X-100 for another 5 min. Following this, the samples were incubated for 48 h at 4 °C with a monoclonal rabbit anti-human vimentin antibody (1:100, clone SP20, Abcam, Cambridge, UK) containing 10% normal goat serum (Life Technologies) as a nonspecific reaction blocking agent. Next, samples were incubated in peroxidase-conjugated anti-rabbit secondary antibody (1:200) (Vector Laboratories, California, USA) for 2 h. Subsequently, the samples were incubated with 0.03% H₂O₂, 0.1% 3,3'-diaminobenzidine in 0.1 M PBS pH 7.4 for 10–20 s or until a brown precipitate appeared. Finally, nuclei were counterstained with haematoxylin and tissue slides were dehydrated, cleared and mounted. Photographs were taken using a Leica DM6000B bright-field microscope fitted with a DFC310FX camera (Leica, Wetzlar, Germany).

3. Results

3.1. Ad-MSCs isolation and characterization

3.1.1. Cell isolation

Plastic-adherent cells were successfully recovered from all the adipose tissue samples processed following explant technique and culture in PRGF medium in 10–15 days. Through phase-contrast microscopy, the characteristic MSCs phenotype was identified, and cells showed a typical fibroblast-like morphology and grew attached to the plastic surface in cell monolayers (Fig. 2).

3.1.2. Ad-MSCs characterization by flow cytometry

Ad-MSCs were characterized from 10 donor by flow cytometry. The main population of cells isolated at passage 4 consisted of $94.08 \pm 0.21\%$ of all the grown cells and a minimal proportion of dead cells ($2.74 \pm 0.12\%$) (Fig. 3A). Through flow cytometry, cells were identified as Ad-MSCs given that over 95% of population expressed the surface markers CD105 ($96.19 \pm 0.20\%$), CD73 ($99.77 \pm 0.06\%$) and CD90 ($99.66 \pm 0.06\%$), while lacked CD45, CD34, CD14, CD19 and HLA-DR markers (Fig. 3B). Additionally, cells expressed other MSCs surface

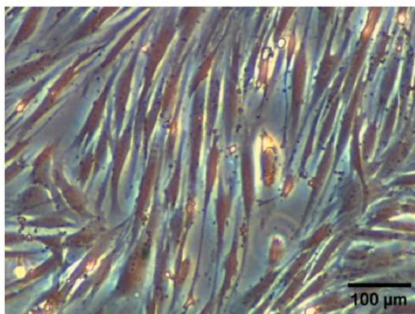


Fig. 2. Morphology of Ad-MSCs expanded by the explant technique and cultured in PRGF medium.

markers as CD166 ($98.82 \pm 0.05\%$), CD44 ($99.37 \pm 0.11\%$) and CD29 ($99.90 \pm 0.04\%$).

3.1.3. Multilineage differentiation of Ad-MSCs

In all the samples evaluated ($n = 5$), Ad-MSCs were capable to differentiate into adipogenic and osteogenic mesenchymal lineages in differentiation media containing PRGF and into chondrocytes using conventional media. First, adipogenic differentiation was confirmed through identification of intracellular lipid vesicles by Oil Red O stain. Second, osteogenic differentiation was confirmed by Alizarin Red S staining of extracellular calcium deposition around cells. Finally, chondrogenic differentiation was confirmed through identification of glycosaminoglycans and mucopolysaccharides by Alcian Blue staining into the micromass cultures (Fig. 4).

3.2. Culture of Ad-MSCs onto PRGF fibrin membranes

As shown in the SEM image, PRGF fibrin membrane showed a complex three-dimensional fibrillar structure (Fig. 5A) that allowed Ad-MSCs adhesion and proliferation displaying their typical like-fibroblast morphology (Fig. 5B). Immunofluorescence of Ad-MSCs grown on the PRGF fibrin membrane showed positive vimentin expression and appeared as a confluent monolayer showing a fibroblast-like appearance (Fig. 6).

3.3. In vivo transplantation

PRGF fibrin membranes provided structural support for the Ad-MSCs culture and were successfully transplanted in all cases. No cases of graft failure or mortality were recorded during the follow-up period. At 21 and 35 days post-surgery wounds were healed and skin showed normal scarring. Through immunohistochemistry, human Ad-MSCs were identified among the murine dermis both at 21 and 35 days. It is worth noting that presence of human Ad-MSCs was greater at 35 days than at 21 days. Moreover, no inflammatory signs or cells were observed in any sample (Fig. 7).

4. Discussion

Ad-MSCs are being considered for a variety of clinical applications due to their plasticity, paracrine activity, immunomodulation, and chemotactic activity (Ntege et al., 2020; Simonacci et al., 2018). Ad-MSCs perform their immunomodulatory functions by reducing inflammation and angiogenesis and enhancing the proliferation of local stem cells to reconstruct the damaged tissue (Oh et al., 2008). Besides, thanks to their plasticity, the MSCs can also be differentiated *in vitro* into multiple lineages and can be transplanted to restore a specific tissue (Han et al., 2019).

A significant amount of evidence points to the great therapeutic utility of Ad-MSCs in both preclinical and clinical models. Focusing on the clinical field, previous studies have described the safety and efficacy of the clinical use of Ad-MSCs in inflammatory ocular disorders, epithelial ocular defects, against hair loss (Gentile, 2019), in tissue regeneration of bone or soft tissue (Cervelli et al., 2013; Gentile et al., 2019), and even in modulation of immune response in COVID-19 pneumonia (Gentile and Sterodimas, 2020). For the first cases, the beneficial effects of topical application of MSC on the cornea have been reported previously (Ahmed et al., 2015; Ma et al., 2006), since these cells contribute to improve the reconstruction of the ocular surface by modulating both inflammation and angiogenesis in animal models with chemical injury. But the underlying mechanisms responsible for such effects has not been elucidated until later (Oh et al., 2008), when was described that paracrine effects mediated by IL-10, TGF- β , IL-6, and TSP-1 from MSC could display such modulations. In the last few years, the therapeutic potential of MSC for the treatment of the ocular surface is gaining interest (Arnalich-Montiel et al., 2008; Calonge et al., 2019;

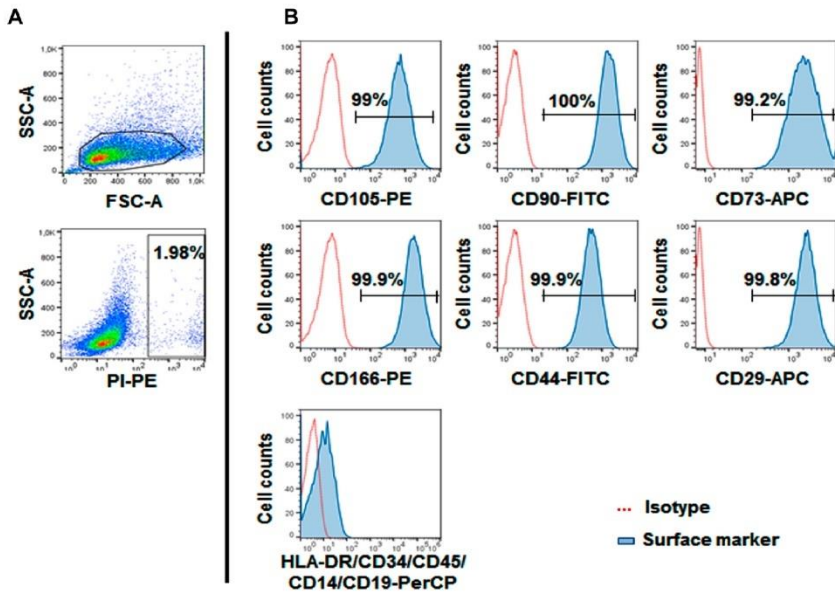


Fig. 3. Phenotypic characterization of Ad-MSCs by flow cytometry. (A) Gating strategy and cell viability determined by PI staining. (B) Flow cytometry determination of cell surface markers CD105, CD90, CD73, CD166, CD44, CD29, CD45, CD34, CD14, CD19 and HLA-DR. Results of one representative donor are shown.

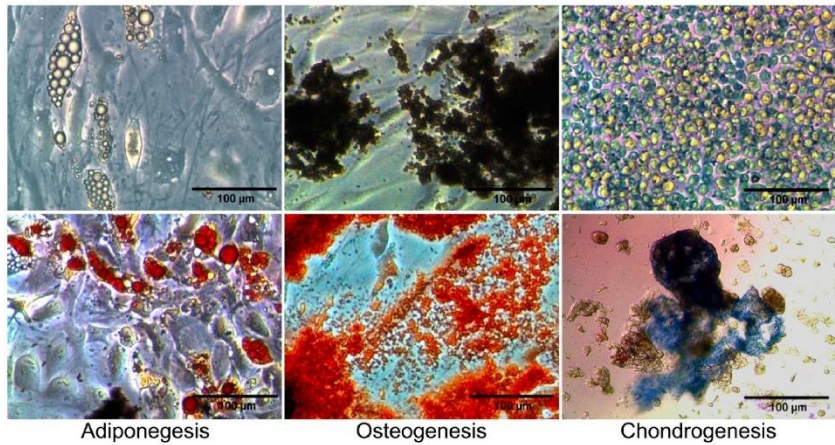


Fig. 4. Morphology of Ad-MSCs cultured in adipogenic, osteogenic or chondrogenic induction media for 21 days before staining (top row) and after staining (bottom row).

Ma et al., 2006; Zeppieri et al., 2017).

For ophthalmic use, the most common source to obtain MSCs are bone marrow and adipose tissue (Sahu et al., 2019), although which

type of cell is more effective and suitable for cell therapy remains unknown (Xu et al., 2017). These sources share similar features, morphology, and immune phenotype (Izadpanah et al., 2006; Kern

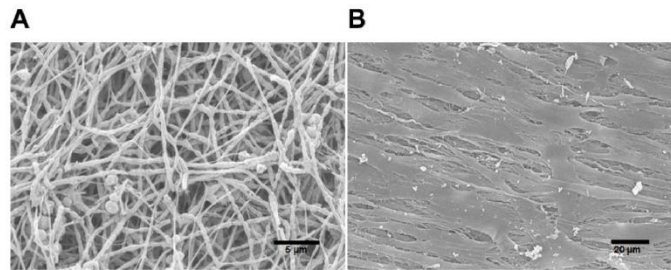


Fig. 5. SEM micrograph of the PRGF fibrin membrane (A), and Ad-MSCs adhered to the membrane surface (B).

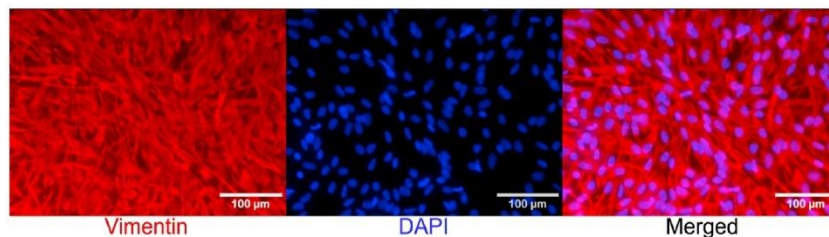


Fig. 6. Immunofluorescence staining against vimentin (red) of cultured Ad-MSCs grown on a PRGF fibrin membrane. Nuclei stained blue.

et al., 2006), and different studies have shown both as suitable for a potential clinical application (Elman et al., 2014; Rasmussen et al., 2014). We have used subcutaneous fat tissue to obtain Ad-MSCs due to its accessibility, requiring only a minimally invasive procedure for biopsy (Priya et al., 2012), and cost-effectiveness (Galindo et al., 2017).

In this study, Ad-MSCs were successfully expanded *in vitro* by the explant method from a minimal subcutaneous fat biopsy without any enzymatic digestion. Isolated cells were identified as Ad-MSCs according to the minimal criteria defined by the International Society for Cell Therapy (ISCT) (Dominici et al., 2006). Immune phenotyping results were consistent with previous studies (Cowper et al., 2019; Lensch et al., 2018; Zeppieri et al., 2013) where the Ad-MSCs between third and fifth passage were strongly positive for main specific markers associated with MSCs (CD105, CD73 and CD90) and negative for those associated with hematopoietic stem cells or endothelial cells (CD45, CD34, CD14, CD19 and HLA-DR). Moreover, the isolated Ad-MSCs showed homogeneous cell populations among the different samples evaluated, allowing the standardization of the culture method. Additionally, Ad-MSCs cultured *in vitro* preserved their multilineage differentiation capacity as they could differentiate into adipocytes, producing intracellular lipidic vesicles; osteocytes, producing calcium deposits; and chondrocytes producing glycosaminoglycans and mucopolysaccharides.

Protocols for Ad-MSCs isolation, expansion and differentiation tend to use animal derived products as culture supplements. In the present study, Ad-MSCs were expanded in a culture medium supplemented only with antibiotics and PRGF instead of FBS, since human sera derivatives have proven to be as good as FBS for the proliferation and differentiation of Ad-MSCs (Cowper et al., 2019; Lensch et al., 2018).

Avoiding the use of animal derived components is important in a clinical context because they may result in graft rejection due to xenogenic components and the transmission of pathogens, such as prions (Halme and Kessler, 2006). For this same reason the use of human derived carriers for implantation is preferable, being the amniotic

membrane the current gold standard (Calonge et al., 2019; Ma et al., 2006; Sahu et al., 2019). However, amniotic membrane has some disadvantages such as the need of a tissue bank for its production, its limited availability, the need of storage and it will always result in an allogeneic implantation, meaning that the disease transmissions and immune responses in the receptor are still a major risk. By contrast PRGF fibrin membrane is more accessible, has lower cost and is intended for autologous use; therefore, it avoids all the major drawbacks associated with the use of amniotic membranes.

In this study, we produced a PRGF fibrin membrane using the PRGF Endoret® kit in ophthalmology, a closed system approved by the Spanish Drug and Medical Device Agency to prepare autologous therapies based on human blood plasma (Anitua, 1999; Anitua et al., 2013, 2015; Halme and Kessler, 2006). PRGF provides fundamental growth factors, anti-infectious and proliferative properties and inhibits fibrosis (Anitua et al., 2013, 2015). The potential role of autologous PRGF fibrin membrane in ocular surface regeneration has been evaluated in patients undergoing glaucoma filtering surgery with subconjunctival treatment with autologous PRGF fibrin membrane as an adjuvant (Rodríguez-Agüirretxe et al., 2017). In addition, the safety and efficacy of the surgical use of the PRGF fibrin membrane has been demonstrated in different corneal and conjunctival pathologies as a graft or dressing (Sanchez-Avila et al., 2018). These studies revealed that, patients operated with a PRGF fibrin membrane showed significant tissue regeneration, inflammation and fibrosis were minimized, surgery success rates increased, and the need of postoperative medications was reduced. In this case, PRGF fibrin membrane could offer structural support for Ad-MSCs implantation on an anti-fibrotic and anti-inflammatory carrier.

Immunofluorescence and SEM results show that Ad-MSCs could adhere to the surface of the PRGF fibrin membranes, with proper morphology and marker expression. These results are in line with other authors, who proved that stem cells retain their morphologic and phenotypic characteristics when cultured on fibrin (Llames et al., 2004;

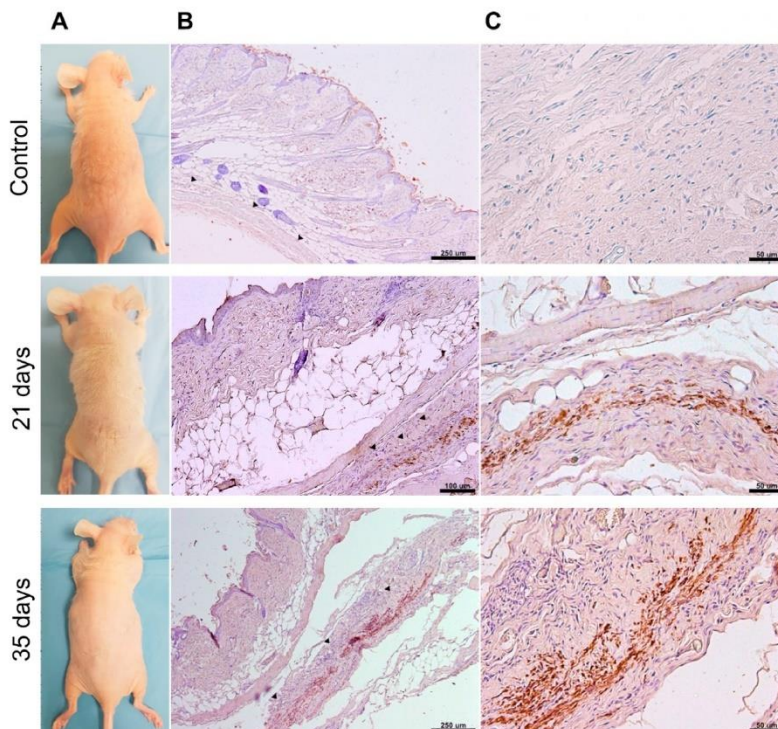


Fig. 7. Wound healing and human Ad-MSCs positively stained against vimentin (brown) in the murine subcutaneous tissue at 21 and 35 days. A representative control for both times is shown, all controls showed no inflammatory signs and absence of vimentin stain.

Riestra et al., 2017).

PRGF fibrin membranes were easily manipulated and could be grafted onto mice without any breakage. According to expectations, unseeded PRGF fibrin membranes did not induce inflammation. The most relevant result was that grafted Ad-MSCs remained viable, did not elicit inflammatory responses, and seemed to proliferate as evidenced by an increased immunostaining of vimentin at 35 days compared to 21 days. These results are consistent with other studies and suggest that grafts seeded with Ad-MSCs are non-inflammatory, survive up to 12 weeks in athymic mice and enhance tissue regeneration in comparison with the unseeded graft (Hung et al., 2014).

Nevertheless, further studies should be addressed in order to fully support the applicability of Ad-MSCs obtained using the protocol described in this manuscript, to treat ocular lesions. However, since Ad-MSCs and PRGF could be easily obtained from the same donor, this work shows the possibility of developing a completely autologous treatment tailored to the patient.

5. Conclusions

A simple xeno-free system for obtaining and grafting MSCs expanded from subcutaneous fat tissue has been developed. The present results could accelerate the translation of MSCs from the bench to the treatment of ocular surface disease due to its ease to be upgraded to clinical grade

manufacture, setting the future direction of standardization of MSC-based therapies using a xeno-free and minimally invasive approach for MSCs isolation, expansion and implantation.

Funding

This work was supported by the Government of Spain (Ministry of Science, Innovation and Universities and the State Agency of Research) and co-funded by the European Union [grant number RTC-2017-6760-1].

The authors have no commercial or proprietary interest in any concept or product discussed in this article.

Acknowledgments

This work was supported by the Government of Spain (Ministry of Science, Innovation and Universities and the State Agency of Research) and co-funded by the European Union [grant number RTC-2017-6760-1].

References

Ahmed, S.K., Soliman, A.A., Omar, S.M.M., Mohammed, W.R., 2015. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in a rabbit corneal alkali burn model (A

histological and immune histo-chemical study). *Int. J. Stem Cells* 8, 69–78. <https://doi.org/10.15283/ijsc.2015.8.1.69>.

Anitua, E., 1999. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 14, 529–535.

Anitua, E., de la Fuente, M., Muruzabal, F., Riestra, A., Merayo-Lloves, J., Orive, G., 2015. 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. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.02.016>.

Anitua, E., Muruzabal, F., Alcalde, I., Merayo-Lloves, J., Orive, G., 2013. Plasma rich in growth factors (PRGF Endoret) stimulates corneal wound healing and reduces haze formation after PRK surgery. *Exp. Eye Res.* 115, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.07.007>.

Amalieh-Moniel, F., Pastor, S., Blazquez-Martinez, A., Fernandez-Delgado, J., Nistal, M., Alio, J.L., De Miguel, M.P., 2008. Adipose derived stem cells are a source for cell therapy of the corneal stroma. *Stem Cell* 26, 570–579. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007.0653>.

Balducci, L., Alessandri, G., 2016. Isolation, expansion, and immortalization of human adipose derived mesenchymal stromal cells from biopsies and liposuction specimens. *Methods Mol. Biol.* 1416, 259–274. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3584-0_15.

Branch, M.J., Hashnani, K., Dhillon, P., Jones, D.R.E., Dua, H.S., Hopkinson, A., 2012. Mesenchymal stem cells in the human corneal limbal stroma. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 5109–5116. <https://doi.org/10.1167/iovs.11.8673>.

Bunnell, B.A., Flaat, M., Gagliardi, C., Patel, B., Rippl, C., 2008. Adipose derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods* 45, 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.jmeth.2008.03.006>.

Calonge, M., Perez, J., Galindo, S., Nieto Miguel, T., Lopez Paniagua, M., Fernandez, I., Alberca, M., Garcia-Sancho, J., Sanchez, A., Herreras, J.M., 2019. A proof-of-concept clinical trial using mesenchymal stem cells for the treatment of corneal epithelial stem cell deficiency. *Transl. Res.* 206, 18–40. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.11.003>.

Cervelli, V., Bocchini, I., Di Pasquale, C., De Angelis, B., Cervelli, G., Camicio, C.B., Orlandi, A., Scellì, M.G., Tatti, E., Deleogo, P., Gentile, P., 2013. P.R.L. platelet rich lipotransfer: our experience and current state of art in the combined use of fat and PRP. *BioMed Res. Int.* <https://doi.org/10.1155/2013/434191>, 2013.

Copper, M., Frazier, T., Wu, X., Curley, J., Ma, M., Mohiuddin, O., Dietrich, M., McCarthy, M., Bukowska, J., Gimble, J., 2019. Human platelet lysate as a functional substitute for fetal bovine serum in the culture of human adipose derived stromal/stem cells. *Cells* 8, 724. <https://doi.org/10.3390/cells8070724>.

Dapkute, D., Steponkienė, S., Bulotienė, D., Saulite, L., Riektina, U., Rotonskis, R., 2017. Skin derived mesenchymal stem cells as quantum dot vehicles to tumors. *Int. J. Nanomed.* 12, 8129–8142. <https://doi.org/10.2147/IJN.S143367>.

Dominiak, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, D.S., Dennis, R.J., Keating, L., Prockop, D.J., Horwitz, E.M., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy* 8, 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.

Dubois, S.G., Floyd, E.Z., Zvonick, S., Kilroy, G., Wu, X., Carling, S., Halvorsen, Y.D.C., Ravussin, E., Gimble, J.M., 2008. Isolation of human adipose-derived stem cells from biopsies and liposuction specimens. *Methods Mol. Biol.* 449, 69–79. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-169-1_5.

Elhama, J.S., Li, M., Wang, P., Gimble, J.M., Parekkadan, B., 2014. A comparison of adipose and bone marrow derived mesenchymal stromal cell secreted factors in the treatment of systemic inflammation. *J. Inflamm. Lond.* 11, 1. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-11-1>.

Eslani, M., Putra, L., Shen, X., Hamoui, J., Afsharkhansh, N., Besharat, S., Rosenblatt, M.L., Dana, R., Hematti, P., Djalilian, A.R., 2017. Corneal mesenchymal stromal cells are directly angiogenic via PDGF and sFLT-1. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 58, 5507–5517. <https://doi.org/10.1167/iovs.17.22680>.

Funderburgh, J.L., Funderburgh, M.L., Du, Y., 2016. Stem cells in the limbal stroma. *Ocul. Surf.* 14, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2015.12.006>.

Galindo, S., Herreras, J.M., López Paniagua, M., Rey, E., de la Mata, A., Plata Cordero, M., Calonge, M., Nieto Miguel, T., 2017. Therapeutic effect of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in experimental corneal failure due to limbal stem cell niche damage. *Stem Cell* 35, 2160–2174. <https://doi.org/10.1002/stem.2672>.

Gentile, P., 2019. Autologous cellular method using micrographs of human adipose tissue derived follicle stem cells in androgenic alopecia. *Int. J. Mol. Sci.* 20 <https://doi.org/10.3390/ijms20143446>.

Gentile, P., Piccinino, M., Calabrese, C., 2019. Characteristics and potentiality of human adipose-derived stem cells (hASCs) obtained from enzymatic digestion of fat graft. *Cells* 8, 282. <https://doi.org/10.3390/cells8030282>.

Gentile, P., Sterodimas, A., 2020. Adipose stem cells (ASCs) and stromal vascular fraction (SVF) as a potential therapy in combating (COVID-19) disease. *Aging Dis.* 11, 465–469. <https://doi.org/10.14336/AD.2020.0422>.

Halmé, D.G., Kessler, D.A., 2006. FDA regulation of stem cell-based therapies. *Boston Med. Surg. J.* 355, 1730–1735. <https://doi.org/10.1056/NEJMp063086>.

Han, Y., Li, X., Zhang, Y., Han, Y., Chang, F., Ding, J., 2019. Mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Cells* 8, 886. <https://doi.org/10.3390/cells8080886>.

Hung, M.J., Wen, M.C., Huang, Y.T., Chen, G. Den, Chou, M.M., Yang, V.C., 2014. Fascia tissue engineering with human adipose-derived stem cells in a murine model: implications for pelvic floor reconstruction. *J. Formos. Med. Assoc.* 113, 704–715. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2013.04.017>.

Izadpanah, R., Trygg, C., Patel, B., Kriedt, C., Dufour, J., Gimble, J.M., Bunnell, B.A., 2006. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J. Cell. Biochem.* 99, 1285–1297. <https://doi.org/10.1002/jcb.20904>.

Katikireddy, K.R., Dana, R., Jurkunas, U.V., 2014. Differentiation potential of limbal fibroblasts and bone marrow mesenchymal stem cells to corneal epithelial cells. *Stem Cell* 32, 717–729. <https://doi.org/10.1002/stem.1541>.

Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klitter, H., Biebsack, K., 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cell* 24, 1294–1301. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005.0342>.

Lensch, M., Múise, A., White, L., Badowski, M., Harris, D., 2018. Comparison of synthetic media designed for expansion of adipose-derived mesenchymal stromal cells. *Biomedicines* 6, 1–7. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6020054>.

Li, T., Xia, M., Gao, Y., Chen, Y., Xu, Y., 2015. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: an overview of their potential in cell-based therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* 15, 1293–1306. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1051528>.

Llanes, S.G., Del Rio, M., Larcher, F., García, E., Iscanca, M.J., Jorcano, J.L., Halgüni, P., Meana, A., 2004. Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation* 77, 350–355. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000112381.80964.85>.

Ma, Y., Xu, Y., Xiao, Z., Yang, W., Zhang, C., Song, E., Du, Y., Li, L., 2006. Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cell* 24, 315–321. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005.0046>.

Matarasso, A., Moore, D., James, E., 2012. Abdominoplasty classic principles and technique. *Clin. Plast. Surg.* 41, 655–672. <https://doi.org/10.1016/j.cps.2014.07.005>.

Morrison, S.J., Scadden, D.T., 2014. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 505, 327–334. <https://doi.org/10.1038/nature12984>.

Nakanuma, T., Endo, K.I., Cooper, L.J., Fullwood, N.J., Tanifuji, N., Tsuzuki, M., Koizumi, N., Inatomi, T., Sano, Y., Kinoshita, S., 2003. The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 106–116. <https://doi.org/10.1167/iovs.02.0195>.

Nakanuma, T., Inatomi, T., Sotozono, C., Koizumi, N., Kinoshita, S., 2016. Ocular surface reconstruction using stem cell and tissue engineering. *Prog. Retin. Eye Res.* <https://doi.org/10.1016/j.prores.2015.07.003>.

Niege, E.H., Suami, H., Shimizu, Y., 2020. Advances in regenerative therapy: a review of the literature and future directions. *Regen. Ther.* 14, 136–153. <https://doi.org/10.1016/j.jreth.2020.01.004>.

Oh, J.Y., Kim, M.K., Shin, M.S., Lee, H.J., Ko, J.H., Wee, W.R., Lee, J.H., 2008. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. *Stem Cell* 26, 1047–1055. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007.0737>.

Pinnamaneni, N., Funderburgh, J.L., 2012. Concise review: stem cells in the corneal stroma. *Stem Cell* 30, 1059–1063. <https://doi.org/10.1002/stem.1190>.

Priya, N., Sarcar, S., Majumdar, A. Sen, Sundarraj, S., 2012. Explant culture: a simple, reproducible, efficient and economic technique for isolation of mesenchymal stromal cells from human adipose tissue and liposarct. <https://doi.org/10.1002/tem.1>.

Rasmussen, J.G., Frøbert, O., Holst-Hansen, C., Kastrup, J., Baandrup, U., Zachar, V., Fink, T., Simonsen, U., 2014. Comparison of human adipose-derived stem cells and bone marrow derived stem cells in a myocardial infarction model. *Cell Transplant.* 23, 195–206. <https://doi.org/10.3727/096368912X659871>.

Riestra, A.C., Vazquez, N., Chacon, M., Berisa, S., Sanchez Avila, R.M., Orive, G., Anitua, E., Meana, A., Merayo-Lloves, J., 2017. Autologous method for ex vivo expansion of human limbal epithelial progenitor cells based on plasma rich in growth factors technology. *Ocul. Surf.* <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2017.01.003>.

Rodríguez Aguirre, L., Freire, V., Muruzabal, F., Orive, G., Anitua, E., Diez Feijóo, E., Acera, A., 2017. Subconjunctival PRGF fibrin membrane as an adjuvant to nonpenetrating deep sclerectomy: a 2-year pilot study. *Ophthalmic Res.* 59, 45–52. <https://doi.org/10.1159/000481535>.

Rohania, C.M., Then, K.Y., Ng, A.M.H., Wan Abdul Halim, W.H., Zaidin, A.Z.M., Saini, A., Idrus, R.B.H., 2014. Reconstruction of limbal stem cell deficient corneal surface with induced human bone marrow mesenchymal stem cells on amniotic membrane. *Transl. Res.* 163, 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2013.11.004>.

Sato, A., Fushisawa, W., Anonogor, A., Mihai, S.K., Chhablani, S.K., 2019. The therapeutic application of mesenchymal stem cells at the ocular surface. *Ocul. Surf.* 17, 198–207. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2019.01.006>.

Sanchez Avila, R.M., Merayo-Lloves, J., Riestra, A.C., Berisa, S., Liza, C., Sánchez, J.A., Muruzabal, F., Orive, G., Anitua, E., 2018. Plasma rich in growth factors membrane as adjuvant treatment in the surgery of ocular surface disorders. *Med. (United States)* 97. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000010242>.

Schäffler, A., Büchler, C., 2007. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells: basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cell* 25, 818–827. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006.0589>.

Simonacci, F., Bertozzi, N., Grieco, M., Rapisarda, E., 2018. Stem cells derived from adipose tissue: possible uses and clinical applications. *Gazz. Med. Ital. Arch. Sci. Med.* 177, 311–323. <https://doi.org/10.23736/30393.3660.17.03066.3>.

Tamioka, H., Kawasaki, S., Yamasaki, K., Aug, L.P.K., Koizumi, N., Nakamura, T., Yokoi, N., Konuro, A., Inatomi, T., Kinoshita, S., 2006. Establishment of a cultivated human conjunctival epithelium as an alternative tissue source for autologous corneal epithelial transplantation. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 3820–3827. <https://doi.org/10.1167/iovs.06.0293>.

Tomasello, L., Maucci, R., Coppola, A., Pitrone, M., Pizzo, G., Campisi, G., Pizzolanti, G., Giordano, C., 2017. Mesenchymal stem cells derived from inflamed dental pulp and gingival tissue: a potential application for bone formation. *Stem Cell Res. Ther.* 8, 179. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0633-z>.

M. Persinal Medina et al.

- Tsai, R.J.F., Li, L.M., Chen, J.K., 2000. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N. Engl. J. Med.* 343, 86-93. <https://doi.org/10.1056/NEJM200007133430202>.
- Xu, L., Liu, Y., Sun, Y., Wang, B., Xiong, Y., Liu, W., Wei, Q., Wang, H., He, W., Wang, B., Li, G., 2017. Tissue source determines the differentiation potentials of mesenchymal stem cells: a comparative study of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Stem Cell Res. Ther.* 8, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0716-x>.

Experimental Eye Research 202 (2021) 108358

- Zeppieri, M., Salvétat, M., Beltrami, A., Cesselli, D., Russo, R., Alcalde, I., Merayo-Llves, J., Brusini, P., Parodi, P., 2017. Adipose derived stem cells for corneal wound healing after laser induced corneal lesions in mice. *J. Clin. Med.* 6, 115. <https://doi.org/10.3390/jcm6120115>.
- Zeppieri, M., Salvétat, M.L., Beltrami, A.P., Cesselli, D., Bergamin, N., Russo, R., Cavaliere, F., Varano, G.P., Alcalde, I., Merayo, J., Brusini, P., Beltrami, C.A., Parodi, P.C., 2013. Human adipose-derived stem cells for the treatment of chemically burned rat cornea: preliminary results. *Curr. Eye Res.* 38, 451-463. <https://doi.org/10.3109/02713683.2012.763100>.



Article

Polymerizable Skin Hydrogel for Full Thickness Wound Healing

Mairobi Persinal-Medina ^{1,2} , Sara Llamas ^{1,3,4,5,*} , Manuel Chacón ^{1,2}, Natalia Vázquez ^{1,2} ,
Marta Pevida ^{1,2,3,4}, Ignacio Alcalde ^{1,2} , Sergio Alonso-Alonso ^{1,2} , Laura María Martínez-López ⁶ ,
Jesús Merayo-Llones ^{1,2} and Álvaro Meana ^{1,2,3,4}

- ¹ Instituto Universitario Fernández-Vega, Fundación de Investigación Oftalmológica, Universidad de Oviedo, 33012 Oviedo, Spain; mairbimedina@gmail.com (M.P.-M.); m.chacon@fio.as (M.C.); natalia.vazquez@fio.as (N.V.); marta.pevida@cruzroja.es (M.P.); nacho.alcalde@fio.as (I.A.); sergio.alonso@fio.as (S.A.-A.); merayo@fio.as (J.M.-L.); meana@fio.as (Á.M.)
- ² Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), 33011 Oviedo, Spain
- ³ Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER) ISCIII, 28029 Madrid, Spain
- ⁴ Unidad de Ingeniería Tisular, Centro Comunitario Sangre y Tejidos de Asturias (CCST), 33006 Oviedo, Spain
- ⁵ Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD), 28015 Madrid, Spain
- ⁶ Instituto Oftalmológico Fernández-Vega, 33012 Oviedo, Spain; laura.martinez@fernandez-vega.com
- * Correspondence: llamescst@yahoo.es; Tel.: +34-985-232-426

Abstract: The skin is the largest organ in the human body, comprising the main barrier against the environment. When the skin loses its integrity, it is critical to replace it to prevent water loss and the proliferation of opportunistic infections. For more than 40 years, tissue-engineered skin grafts have been based on the in vitro culture of keratinocytes over different scaffolds, requiring between 3 to 4 weeks of tissue culture before being used clinically. In this study, we describe the development of a polymerizable skin hydrogel consisting of keratinocytes and fibroblast entrapped within a fibrin scaffold. We histologically characterized the construct and evaluated its use on an in vivo wound healing model of skin damage. Our results indicate that the proposed methodology can be used to effectively regenerate skin wounds, avoiding the secondary in vitro culture steps and thus, shortening the time needed until transplantation in comparison with other bilayer skin models. This is achievable due to the instant polymerization of the keratinocytes and fibroblast combination that allows a direct application on the wound. We suggest that the polymerizable skin hydrogel is an inexpensive, easy and rapid treatment that could be transferred into clinical practice in order to improve the treatment of skin wounds.

Keywords: skin regeneration; tissue engineering; cellular therapy; hydrogel



Citation: Persinal-Medina, M.; Llamas, S.; Chacón, M.; Vázquez, N.; Pevida, M.; Alcalde, I.; Alonso-Alonso, S.; Martínez-López, L.M.; Merayo-Llones, J.; Meana, Á. Polymerizable Skin Hydrogel for Full Thickness Wound Healing. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 4837. <https://doi.org/10.3390/ijms23094837>

Academic Editor: Bum-Ho Bin

Received: 6 April 2022

Accepted: 26 April 2022

Published: 27 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The skin is the largest organ of the body accounting for about 15% of the total body weight in adults [1]. Skin performs many vital functions including protection (UV light absorption, pathogens, mechanical), perception (touch, temperature, pain) and regulation (thermal, hydration, excretion) [2]. Skin injuries caused by burns, chronic ulcers and genetic or somatic diseases cause loss of skin integrity that compromises the skin barrier and impairs its physiological functions; requiring effective treatment to prevent morbidity and mortality [3]. In cases where a significant amount of skin tissue is lost due to injury, it is essential to replace it to prevent water loss and to mitigate the risk of opportunistic pathogens that could lead to infections. The World Health Organization (Geneva, Switzerland) estimates that nearly 11 million burn injuries per year worldwide require medical attention, with approximately 180,000 leading to death [4,5].

To restore damaged skin, different skin models developed by tissue engineering are used [6]. Since keratinocytes were successfully cultured in the laboratory 40 years ago [7], the transplant of autologous keratinocyte sheets became a relatively common clinical practice, however it still presents many limitations that prevent its worldwide adoption:

fragility, difficult handling, unpredictable take rate, high cost and sensitivity to mechanical forces due to the lack of a dermal component [8,9]. In the following years, the development of bilayer skin substitutes was attempted in order to mitigate these limitations. Each bilayer skin substitute model has its own characteristics but all of them have in common a first epithelial layer and a second dermal layer below it. The dermal component of these substitutes can be composed of synthetic substrates [6], acellular protein matrix [10,11], decellularized dermis [12] or fibroblasts dispersed within protein scaffold [13]. In the last case, fibrin, a component derived from blood plasma, has been widely used as a scaffold to develop human dermis equivalents, having the advantages of low price, high availability and good tolerance to keratinocytes and fibroblasts [14,15]. Additionally, fibrin can be produced as an autologous scaffold [16]. However, these bilayer approaches require incubation periods ranging from 3 to 4 weeks to form a fully differentiated epithelium prior to transplant.

Guided by our experience producing skin equivalents based on plasma for human transplantation [17–21], we attempt to produce a completely autologous polymerizable skin that can be fabricated directly onto the wound bed. Moreover, the thickness of this hydrogel does not limit its nutrition from the vascular network present in the wound bed.

Polymerizable hydrogels are gaining much recent attention due to their soft properties similar to extracellular matrix, adjustable physical and chemical properties, and their ability to fill any irregular shape wound [22]. They can keep wounds moist, absorb excess tissue exudate, allow gas permeation, rehydrate eschar, aid in autolytic debridement, protect wounds against infection, scavenge free radicals [23] and can act as a reservoir for therapeutic agents or other chemical substances [24,25].

In this study, we have developed a two-component hydrogel, consisting of thrombin concentrate (polymerization-inducing agent) and fibrinogen (clotting component). This system allows the hydrogel to be stably deposited on the wound bed and to instantaneously polymerize. Here, we describe our proof-of-concept study to engineer human skin in a layer-by-layer assembly process using fibroblasts and keratinocytes as representative cell types. We proved that this polymerizable skin hydrogel can be applied directly onto the wound, avoiding the previous culturing and differentiation processes of conventional skin equivalents, and decreasing the cost-effectiveness ratio by reducing the time of skin production. We present a novel fully autologous approach in which all its components could be easily obtained from the patient itself. We show the outcome of the *in vitro* results of this new model of polymerizable human skin hydrogel, as well as a histological study of the wound healing animal model treated with this hydrogel.

2. Results

2.1. Analysis of Thrombin Concentrate and Fibrinogen Samples

Thrombin activity and fibrinogen concentration were quantified. The stability of these two parameters after freezing and thawing at different times was also studied.

The average concentration of fibrinogen in the FFPs was 1.92 ± 0.51 g/L. The average enzymatic activity in the thrombin concentrate was 2225.02 ± 952.00 UI/mL, and the pH was kept close to 7.0 in all cases. Thrombin concentrate activity and fibrinogen concentration did not show any significantly statistical difference after freeze storage at -80 °C up to 30 days (Figure 1).

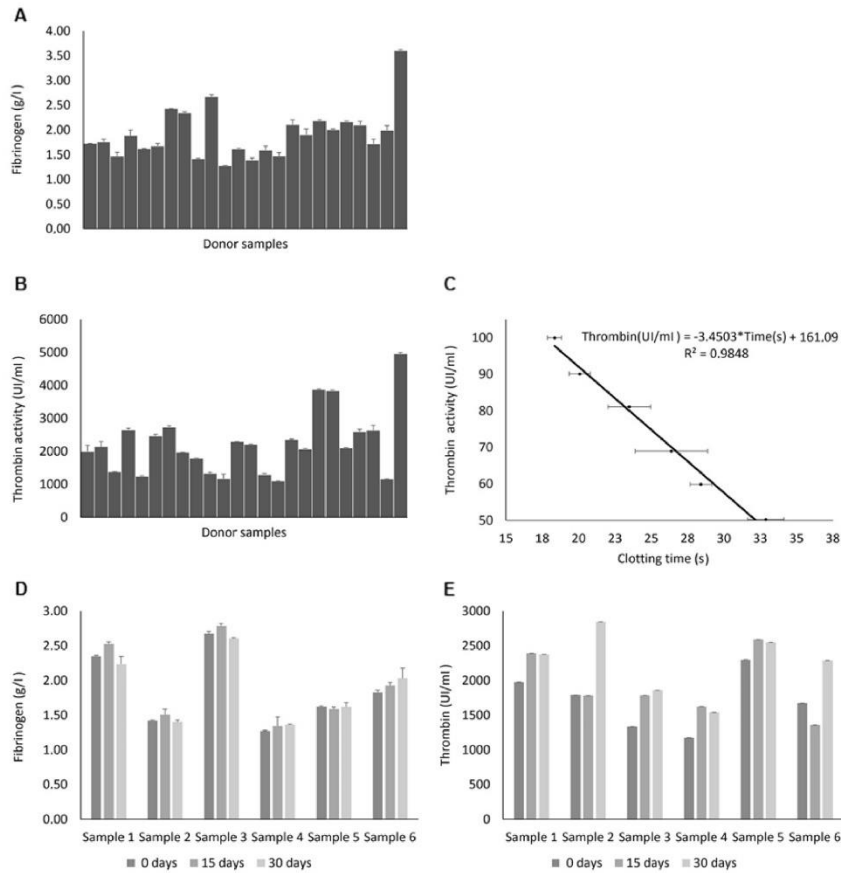


Figure 1. Analysis of thrombin concentrate and fibrinogen samples. (A) Fibrinogen concentration (g/L) in each FFP used. (B) Enzymatic activity (UI/mL) in each thrombin concentrate produced. (C) Standard curve used to calculate the enzymatic activity of each thrombin concentrate [y (UI/mL) = $-3.4503 \times x$ (s) + 161.09]. (D) Fibrinogen concentration (g/L) variation after storage at -80°C and thawing at different times up to 30 days. Samples did not show a significant depletion ($p > 0.05$). (E) Enzymatic activity (UI/mL) variation after storage at -80°C and thawing at different times up to 30 days. Samples did not show a significant depletion ($p > 0.05$). Data expressed as mean \pm SD.

2.2. Viability Assay

Thrombin concentrate and fibrinogen toxicities were studied in fibroblasts. Neither thrombin concentrate nor fibrinogen significantly reduced cell viability in fibroblasts after 24 h exposure (Control: $98.16 \pm 2.03\%$; Thrombin concentrate: $83.93 \pm 21.43\%$; Fibrinogen: $98.64 \pm 1.36\%$). Moreover, there was no statistical difference between cell densities after the exposure period between any group (Control: 271 ± 27 cells/cm²; Thrombin concentrate: 242 ± 29 cells/cm²; Fibrinogen: 232 ± 20 cells/cm²) (Table 1).

Table 1. Viability assay. Fibroblasts viability and cell density after being cultured in the presence of thrombin concentrate and fibrinogen. Samples prepared from FFPs did not show toxicity in fibroblasts since the number of cells per cm² and the cell viability did not decrease significantly.

Group	Cell Viability (%)		Cell Density (Cells/cm ²)	
Control	98.16 ± 2.03		271 ± 27	
Thrombin Concentrate	83.92 ± 21.43	<i>p</i> > 0.05	242 ± 29	<i>p</i> > 0.05
Fibrinogen	98.64 ± 1.36		232 ± 20	

2.3. Polymerizable Hydrogel Formation

The fibrinogen could not form fibrin hydrogels in the absence of thrombin. The time of polymerization was less than the sensitivity of the fibrin timer (≤ 5 s) after mixing fibrinogen with the thrombin concentrate.

2.4. In Vitro Fabrication of Polymerizable Skin Hydrogel

Both skin hydrogel polymerization and cell growth were analyzed in vitro.

Polymerizable skin hydrogels fabricated with thrombin concentrate were not homogeneous. The rapid speed of polymerization caused bulges on the surface of the gels. So thrombin concentrate diluted 1:10 in calcium buffer, was used for the following experiments. Polymerizable skin hydrogels fabricated with diluted thrombin concentrate, were homogeneous, attached to the transwell membrane and did not retract during the culture period or during the air-liquid interface phase.

The immunofluorescence studies showed that the keratinocyte hydrogel layer appeared firmly attached to the fibroblast-containing fibrin hydrogel. Both keratinocytes and fibroblasts were viable and grew in their respective layers occupying the entire surface homogeneously (Figure 2).

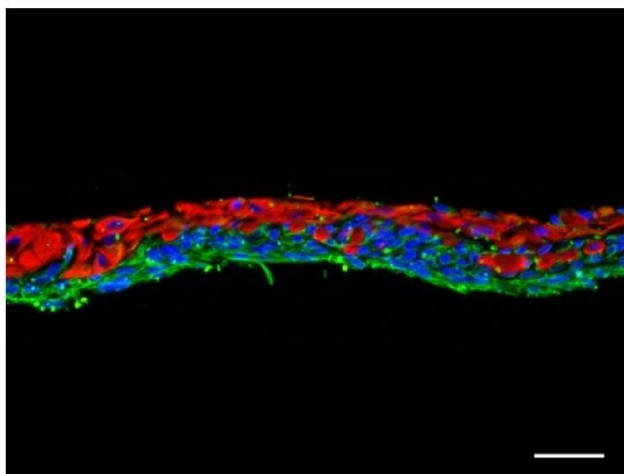


Figure 2. Immunofluorescence study of skin hydrogels fabricated in vitro after 7 days of air-liquid culture. Continuous keratinocyte layer (in red, excitation/emission: 480/527, labelled with anti-human high molecular weight cytokeratin antibody) firmly attached to the underlying fibroblasts-containing hydrogel. Fibroblasts (in green, excitation/emission: 360/470, labelled with anti-vimentin antibody) grew homogeneously across the dermal layer. Scale bar: 50 μ m.

2.5. In Vivo Fabrication of Polymerizable Skin Hydrogel

Both skin hydrogel polymerization and wound healing were analyzed in vivo.

Polymerizable skin hydrogels fabricated with diluted thrombin concentrate were not able to attach to the wound bed. The polymerization time was very slow and no adhesion to the surrounding tissue was observed. The hydrogel was spilled on the back of the mice, not being able to remain in the wound until coagulation was completed.

In contrast polymerizable skin hydrogel fabricated with thrombin concentrate adhered to the wound bed and its edges, and did not show any detachment before being covered with the devitalized skin in any case. The devitalized skin shrank and spontaneously detached from back of the mouse 14–21 days after transplant. After detachment of the devitalized skin, the regenerated human skin appeared darker and thinner than the surrounding tissue. The skin was completely regenerated, and the wounds were healed and closed in all cases (Figure 3). The control group (hydrogel without human cells) showed no difference with respect to the group treated with the polymerizable skin in terms of wound healing time.

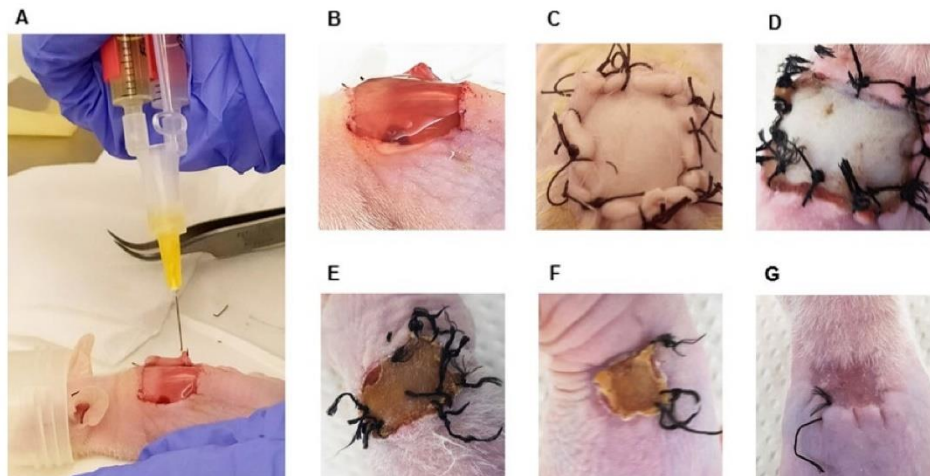


Figure 3. In vivo fabrication of polymerizable skin hydrogel. (A) In vivo extrusion of the polymerizable skin hydrogel. (B) Extruded hydrogel on the wound bed at room temperature remained stable without leaking. (C) Devitalized murine skin sutured to the dorsum of the mouse after surgery. (D–F) Wound healing follow-up. Devitalized skin shrank and detached gradually from the back of the mouse. (G) Regenerated human skin in the back of the athymic mouse. Wound completely healed after 21 days.

The immunohistochemical study of the group treated with the polymerizable skin showed the formation of a keratinized epithelium over a dermal layer, which were recognized by human specific anti-involucrin, anti-cytokeratin 10 and anti-vimentin antibodies. Cytokeratin 10 and involucrin were expressed in the spinous, granulous and corneal layers and vimentin was expressed in the human fibroblasts located in the dermis. Immunohistochemical studies of control group (treated with hydrogel without human cells) revealed, as expected, absence of labelling for the aforementioned antibodies (Figure 4).

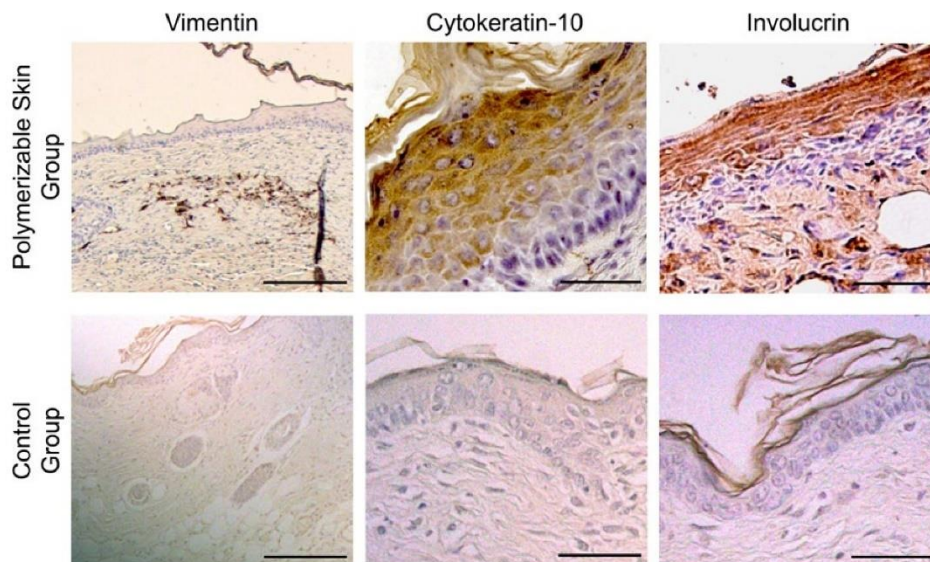


Figure 4. Immunohistochemistry study of the regenerated skin in athymic mouse. 21 days after treatment with the polymerizable skin hydrogel, the human regenerated skin showed positive labelling for involucrin and cytokeratin 10 in the suprabasal layers. Vimentin labelled full thickness of human dermis and some cells located into the dermis of the grafted area. Scale bars: 50 μ m. Vimentin scale bar: 200 μ m. In the control group (hydrogel without human cells) wound closure is achieved by murine cells from the wound edges. Biopsies from the treated area showed no labelling for the antibodies used.

3. Discussion

This study shows the development of a new polymerizable skin hydrogel based on FFP and containing both dermal and epidermal cells. This hydrogel can be applied directly over a wound bed thanks to the rapid polymerization and allows skin regeneration in a full thickness wound model. The polymerizable skin hydrogel described here opens the possibility of a complete autologous system in which all the components (fibroblasts, keratinocytes, fibrinogen and thrombin concentrate) come from the patient themselves.

Clotted plasma is the naturally occurring temporary wound cover involved in efficient re-epithelization and connective-tissue reorganization [17]. Plasma factor I (fibrinogen) is a polymerizable protein, and it represents the clotting fraction, while plasma factor IIa (thrombin) is a serine protease that converts soluble fibrinogen into insoluble fibrin strands. Both fibrinogen and thrombin are medical products commonly used in clinical practice. The use of FFP to obtain both components of the hydrogel has the advantage of being cheap, readily available and could prevent the transmission of communicable diseases and immunological reactions if it is obtained from an autologous origin [14–16]. Additionally, fibrinogen and thrombin concentrate can be stored with high stability for future use if the patient requires several procedures. These results are consistent with previous studies [26–28], where it was proven that coagulation factors are stable when stored at temperatures lower than -20°C for 24 months without significant changes in most coagulation factors including the fibrinogen and the thrombin, allowing the preservation of this biomaterials for long periods of time.

Neither viability nor cell density was impaired in the presence of fibrinogen or thrombin concentrate. We must recognize that these studies were performed only with dermal fibroblasts because keratinocytes cannot be cultured in the absence of feeder cells, and the latter could invalidate the results by not being able to be distinguished from the keratinocytes. Nevertheless, the fact that the keratinocytes remained in the wound and were able to regenerate human skin in the murine wound healing model suggests that the viability of these cells has not been affected.

In previous models of bioengineered skin based on clotted plasma, coagulation is obtained by recalcification which usually takes between 15–30 min, is temperature dependent (it does not occur at temperatures $<37^{\circ}\text{C}$) [13,17,29,30] and constitutes solely the dermal layer. In a secondary step, keratinocytes need to be cultured over the fibroblasts-containing fibrin dermal equivalent, covered with culture medium and cultured for several days prior to its use [13,17]. The polymerizable skin hydrogels described here consist of entrapped fibroblasts and keratinocytes on a fibrin substrate that are clotted using active thrombin concentrate, purified from FFP, in a process that last less than 5 s at room temperature. The fast polymerization of the skin hydrogel allowed it to fix itself to the edges of the wounds without any detachment, which would be impossible using calcium chloride.

The polymerizable skin model was able to support the proliferation of both cell types (fibroblasts and keratinocytes), both *in vitro* and *in vivo*. Cells grew and presented their characteristic morphology until the end of the culture as shown by immunohistochemical studies. Dispersedly distributed keratinocytes entrapped within the hydrogel were able to form a continuous cell layer over the dermal component as seen after 11 days of *in vitro* culture. Even though the level of differentiation was not the same as that observed in the *in vivo* model, this does not exclude this approach from being capable of providing viable cells to the wound bed, which can promote the correct formation of an epidermis *in vivo*, as showed after 21 days of maturation *in vivo*. These findings are consistent with those described by Mazlyzam [31] who demonstrated the formation of a living bilayer human skin equivalent fabricated with entrapped keratinocytes and fibroblasts on independent layers of human fibrin coagulated with calcium chloride.

As well as in previous bioengineered skin models, primary cultures of fibroblasts and keratinocytes must be performed in order to obtain a sufficient number of cells to generate the bioengineered skin or the polymerizable hydrogel. One of the advantages of this new polymerizable skin model is that it is rapidly used since it can be applied without the need for a secondary culture of keratinocytes over the fibroblast containing dermal matrix. In contrast with previous models in which, this secondary cultivation would take at least 10 additional days.

The concentrated thrombin showed such a fast polymerization rate that it was difficult to deposit the polymerizable skin hydrogel homogeneously on the flat, dry transwell surface. By diluting the thrombin concentrate we were able to slow down the polymerization rate to suit our needs. In the *in vivo* fabrication model, it was decided to use the thrombin concentrate directly to be able to apply the polymerizable skin hydrogel to an irregular, convex and wet wound surface without spilling it. In this case, the polymerizable skin hydrogels were produced by a similar method to the ones that are used to generate fibrin glues, which are characterized by their high adhesion forces [32] and already showed to be of good use in oral and maxillofacial surgeries [33,34], ophthalmological surgeries [35,36] and to prevent bleeding after gastric endoscopic dissection [37].

The regenerated tissue obtained after implantation of the polymerizable skin hydrogel in a full-thickness wound model showed complete maturation and integration in the host tissue despite not being cultured prior to transplantation as evidenced by the immunohistochemistry results. Human fibroblasts are disseminated in the murine dermis, contributing together with recipient's cells, to dermal regeneration. Epithelial cells were surrounded by the host tissue, and the regenerated epithelium presented the four strata of a normal skin (basal, spinous, granular and corneum strata) as evidenced by the suprabasal layers labelled with cytokeratin 10 and involucrin.

We found no difference in wound healing time between the control group and the polymerizable skin group. This could be attributed to a non-critical wound size, resulting in wound closure due to natural contraction during the healing process. In addition, the plasma hydrogel provides a whole-blood set of cytokines, attachment factors and platelet-derived growth factors that make these plasma-based scaffolds offer a highly proliferative environment for epithelial cells [17] present in the wound edges. Animal models of wound healing do not represent a real clinical situation, since wounds are created de novo and the wound bed is in an optimal situation. Animal models of chronic wounds are very complex to simulate and even more so with athymic animals.

However, in a real clinical situation, a complete healing of the wound would not be achieved with the plasma hydrogel alone. Epithelial stem cells are needed not only to promote wound closure, but also to remain on-site and renew the epithelium throughout the life of the individual. Fibroblasts also play an important role since they collaborate on extracellular matrix and connective tissue formation. Fibroblasts are capable of producing and secreting metalloproteinases, collagen, fibronectin, proteoglycans and several growth factors (VEGF, FGF, PDGF) which are potent angiogenic factors [38].

At the clinical level one of the limitations of our method is that it requires as many cells as the methods previously described [13,17]. This is a major setback in the case of severe burn patients in which a great area of polymerizable skin hydrogel would have to be prepared. However, this will not be as limiting in the case of patients or lesions requiring small areas of polymerizable skin such as: wounds in patients suffering from epidermolysis bullosa, giant congenital nevus resections, chronic ulcers, lesions of the oral cavity, vaginal reconstruction, etc.

One of the advantages of this model is that it does not require adhesion to a solid support for its handling, like our previous model [17–21,39]. This makes it a much simpler model to handle as it can be applied with a conventional syringe.

An additional advantage of this polymerizable skin model for use in a clinical situation is its rapid polymerization. This characteristic can facilitate its application in humid regions with difficult topography such as the oral cavity and the vaginal area. In addition, it may avoid the use of splints and/or prostheses to keep the gel adhered to the wound bed during the wound healing period.

The polymerizable skin hydrogel model here described is based on a cell culture system that has been employed to treat burns for more than 40 years. In addition, FFP derived products used for this work have been shown to be safe for use in humans. For all these reasons, this product is closer to complying with all regulatory requirements in a shorter time frame and thus closer to being transferred to the patient's bedside.

Having a product, such as the one described in this study, which is easily applied directly into wounds, would result in an improvement in the current treatments for skin defects, not only because it would represent a faster and cheaper alternative to skin equivalents but also because it would ease the overall application of cell products on patients, finally resulting in the improvement of their quality of life.

4. Materials and Methods

4.1. Thrombin and Fibrinogen Preparation

Blood bags of 220–300 mL fresh frozen plasma (FFP) were obtained from 24 altruistic donors (between 25–65 years of age) from the regional blood and tissue bank (Centro Comunitario de Sangre y Tejidos, CCST, Asturias, Spain) according to the standards of the American Association of Blood Banks and European and Spanish laws and regulations.

FFP was thawed at 37 °C for 20–30 min and 20 mL was retained to use as the clotting component of the hydrogel (hereafter fibrinogen). The rest of the FFP was used to extract the thrombin concentrate by acid precipitation and defibrination with calcium according to the method described by Quarmby J et al. [40] with some modifications. Briefly, 200 mL of FFP was precipitated in 800 mL of 0.04% acetic acid, and the solution was centrifuged at 1500× g for 20 min at 21–23 °C. The pellet was resuspended in 20 mL calcium buffer that

contained 0.9% sodium chloride, 0.03% sodium bicarbonate and 25 mM calcium chloride, and then the mixture was vortex-mixed for 2 min and incubated at room temperature for 15 min. After incubation, the solution was filtered through a 40 μm nylon cell strainer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The precipitated fibrin retained in the filter was removed, and the thrombin concentrate was collected. The pH of thrombin concentrate in calcium buffer was measured with Fisherbrand™ pH Indicator Paper Sticks (Thermo Fisher Scientific).

Finally, both samples (fibrinogen and thrombin concentrate) were aliquoted and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further use.

4.2. Fibrinogen Quantification

Fibrinogen concentration was measured using the Clauss method [41], where 100 μL of fibrinogen samples were clotted in the presence of an excess of thrombin (200 μL of Multifibrin U® 50 UI/mL, Siemens AG, Munich, Germany) in a Behring Fibrintimer II (Dade Behring, Deerfield, IL, USA) at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. The clotting times were recorded in duplicate, and the fibrinogen concentration was calculated from a standard curve calculated using the data tables provided by the kit's manufacturer (Siemens AG).

4.3. Thrombin Activity Quantification

The thrombin activity was determined as follows: 100 μL of 2.11 g/L fibrinogen was clotted by adding 200 μL of thrombin concentrate samples diluted with calcium buffer (1:5 to 1:40) in a Behring Fibrintimer II at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. The clotting times between 18–35 s were recorded in duplicate, and the thrombin activity was calculated from a standard curve set up by clotting 100 μL of 2.11 g/L fibrinogen with different thrombin activities (from 50 to 100 UI/mL).

4.4. Stability Study

Effects of freezing and frozen storage of thrombin concentrates and fibrinogen were analyzed by storing them at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. For this purpose, fibrinogen concentrations ($n = 6$) and thrombin activities ($n = 6$) were measured after 15 and 30 days of frozen storage as previously described.

4.5. Primary Cultures of Keratinocytes and Fibroblasts

The present research was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Principado de Asturias (Protocol Code: 2020.50; 23 March 2020). For this study, three skin biopsies of 2–3 cm^2 were obtained from deceased organ donors after informed written consent following Spanish laws in organ and tissue donation.

Keratinocytes and fibroblasts were cultured following previously described methods [7] with slight modifications by our laboratory [13,17]. Keratinocytes were cultured in presence of lethally irradiated 3T3 feeder cells. The keratinocyte culture medium was a mixture of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific) and Ham's F12 (F12, Thermo Fisher Scientific) (2:1) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin, 0.10 g/L streptomycin, 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin, 8.33 ng/mL cholera toxin, 0.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hydrocortisone, 1.30 ng/mL triiodothyronine, and 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ adenine (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA). The keratinocyte medium was replaced every three days, and 10 ng/mL epidermal growth factor (EGF) (Sigma-Aldrich) was added since the first replacement. The fibroblast culture medium was a mixture of DMEM and F12 (2:1) supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin and 0.10 g/L streptomycin and was replaced every three days. Both cultures were incubated in a humidified 5% CO_2 atmosphere at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ until confluence (7–12 days). Cultures were amplified to obtain a sufficient number of cells to carry out the experiments (7–12 days).

4.6. Viability Assay

Thrombin concentrate and fibrinogen toxicities were studied in fibroblasts by a fluorescence viability test with propidium iodide (red fluorochrome) and Hoechst dye (blue fluorochrome). Dermal fibroblasts were seeded in a 6-well plate (Thermo Fisher Scientific) and cultured until 70–80% confluent. Next, thrombin concentrate and fibrinogen were thawed at 37 °C, and separately diluted in culture medium at 1:1. Then, fibroblasts were incubated with 100 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ of culture medium ($n = 4$, control group), thrombin concentrate ($n = 4$, thrombin concentrate group) or fibrinogen ($n = 4$, fibrinogen group) for 24 h.

After incubation, cells were washed in PBS and stained with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ propidium iodide (Thermo Fisher Scientific) and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst staining (Thermo Fisher Scientific) in DMEM:F12 (2:1) for 30 min at 37 °C. Finally, cells were examined under a DM6000B fluorescence microscope (Leica, Wetzlar, Germany) and photos were taken in triplicate using a DFC310 FX camera (Leica) at $\times 400$ magnification. Next, red and blue nuclei were counted by a single blinded researcher using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). To assess toxicity, cell density and cell viability were calculated according to the following formulas.

$$\text{Cell density (cells/cm}^2\text{)} = \frac{\text{blue nucleus}}{\text{Image area (cm}^2\text{)}}$$

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{(\text{blue nucleus} - \text{red nucleus})}{\text{blue nucleus}} \times 100$$

4.7. Preparation of Polymerizable Hydrogel

The polymerization time of the hydrogel was measured as follows: 150 μL of fibrinogen and 150 μL of thrombin concentrate were mixed in a Behring Fibrintimer II, the clotting times were recorded in duplicate.

Keratinocyte and fibroblast cell cultures were treated with trypsin-EDTA, centrifuged ($400 \times g$, 10 min) and counted. Keratinocytes were resuspended in 2 mL of fibrinogen at 3×10^6 cells/mL, and then, the fibroblasts were resuspended in 2 mL of fibrinogen at 3.7×10^5 cells/mL. The cell suspensions were drawn into 2 mL syringes (BD Biosciences, CA, USA).

Thrombin concentrate was used at normal concentration and also diluted (1:10) in calcium buffer. To prepare the polymerizable hydrogel, one syringe containing thrombin and one containing fibrinogen/cells (either fibroblasts or keratinocytes) were connected to a single 25 G needle (BD Biosciences), and syringes were simultaneously extruded.

4.8. In Vitro Fabrication of Polymerizable Skin Hydrogel

To fabricate the in vitro skin hydrogel, 0.15 mL/cm² of thrombin concentrate, or 0.15 mL/cm² of diluted 1:10 thrombin concentrate, and fibroblast-containing fibrinogen (hereafter dermal layer) were extruded on a 24 mm Corning® Transwell® permeable support (Sigma-Aldrich). The plate was transferred to the incubator to coagulate (5–10 min at 37 °C). Then, 0.05 mL/cm² of thrombin concentrate, or 0.05 mL/cm² of diluted 1:10 thrombin concentrate and keratinocyte-containing fibrinogen (hereafter epidermal layer) was extruded over the dermal layer. The plate was transferred again to the incubator to coagulate (5–10 min at 37 °C). Hydrogels were then covered with keratinocyte culture medium supplemented with 1.5 mg/mL tranexamic acid (B. Braun Medical S.A., Rubí, Spain), and incubated in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37 °C for 3–4 days. Next, polymerizable skin hydrogels were maintained at the air–liquid interface for 7 days in the keratinocyte culture medium supplemented with 1.5 mg/mL tranexamic acid and 10 ng/mL EGF (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), to enhance stratification of the epithelium. Samples were finally fixed in 4% paraformaldehyde for subsequent immunofluorescence analysis.

4.9. *In Vivo* Fabrication and Transplant of Polymerizable Skin Hydrogel

Immunodeficient athymic nude mice (N = 6, male, 6–7 weeks, 25–30 g) were purchased from Charles River Laboratories (Ecully, France) and kept and used at the Animal Experimental Centre of the University of Oviedo (Asturias, Spain) in pathogen-free conditions. All animal experiments were approved by the competent regional authorities (Spanish registration code PROAE 21/2019) and were conducted according to European and Spanish laws and regulations.

Polymerizable skin hydrogel was extruded on the back of each mouse, previously anaesthetized with 2% isoflurane, by the methodology described in the previous section. Briefly, a 4.5 cm² full thickness circular wound was performed on the back of each mouse and the skin was removed and devitalized by three cycles of freezing and thawing (grafting protocol commonly used by our group) [42]. Next, dermal layer and epidermal layer were extruded on the wound bed (polymerizable skin group, *n* = 3), and the polymerizable skin hydrogel was protected from traumas by covering it with the devitalized mouse skin as biological bandage and sutured with a 4-0 nylon suture. A control group (*n* = 3) underwent the same procedure but used only the polymerizable hydrogel, without human skin cells.

Examinations were performed on each mouse on a weekly basis and pictures of the grafted site were taken during the follow-up period. Finally, mice were euthanized by CO₂ inhalation and tissue samples were harvested and fixed in 4% paraformaldehyde for subsequent immunohistochemical analysis.

4.10. Immunofluorescence

In vitro polymerizable skin hydrogels were embedded in paraffin, sectioned and stained with anti-human high molecular weight keratin antibody (1:40, clone 34E12, Dako, CA, USA) and anti-human vimentin (1:100, clone SP20, Abcam, Cambridge, UK). Deparaffinized tissue sections (5 µm) were rinsed with PBS solution twice for 10 min, and permeabilized in a PBS solution containing 0.3% Triton X-100 (Sigma Aldrich) for another 5 min. Following this, the samples were incubated at 4 °C overnight with primary antibodies (1:100) containing 10% normal goat serum (Fischer Scientific, Hampton, NH, USA) as a blocking agent. After several washes, samples were incubated with corresponding secondary antibodies (1:500) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for 2 h at room temperature, and were finally stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to allow nuclei visualization. Photos were captured using the DM6000B fluorescence microscope (Leica) fitted with a DFC310FX camera (Leica).

4.11. Immunohistochemistry

The samples from athymic mice's grafted area (control and polymerizable skin groups) were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Deparaffinized tissue sections (5 µm) were rinsed with PBS solution twice for 10 min, incubated 5 min in 3% hydrogen peroxide (Sigma Aldrich) in absolute methanol (Sigma Aldrich) to inactivate endogenous peroxidases, and permeabilized in a PBS solution containing 0.3% Triton X-100 for another 5 min. Following this, the samples were incubated for 48 h at 4 °C with primary antibodies anti-human involucrin (1:100, clone SY5, Sigma Aldrich), anti-human keratin 10 (1:100, clone LH2, Abcam) or anti-human vimentin (1:100, clone SP20, Abcam), containing 10% normal goat serum as a nonspecific reaction blocking agent. Next, samples were incubated with the peroxidase-conjugated secondary antibody (1:200) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 2 h. Subsequently, the samples were incubated with 0.03% H₂O₂ (Vector Laboratories), 0.1% 3,3'-diaminobenzidine (Vector Laboratories) in 0.1 M PBS pH 7.4 for 10–20 s or until a brown precipitate appeared. Finally, nuclei were counterstained with haematoxylin and tissue slides were dehydrated, cleared, and mounted. Photos were captured using the DM6000B bright-field microscope (Leica) fitted with a DFC310FX camera (Leica).

4.12. Data Analysis

Graphic representations and linear regression were performed using Excel version 2016 (Microsoft®, Redmond, WA, USA), and statistical evaluation was performed using IBM SPSS Statistics version 22 (IBM Corp, Armonk, NY, USA). The normal distribution of tested values was assessed by the Shapiro–Wilk method. Significant differences among defined groups were tested using parametric tests, one-way ANOVA followed by a Student’s *t*-test (for stability study and the cell density in the viability assay) and using the non-parametric test Mann–Whitney U (for the cell viability in the viability assay). A difference at a level of $p < 0.05$ was considered to be statistically significant. The quantitative data is expressed as mean \pm SD.

5. Conclusions

In conclusion, the polymerizable skin hydrogel described in this work is a novel system based on techniques and products commonly used in tissue engineering. It is a simple, portable and affordable hydrogel that has a demonstrated ability to regenerate skin in a full thickness wound model. Moreover, the methodology and results of this work create the possibility of a completely autologous system in which all the components come from the patient themselves. For all the above-mentioned reasons, we suggest that this hydrogel could be used as an Advance Therapy Medical Product, fulfilling all the pertinent regulations, in a short period of time.

Author Contributions: Conceptualization, S.L., L.M.M.-L., J.M.-L. and Á.M.; Methodology and Investigation, M.P.-M., M.P. and I.A.; Formal Analysis, M.C., N.V., I.A. and S.A.-A.; Writing—Original Draft Preparation, M.P.-M.; Writing—Review and Editing, S.L., M.C., N.V. and Á.M.; Supervision, J.M.-L. and Á.M.; Funding Acquisition, J.M.-L. and Á.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Programa Jovellanos, Gobierno del Principado de Asturias, Fondo Europeo de desarrollo regional, Unión Europea (IDI/2017/000223). Instituto de Desarrollo económico del Principado de Asturias, Gobierno del Principado de Asturias, Fondo Europeo de Desarrollo regional, Unión Europea (IDE/2016/000189). Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), RD21/0017/0033, Red Española de Terapias Avanzadas (TERAV ISCIII), “NextGenerationEU. Plan de Recuperación Transformación y Resiliencia”.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Principado de Asturias (Protocol Code: 2020.50. 23 March 2020). The animal study protocol was approved by the Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Oviedo (PROAE 21/2019. 16 May 2019).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: All the obtained data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgments: Authors wish to thank Teresa Sánchez, Agustin Brea and the staff of the Oviedo University animal center for their assistance during the experiments; Authors would also like to thank the technical staff of the Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias for their help in obtaining the plasma and skin biopsies necessary for this work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kanitakis, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur. J. Dermatol.* **2002**, *12*, 390–391. [PubMed]
2. Lopez-Ojeda, W.; Pandey, A.; Alhaji, M.; Oakley, A.M. *Anatomy, Skin (Integument)*; Abai, B., Abu-Ghosh, A., Acharya, A.B., Acharya, U., Adhia, S.G., Aeby, T.C., Aeddula, N.R., Agarwal, A., Agarwal, M., Aggarwal, S., Eds.; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2020; ISBN NNBK430685.
3. Boyce, S.T.; Lalley, A.L. Tissue engineering of skin and regenerative medicine for wound care. *Burn. Trauma* **2018**, *6*, 4. [CrossRef] [PubMed]
4. Burns. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/burns> (accessed on 1 April 2022).

5. Peck, M.D. Epidemiology of burns throughout the world. Part I: Distribution and risk factors. *Burns* **2011**, *37*, 1087–1100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Vig, K.; Chaudhari, A.; Tripathi, S.; Dixit, S.; Sahu, R.; Pillai, S.; Dennis, V.A.; Singh, S.R. Advances in Skin Regeneration Using Tissue Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 789. [[CrossRef](#)]
7. Rheinwatd, J.G.; Green, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: The formation keratinin colonies from single cell is. *Cell* **1975**, *6*, 331–343. [[CrossRef](#)]
8. Wood, F.M.; Kolybaba, M.L.; Allen, P. The use of cultured epithelial autograft in the treatment of major burn injuries: A critical review of the literature. *Burns* **2006**, *32*, 395–401. [[CrossRef](#)]
9. Atiyeh, B.S.; Costagliola, M. Cultured epithelial autograft (CEA) in burn treatment: Three decades later. *Burns* **2007**, *33*, 405–413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Ma, L.; Gao, C.; Mao, Z.; Zhou, J.; Shen, J.; Hu, X.; Han, C. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4833–4841. [[CrossRef](#)]
11. Wang, Y.; Kim, H.-J.; Vunjak-Novakovic, G.; Kaplan, D.L. Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. *Biomaterials* **2006**, *27*, 6064–6082. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Badylak, S.F. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transpl. Immunol.* **2004**, *12*, 367–377. [[CrossRef](#)]
13. Meana, A.; Iglesias, J.; Del Rio, M.; Larcher, F.; Madrigal, B.; Fresno, M.F.; Martin, C.; San Roman, F.; Tevar, F. Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns* **1998**, *24*, 621–630. [[CrossRef](#)]
14. Ronfard, V.; Rives, J.M.; Neveux, Y.; Carsin, H.; Barrandon, Y. Long-term regeneration of human epidermis on third degree burns transplanted with autologous cultured epithelium grown on a fibrin matrix. *Transplantation* **2000**, *70*, 1588–1598. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Ahmed, T.A.E.; Dare, E.V.; Hincke, M. Fibrin: A versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2008**, *14*, 199–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Ruszymah, B.H.I. Autologous human fibrin as the biomaterial for tissue engineering. *Med. J. Malays.* **2004**, *59* (Suppl. B), 30–31.
17. Llamas, S.G.; Del Rio, M.; Larcher, F.; García, E.; Escamez, M.J.; Jorcano, J.L.; Holguín, P.; Meana, A. Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation* **2004**, *77*, 350–355. [[CrossRef](#)]
18. Llamas, S.; García, E.; García, V.; del Rio, M.; Larcher, F.; Jorcano, J.L.; López, E.; Holguín, P.; Miralles, F.; Otero, J.; et al. Clinical results of an autologous engineered skin. *Cell Tissue Bank.* **2006**, *7*, 47–53. [[CrossRef](#)]
19. Gómez, C.; Galán, J.M.; Torrero, V.; Ferreiro, I.; Pérez, D.; Palao, R.; Martínez, E.; Llamas, S.; Meana, A.; Holguín, P. Use of an autologous bioengineered composite skin in extensive burns: Clinical and functional outcomes. A multicentric study. *Burns* **2011**, *37*, 580–589. [[CrossRef](#)]
20. Llamas, S.; Recuero, I.; Romance, A.; García, E.; Peña, I.; Del Valle, A.F.; Meana, A.; Larcher, F.; Del Rio, M. Tissue-engineered oral mucosa for mucosal reconstruction in a pediatric patient with hemifacial microsomia and ankyloglossia. *Cleft Palate Craniofac. J.* **2014**, *51*, 246–251. [[CrossRef](#)]
21. Seira Gil, R.; Pagés, C.M.; Díez, E.G.; Llamas, S.; Fuertes, A.F.; Vilagran, J.L. Tissue-engineered oral mucosa grafts for intraoral lining reconstruction of the maxilla and mandible with a fibula flap. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **2015**, *73*, 195.e1–195.e16. [[CrossRef](#)]
22. Liang, Y.; Zhao, X.; Hu, T.; Chen, B.; Yin, Z.; Ma, P.X.; Guo, B. Adhesive Hemostatic Conducting Injectable Composite Hydrogels with Sustained Drug Release and Photothermal Antibacterial Activity to Promote Full-Thickness Skin Regeneration During Wound Healing. *Small* **2019**, *15*, e1900046. [[CrossRef](#)]
23. Yang, B.; Song, J.; Jiang, Y.; Li, M.; Wei, J.; Qin, J.; Peng, W.; Lasoas, F.L.; He, Y.; Mao, H.; et al. Injectable Adhesive Self-Healing Multicross-Linked Double-Network Hydrogel Facilitates Full-Thickness Skin Wound Healing. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 57782–57797. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Ganguly, S.; Das, P.; Itzhaki, E.; Hadad, E.; Gedanken, A.; Margel, S. Microwave-Synthesized Polysaccharide-Derived Carbon Dots as Therapeutic Cargoes and Toughening Agents for Elastomeric Gels. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 51940–51951. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Ganguly, S.; Das, P.; Das, T.K.; Ghosh, S.; Das, S.; Bose, M.; Mondal, M.; Das, A.K.; Das, N.C. Acoustic cavitation assisted de-stratified clay tactoid reinforced in situ elastomer-mimetic semi-IPN hydrogel for catalytic and bactericidal application. *Ultrason. Sonochem.* **2020**, *60*, 104797. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Koerner, K.; Stampe, D. Stability of blood coagulation factors in deep frozen fresh plasma by storage at –20 degrees C and –40 degrees C. *Infusionsther. Klin. Ernahr.* **1984**, *11*, 46–50.
27. Illert, W.; Butsch, H.; Nuber, D.; Howe, J.; Sanger, W.; Weidinger, S. Long-term storage multicenter study of fresh frozen plasma at –40 degrees C. A multicenter study on the stability of labile coagulation factors over a period of 3 years. *Infus. Ther. Transfus. Med.* **2001**, *28*, 189–194.
28. Ettinger, A.; Miklauz, M.M.; Hendrix, B.K.; Bihm, D.J.; Maldonado-Codina, G.; Goodrich, R.P. Protein stability of previously frozen plasma, riboflavin and UV light-treated, refrozen and stored for up to 2 years at –30 °C. *Transfus. Apher. Sci.* **2011**, *44*, 25–31. [[CrossRef](#)]
29. Quilez, C.; de Aranda Izuzquiza, G.; García, M.; López, V.; Montero, A.; Valencia, L.; Velasco, D. Bioprinting for Skin. *Methods Mol. Biol.* **2020**, *2140*, 217–228. [[CrossRef](#)]

30. Carriel, V.; Garzón, I.; Jiménez, J.-M.; Oliveira, A.-C.-X.; Arias-Santiago, S.; Campos, A.; Sánchez-Quevedo, M.-C.; Alaminos, M. Epithelial and stromal developmental patterns in a novel substitute of the human skin generated with fibrin-agarose biomaterials. *Cells Tissues Organs* **2012**, *196*, 1–12. [[CrossRef](#)]
31. Mazlyzam, A.L.; Aminuddin, B.S.; Fuzina, N.H.; Norhayati, M.M.; Fauziah, O.; Isa, M.R.; Saim, L.; Ruszymah, B.H.I. Reconstruction of living bilayer human skin equivalent utilizing human fibrin as a scaffold. *Burns* **2007**, *33*, 355–363. [[CrossRef](#)]
32. Sierra, D.H. Fibrin Sealant Adhesive Systems: A Review of Their Chemistry, Material Properties and Clinical Applications. *J. Biomater. Appl.* **1993**, *7*, 309–352. [[CrossRef](#)]
33. Whitman, D.H.; Berry, R.L.; Green, D.M. Platelet gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **1997**, *55*, 1294–1299. [[CrossRef](#)]
34. Matras, H. The use of fibrin sealant in oral and maxillofacial surgery. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **1982**, *40*, 617–622. [[CrossRef](#)]
35. Agarwal, A.; Kumar, D.A.; Jacob, S.; Baid, C.; Agarwal, A.; Srinivasan, S. Fibrin glue-assisted sutureless posterior chamber intraocular lens implantation in eyes with deficient posterior capsules. *J. Cataract Refract. Surg.* **2008**, *34*, 1433–1438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Romano, V.; Cruciani, M.; Conti, L.; Fontana, L. Fibrin glue versus sutures for conjunctival autografting in primary pterygium surgery. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2016**, *12*, CD011308. [[CrossRef](#)]
37. Tan, E.S.; Wang, H.; Lua, G.W.; Liu, F.; Shi, X.G.; Li, Z.S. Fibrin Glue Spray as a Simple and Promising Method to Prevent Bleeding after Gastric Endoscopic Submucosal Dissection. *Dig. Surg.* **2016**, *33*, 455–461. [[CrossRef](#)]
38. Perez-Basterrechea, M.; Esteban, M.M.; Alvarez-Viejo, M.; Fontanil, T.; Cal, S.; Pitiot, M.S.; Otero, J.; Obaya, A.J. Fibroblasts accelerate islet revascularization and improve long-term graft survival in a mouse model of subcutaneous islet transplantation. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0180695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Meana, A.; Iglesias, J.; Madrigal, B.; Sanchez, J. Use of cyanoacrylate glue to prepare cultured keratinocyte sheets for grafting. *Burns* **1997**, *23*, 645–646. [[CrossRef](#)]
40. Quarmby, J.W.; Engelke, C.; Chitolie, A.; Morgan, R.A.; Belli, A.M. Autologous thrombin for treatment of pseudoaneurysms. *Lancet* **2002**, *359*, 946–947. [[CrossRef](#)]
41. Clauss, A. Gerinnungsphysiologische schnellmethode zur bestimmung des fibrinogens [Rapid physiological coagulation method in determination of fibrinogen]. *Acta Haematol.* **1957**, *17*, 237–246. [[CrossRef](#)]
42. Del Rio, M.; Jorcano, J.L.; Larcher, F.; Serrano, F.; Meana, A.; Muñoz, M.; Garcia, M.; Muñoz, E.; Martin, C.; Bernad, A. A preclinical model for the analysis of genetically modified human skin in vivo. *Hum. Gene Ther.* **2002**, *13*, 959–968. [[CrossRef](#)]

Article

A Simple, Safe, and Effective Method for Preparing Autologous Bio-Based Fibrin Glue for Ophthalmic Use

Luis Fernández-Vega-Cueto ^{1,2,†}, Mairubi Persinal-Medina ^{2,3,†}, Natalia Vázquez ^{2,3}, Manuel Chacón ^{2,3}, Belén Alfonso-Bartolozzi ^{1,2}, Sergio Alonso-Alonso ^{1,2}, Teresa Sánchez ⁴, Silvia Berisa-Prado ¹, Laura María Martínez-López ¹, Jesús Merayo-Llves ^{2,3} and Álvaro Meana ^{2,3,5,*}

¹ Instituto Oftalmológico Fernández-Vega, Avenida Doctores Fernández-Vega, 33012 Oviedo, Spain

² Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Avenida del Hospital Universitario, 33011 Oviedo, Spain

³ Instituto Universitario Fernández-Vega, Fundación de Investigación Oftalmológica, Universidad de Oviedo, Avenida Doctores Fernández Vega, 33012 Oviedo, Spain

⁴ Unidad de Bioterio e Imagen Preclínica, Universidad de Oviedo, Avenida Julián Clavería, 33006 Oviedo, Spain

⁵ Unidad de Ingeniería Tisular, Centro Comunitario Sangre y Tejidos de Asturias (CCST), Unidad 714 CIBERFER, Calle Emilio Rodríguez Vigil, 33006 Oviedo, Spain

* Correspondence: meana@fio.as; Tel.: +34-985-24-01-41

† These authors contributed equally to this work.

Citation: Fernández-Vega-Cueto, L.; Persinal-Medina, M.; Vázquez, N.; Chacón, M.; Alfonso-Bartolozzi, B.; Alonso-Alonso, S.; Sánchez, T.; Berisa-Prado, S.; Martínez-López, L.M.; Merayo-Llves, J.; et al. A Simple, Safe, and Effective Method for Preparing Autologous Bio-Based Fibrin Glue for Ophthalmic Use. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 2325. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112325>

Received: 20 September 2022

Accepted: 26 October 2022

Published: 28 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: This study proposes a method to prepare autologous bio-based fibrin glue (FG) for use in ophthalmic surgery. FGs containing three fibrinogen concentrations and a thrombin concentrate were prepared using human blood from five donors (FG1: physiological fibrinogen concentration; FG2 and FG3: concentrated fibrinogen). The adhesion strength was tested, and the clinical safety and efficacy were studied in rabbit eyes in conjunctival surgery. A commercial FG was used as a control. From each donor, 2 mL of FG was prepared, containing 1 mL of 3.49 ± 0.78 (FG1), 17.74 ± 4.66 (FG2), or 47.46 ± 9.36 mg/mL (FG3) of fibrinogen and 1 mL of 2248.12 ± 604.20 UI/mL of thrombin. The average adhesion strength increased with the fibrinogen concentration, from 1.49 ± 0.39 kPa (FG1) to 3.14 ± 1.09 kPa (FG3). FG1 showed poor results when used for autograft adhesion. In contrast, the conjunctival autografts were successfully grafted using FG2 and FG3, revealing equivalent adhesion properties compared with commercial FG, but with less inflammation. In conclusion, FGs could be prepared on demand within minutes from small volumes of human blood, using a method that results in FGs which exhibit good adhesion capacity and are also safe and effective in a preclinical study.

Keywords: fibrin glue; tissue glue; sealant; tissue adhesive; ophthalmology

1. Introduction

Sutures are medical devices used to sew body tissues together to close an injury or a surgical incision. There are many suturing techniques and suture materials available; surgeons are responsible for selecting the appropriate choice in each case during clinical interventions. An ideal suture is one which is easily manageable, non-allergenic, and affordable, and does not promote post-surgical pain, inflammation, and infection [1].

In recent years, tissue adhesives (also known as tissue glues or sealants) have gained popularity in surgical procedures in order to replace sutures in certain situations, due to their ease of use, minimal pain to the patient, lack of tissue penetration, and rapid application in comparison to sutures [1–3]. For ophthalmic use, tissue adhesives are classified in two basic categories [1,4]: synthetic (commonly based on n-butyl-2-cyanoacrylates [5] and polyethylene glycol [6,7]) and biological (commonly based on fibrin [5,7,8]).

Synthetic adhesives are used due to their high adhesion strength, instant adhesion, and no risk of transmitting infectious agents. However, synthetic adhesives show higher cytotoxicity than biological adhesives, and when used often result in abnormal scarring because they are not easily degraded during the healing process [6]. On the other hand, biological adhesives are progressively degraded by cells without toxicity and are well tolerated in the eye [4,9,10]. In addition, biological adhesives show numerous advantageous properties compared with synthetic adhesives. They allow enough working time before polymerizing, are able to reach adequate adhesion strength to maintain wound integrity, induce less inflammation, and are clear enough to allow vision [1]. However, biological adhesives also present several downsides compared with synthetic adhesives, because biological adhesives may carry the risk of transferring infectious agents and show limited adhesion strengths [11]. Nevertheless, because in ophthalmology the demand of adhesion strength is low, biological adhesives represent a more interesting clinical tool than synthetic adhesives.

In recent years, bio-based fibrin glue (FG) adhesives have increasingly been used in different ocular procedures such as pterygium surgery, corneal flap tears and dislocations, treatment of corneal perforations and melts, or cataract and retinal surgeries [5,12,13]. These FGs include a fibrinogen component and a thrombin component, both prepared by processing plasma, which polymerize by mimicking the final steps of fibrin coagulation cascade [1]. Most of the FGs used in clinical practice are commercially available [9]; however, each one slightly differs in its composition (concentrations and excipients) and mechanisms of delivery. All commercially available FGs are made from human pooled plasma of different blood donors and contain high concentrations of fibrinogen (40–110 mg/mL [14]) which consequently produce firm clots [2]. However, the allogeneic origins and the high cost of these commercial adhesives represent the main limitations for their wide acceptance.

As alternatives to the use of expensive allogeneic FGs, non-commercial autologous FGs can be prepared by combining citrated blood plasma with calcium chloride [10,15,16]. However, physiological concentrations of fibrinogen and thrombin are variable in the population, and as result, autologous FGs have low adhesion strength, produce less firm clots, and the coagulation time is higher than in commercial FGs [10,15–17].

To increase adhesion strength, numerous techniques [18–23] have been used to prepare FG, either from allogeneic or autologous plasma. Fibrinogen can be concentrated from plasma by cryoprecipitation or chemical precipitation. Thrombin can be purified from plasma by chromatography or acid precipitation. Additionally, autologous serum can be used as the thrombin component.

In this study, we have developed a new method to prepare autologous FGs based on concentrated fibrinogen and thrombin using small amounts of human blood obtained by venipuncture. We describe the production method of FGs, the characterization of their mechanical properties, and the preclinical results after applications as conjunctival adhesives for autograft surgery in an animal model. Overall, we propose that, with the method described here, FGs could be manufactured in minutes in a hospital pharmacy prior to use in surgical procedures, representing a simple, safe, and effective alternative to commercial FGs.

2. Materials and Methods

2.1. Blood Collection

Whole human blood was collected from healthy volunteers ($n = 5$; age range 23–47 years) by venipuncture after obtaining written informed consent. From each donor, 140 mL of blood was collected into 9 mL tubes containing 3.8% (*w/v*) sodium citrate (Vacuette®, Greiner Bio-One, Madrid, Spain). Blood tubes were centrifuged at $580 \times g$ for 8 min at room temperature to separate the plasma.

2.2. Preparation of FGs

FGs were prepared at three different fibrinogen concentrations (FG1, FG2, and FG3), maintaining similar thrombin concentrations.

Isolation of thrombin. The thrombin solutions were prepared according to the method described by Quarmby J et al. [23], with some modifications. Briefly, 10 mL of plasma was diluted in 0.04% glacial acetic acid (1:4) (Guinama, Valencia, Spain) at room temperature, and the solution was centrifuged at $1500\times g$ for 20 min at 22 °C. The pellet was resuspended in 1 mL pH 6.5 buffer containing 0.9% sodium chloride, 0.03% sodium bicarbonate (Fagron Iberica SAU, Barcelona, Spain), and 25 mM calcium chloride (B. Braun Medical S.A., Barcelona, Spain). The mixture was vortex-mixed for 2 min, incubated at room temperature for 15 min to precipitate the fibrin, and filtered through a 40 μ m nylon cell strainer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The precipitated fibrin retained in the filter was removed, and the thrombin concentrate was collected and loaded into a 2 mL syringe (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Isolation of fibrinogen. To prepare FG1, 1 mL of plasma was directly loaded into a 2 mL syringe. To prepare FG2 and FG3, the fibrinogen was concentrated by the addition of protamine sulphate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), as described by Steven M. et al. [17]. Briefly, 10 mL of protamine sulphate (40 mg/mL) was added to 30 mL of plasma (final concentration 10 mg/mL) at room temperature, mixed, and centrifuged at $1000\times g$ for 5 min at 22 °C. After centrifugation, the supernatant was discarded, and the precipitate was dissolved in 3 mL (FG2) or 1 mL (FG3) of 0.2 M sodium citrate (37 °C, pH 7.4) (Guinama), and loaded into 2 mL syringes.

Fibrinogen and thrombin syringes were loaded in a dual-barrel 2 mL cartridge (ratio 1:1) with a mixing tip. As a control group for subsequent analysis, a commercially available FG was used as a reference (TISSEEL; Baxter, IL, USA).

2.3. Fibrinogen Quantification

Fibrinogen concentrations were measured in each FG group ($n = 5$) using the Clauss method [24] with an STA-Compact-Max² analyzer (Stago, Asnières sur Seine, France). All assays were performed according to the manufacturer's instructions, and the tests were run in duplicates.

2.4. Thrombin Activity Quantification

The thrombin activities were determined in each FG group ($n = 5$) on a Behring Fibrinometer II (Dade Behring, Deerfield, IL, USA). Firstly, a standard curve was constructed for known 100 μ L concentrations of human fibrinogen (2.11 mg/mL) with 200 μ L of commercial thrombin (Siemens AG, Munich, Germany) at different activities, from 50 to 100 UI/mL, at 37 °C. Then, the activity of thrombin's samples was determined in duplicate by adding 200 μ L of diluted (1:5 to 1:40) thrombin to 100 μ L of this fibrinogen. Finally, the thrombin activities were interpolated using the standard curve.

2.5. Adhesion Strength Measurement

The adhesion strengths of FGs ($n = 5$ for each group) and commercial FG were assessed in duplicate using the standard test method for strength properties of tissue adhesives in lap-shear by tension loading, following the methodology described by the American Society for Testing and Materials (ASTM) in designation F2255-05 [25]. Briefly, porcine skin was cut into strips, each approximately 5 cm long and 2.5 cm wide. FGs were applied (0.4 mL) to an area of 2.5 cm², as shown in Figure 1. The overlapping joint was formed and allowed to cure while being held in place with a 5 N weight for 15 min at 22 °C. Strips were inserted in an INSTRON 5548 Universal Testing System (Instron, Norwood, MA, USA) and pulled at a rate of 5 mm/min until the joint failed or tissue rupture occurred.

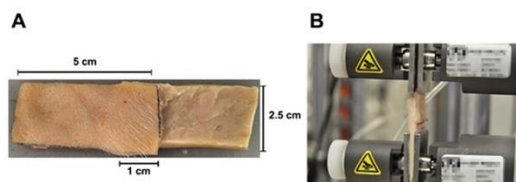


Figure 1. Adhesion strength assay. (A) Samples of porcine skins glued with FGs or commercial FG, indicating its dimensions (5 cm length, 2.5 cm width, and 1 cm overlap) according to the ASTM manual F2255-05 [25]. (B) Adhesion strength test. ASTM: American Society for Testing and Materials; FG: bio-based fibrin glue.

2.6. Preclinical Study

2.6.1. Animals

New Zealand white rabbits (males, 12 weeks, 3.5–4.0 kg) were purchased from Granja San Bernardo (Navarra, Spain). All the animals were treated in accordance with The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Resolution on the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. The protocols were approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Oviedo and the Animal Production and Health Service of Asturias (Spanish registration code PROAE 36/2019).

2.6.2. Surgical Procedure

FGs were tested as conjunctival adhesives for autograft surgery, involving the transference of a free graft of bulbar conjunctiva to cover the exposed scleral tissue [26]. The efficacy of the different FGs was evaluated in 4 animals per group.

Anesthesia:

All surgeries were performed under general anesthesia. Anesthesia was induced by the intravenous administration of 0.2 mg/kg medetomidine (Domtor®, Orion Corporation, Espoo, Finland) and 1–2 mg/kg diazepam (Valium® 10, Hoffmann-La Roche, Basilea, Switzerland); rabbits were maintained under 3% isoflurane inhalation. Additionally, double anesthetic colircusi® (0.1% tetracaine and 0.4% oxybuprocaine) was applied 10 min before the intervention (Colircusi®, Alcon Healthcare SA, Barcelona, Spain).

Receptor zone preparation:

The bare scleral bed was exposed by dissection of the temporal conjunctiva and the underlying Tenon's capsule, as described subsequently. A vasoconstrictive solution (1 mg/mL adrenaline, B. Braun Medical SA) was injected to balloon out the conjunctiva and Tenon's capsule, then excised with Wescott scissors, exposing a 4 × 5 mm bare scleral bed.

Graft dissection from donor zone:

A 5 × 6 mm free autograft was taken from the superior bulbar conjunctiva, marking the epithelial side and the juxtalimbar border to prevent graft inversion and disorientation. Vasoconstrictive solution (0.1 mL) was injected under the donor conjunctiva to balloon out the area of the autograft and separate it from the underlying Tenon's capsule. Subsequently, the conjunctiva was carefully dissected away from the Tenon's capsule, taking special care to prevent buttonholes and graft rollover.

Grafting using FGs and postsurgical care:

The graft was placed on top of the cornea, stretched, oriented, and then adhered on the bare scleral bed with 0.4 mL of FG as follows. A 0.2 mL volume of FG was applied on the bare sclera and spread out using a cannula, and the graft was immediately transferred onto the bare sclera. An additional 0.2 mL of FG was applied to the edges of the graft limiting with the healthy conjunctiva and the cornea. After a drying period of 5 min, passive blinking was induced to verify graft attachment. Finally, tarsorrhaphy was performed with 4-0 nylon suture to prevent ocular damages attributable to the animal behavior. Sutures were removed after 3 days and non-attached clots of FG were removed with

eye spears (Weck-Cel®, Medical Mix SLU) and balanced sterile saline washes (BSS®, Medical Mix SLU, Barcelona, Spain).

Postoperative treatment consisted of daily subcutaneous administration of antibiotic (5–10 mg/kg enrofloxacin; ALSIR®, Eucuphar, Barcelona, Spain) and analgesia (0.3 mg/kg meloxicam; Metacam®, Boehringer Ingelheim, Barcelona, Spain and 0.01–0.05 mg/kg buprenorphine; Bupaq®, Richter Pharma AG, Wels, Austria) for 7 days after surgery. Additionally, topical eye drops of antibiotic (0.3% tobramycin; Tobrex® Alcon Healthcare SA) and glucocorticoid (0.1% dexamethasone; Maxidex®, Alcon Healthcare SA) were administered thrice-daily from day 3 to day 14.

2.6.3. Clinical Follow-Up

All the rabbits were examined from the tarsorrhaphy opening until day 14. Clinical evaluation consisted of the evaluation of presence of FG residues, dehiscence, inflammation, hemorrhage, retraction, integration, and vascularization. At the end of follow-up, all rabbits were euthanized by sedation with medetomidine and diazepam (as described above), followed by an intravenous overdose of sodium pentobarbital. Finally, eyes were enucleated and fixed in 4% paraformaldehyde for 24 h for histological evaluation.

2.7. Histology

The grafted area was dissected from enucleated eyes after fixing. The samples were embedded in paraffin, and tissue sections (5 µm) were prepared. Deparaffinized tissue sections were stained with hematoxylin–eosin (H&E), dehydrated, cleared, and mounted for examination under a Leica DM6000B bright-field microscope fitted with a DFC310FX camera (Leica, Wetzlar, Germany). Moreover, an immunofluorescence against interleukin-6 (IL-6; Ref: ab6672, Abcam, Cambridge, UK) was performed. Briefly, deparaffinized tissue sections were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) solution twice for 10 min and permeabilized in a PBS solution containing 0.3% Triton X-100 for another 5 min. Next, the samples were incubated at 4 °C overnight with primary antibody (1:100) containing 10% normal goat serum (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) as a blocking agent. Immunolabeled cells were visualized by indirect immunocytochemistry and stained with 4', 6-DiAmidino-2-PhenylIndole (DAPI) to visualize nuclei. Samples were examined using a Leica DM6000B fluorescence microscope (Leica, Wetzlar, Germany). Tissue morphology, inflammatory reaction, vascularization, the presence of eosinophilic FG residues, granulation tissue, and scar formation were evaluated in each sample.

2.8. Data Analysis

Graphic representations and statistical evaluations were performed using IBM SPSS Statistics version 22 (IBM Corp, New York, NY, USA). The normal distribution of tested values was assessed by the Shapiro–Wilk method. Significant differences among defined groups were assessed using the Mann–Whitney U test. Significant differences were considered when $p < 0.05$. The quantitative data are expressed as the mean \pm SD.

3. Results

3.1. Characteristics of FGs

Thrombin and fibrinogen were successfully isolated and concentrated from single-donor blood samples following the methods described above.

Mean fibrinogen concentration values are shown in Figure 2A for each group. The mean fibrinogen concentration was 3.49 ± 0.78 mg/mL in FG1, 17.74 ± 4.66 mg/mL in FG2, and 47.46 ± 9.36 mg/mL in FG3. Statistically significant differences were shown for fibrinogen concentrations between FG1, FG2, and FG3 (p -values = 0.009). Moreover, statistically significant differences (p -values = 0.005) were shown between our FGs and the commercial FG (91 mg/mL) used as a control.

Thrombin was isolated, activated, and concentrated up to 2248.12 ± 604.20 IU/mL mean enzymatic activity (Figure 2B). Statistically significant differences (p -value = 0.005) were shown with the commercial FG (500.00 ± 0.00 IU/mL) used as a control.

Mean adhesion strength values are shown in Figure 3 for each group. Maximum adhesion strengths were achieved using the commercial FG (5.01 ± 2.12 kPa) used as a control, followed by FG3 (3.14 ± 1.09 kPa) and FG2 (2.41 ± 0.39 kPa), representing 62.8% and 48.2% of the mean adhesion strength of the commercial FG, respectively. FG1 exhibited statistically significantly lower adhesion strength (1.49 ± 0.39 kPa) than FG3 (p -value = 0.025) and the control group (p -value = 0.018). No other significant differences were found between the groups.

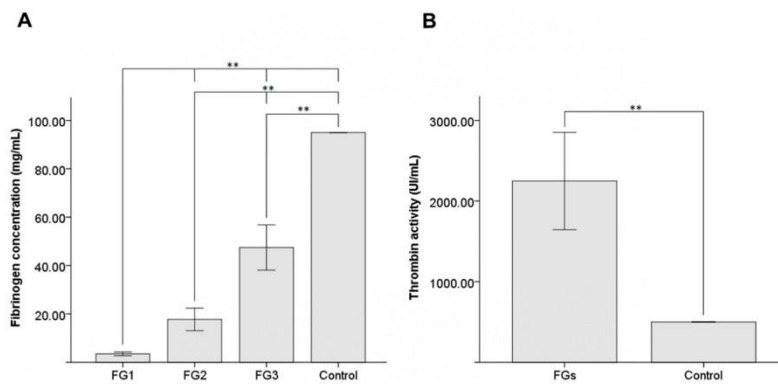


Figure 2. Mean fibrinogen concentration (A) and thrombin activity (B) obtained in FG1, FG2, and FG3, and a statistical comparison with the commercial FG as a control. **: p -value < 0.01. Data are shown as the mean \pm SD. FG: bio-based fibrin glue.

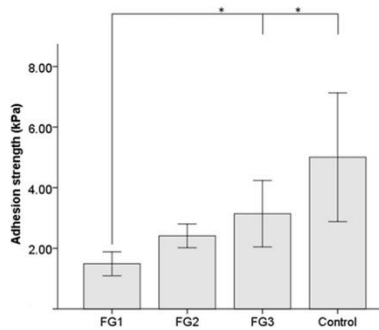


Figure 3. Mean adhesion strength obtained in FG1, FG2, and FG3 and a statistical comparison with the commercial FG as a control. *: p -value < 0.05. Data are shown as the mean \pm SD. FG: bio-based fibrin glue.

3.2. Preclinical Study

3.2.1. Intraoperative and Clinical Observations

Intraoperative and clinical observations showed that FG1, FG2, and FG3 allowed the application of 0.2 mL at different intervals with high extrusion control and placement of clots (Figure 4). FGs instantly formed a firm and sticky clot, but allowed enough working time before inducing firm adhesion. Autografts glued with FG2 and FG3 were successfully attached and exhibited adequate adhesion strength to maintain wound integrity without folds and dehiscences during blinking. However, autografts glued with FG1 slightly wrinkled during blinking and showed dehiscences in the posterior edge. On the other hand, commercial FG also induced firm adhesion; however, the resultant working time was insufficient and irregular clots were formed.

After 3 days, none of the groups showed graft dehiscence from the scleral bed. Subconjunctival hemorrhage around the graft was observed in some cases in every group, but it resolved spontaneously in 3–7 days without complications.

At the end of follow-up, all the autografts appeared vascularized and integrated within the surrounding conjunctival tissue without adverse effects on the cornea or conjunctiva. There was no significant inflammation in the FG1, FG2, and FG3 groups, whereas commercial FG showed mild–moderate signs of inflammation in the graft and the surrounding conjunctiva.

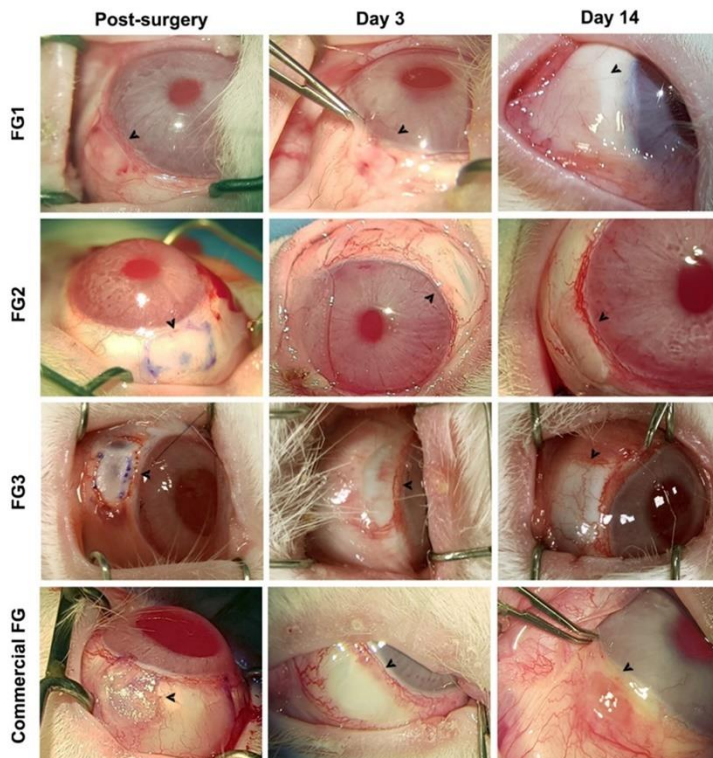


Figure 4. Clinical evolution of bulbar conjunctiva autografts on a bare scleral bed transplanted using different FGs and the commercial FG. Arrows show the grafted area in the bulbar conjunctiva. FG: bio-based fibrin glue.

3.2.2. Histological Evaluation

The autografts showed an adequate integration into the bulbar conjunctiva, where a continuous layer of stratified squamous non-keratinized epithelium was observed in all groups with successful integration of the glued autograft into the bulbar conjunctiva (Figure 5). However, several differences were observed at the stromal level in the grafted area between groups. Immune infiltrates were absent or minimally present in FG1, FG2, and FG3 groups, whereas commercial FG group showed mild to severe immune reactions and stromal edema. These results were confirmed by IL-6 immunofluorescence (Figure 5).

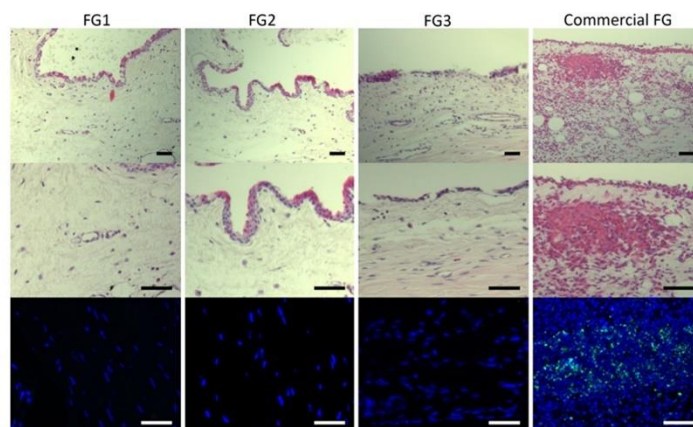


Figure 5. H&E and IL-6 immunofluorescence stains of a representative sample of each FG group. No inflammatory cells and no edema were observed in FG1, FG2, or FG3 samples. Commercial FG showed inflammatory cells and edema. Scale bars: 50 μ m. FG: bio-based fibrin glue; IL-6: interleukin-6.

4. Discussion

The use of FGs over sutures have shown numerous advantages in ophthalmic surgeries [1], such as in amniotic membrane fixation [27–29], lamellar keratoplasty [9,30], Descemet membrane perforation [31], strabismus surgery [32], Faden operation [33], or conjunctival autograft adhesion in the surgical treatment of pterygium [34,35].

Several companies are already commercializing FGs manufactured under rigorous quality control procedures, designed for a wide range of therapeutic indications [1]. However, there is not an FG specifically designed for use in ophthalmology, where the demands for adhesion strength and volume/surface ratio are low; the disadvantages of the use of commercial FGs in this field have already been highlighted [36].

Autologous FGs can easily be produced in the operative field [37,38] using physiological concentrations of fibrinogen and thrombin; however, the low protein contents highly limit their use in ophthalmic surgeries due to the longer coagulation time and poor adhesion strength [17]. On the other hand, different methods have been described to prepare FGs rich in fibrinogen or thrombin [18–22]. These methods improve adhesion strength due to higher protein contents, but require more preparation time or specific devices.

In this study, a new method for the preparation of FGs is described. The described method enabled the preparation of FGs in less than 1 h by mixing concentrated fibrinogen and thrombin obtained from the same venipuncture blood using a simple protocol. The FGs described in this study showed enough manageability and adhesion strength to graft a conjunctival autograft on a rabbit sclera without any adverse effect. Our results indicate that 2 mL of FG could be prepared using 90 mL of donor's blood and could be concentrated up to 47.46 ± 9.36 mg/mL fibrinogen and 2248.12 ± 604.20 IU/mL thrombin. However, larger volumes and greater concentrations of FG can be prepared by increasing the volume of donor's blood if needed. The developed methodology appears to offer higher fibrinogen concentrations, lower initial volumes of blood, and shorter production times than other techniques, described such as cryoprecipitation [39], other forms of chemical precipitation [40], or commercial available devices [18].

The main requirements for an FG are time-until-clot and adhesion strength [1,7]. Fibrin clots are usually formed in 10–20 min by adding calcium chloride to human plasma containing physiological concentrations of fibrinogen and thrombin. In contrast, fibrin clots are formed in seconds if isolated fibrinogen and concentrated thrombin are used [41]. The difference in clot formation times results in different adhesion strengths, because mechanical properties improve inversely proportionally to the rapidness of clot formation [36]. Mixing normal plasma and calcium chloride results in poorly adherent hydrogels with low adhesion strength (1 kPa) [7,17]. However, when calcium chloride is replaced with thrombin concentrate, as in FG1, we observed slightly higher adhesion strength (1.49 ± 0.39 kPa). Nevertheless, studies have demonstrated [17] that adhesion strength improves when fibrinogen is concentrated, as in FG2 and FG3. In our study, the adhesion strengths significantly increased up to 3.14 ± 1.09 kPa (FG3), almost 63% of the adhesion strength of the commercial FG, despite using half the fibrinogen concentration.

In accordance with previous studies [17], FG1 showed poor results when used for autograft adhesion. In contrast, autografts glued with FG2 and FG3 showed firmer adhesion and adequate adhesion strength to maintain wound integrity as with commercial FG.

Clinical follow-up exhibited adequate ocular tolerance, with no adverse effect on the cornea and conjunctiva when FG1, FG2, or FG3 were used. In contrast, commercial FG showed inflammatory infiltrates at the graft site and within the surrounding conjunctiva. This could be attributed to a xenogenic response to the higher human fibrinogen content of the commercial FG. The inflammation was further confirmed in the histological and immunofluorescence analysis, where commercial FG showed a mild to severe infiltration of immune cells, fibrin-clot residues, and granulation tissue. On the other hand, FG1, FG2, and FG3 samples showed normal conjunctival stroma and epithelium without the presence of immune cells, edema, scars, fibrin-clot residues, or granulation tissue.

Overall, we have developed a new method for FG manufacture that can be prepared in less than 1 h by mixing concentrated fibrinogen and thrombin obtained from a single venipuncture blood sample. However, in order to transfer the results into clinical applications, FGs should be prepared and dispensed under strict control by a hospital pharmacy service in order to guarantee patient safety. Nevertheless, due to the simplicity of our method, FGs could easily be prepared in any standard pharmacy workstation designed for non-hazardous drug preparation, allowing rapid clinical transferability. Additionally, although the method for FG preparation was initially designed for use in ophthalmology, where the demand for volume/surface ratio is low, the method could be extrapolated to other areas by increasing the amount of venipuncture blood.

5. Conclusions

The use of locally manufactured FGs has been shown to effectively seal a conjunctival autograft, demonstrating sufficient mechanical properties for it to be considered as a clinically useful alternative to commercial FGs for ophthalmic surgical applications. The method for FG preparation is sufficiently simple to enable on-demand FGs manufacture

and dispensing by any hospital pharmacy service and can be fine-tuned for any specific need by adjusting the fibrinogen concentration and thrombin activity.

Author Contributions: Conceptualization, Á.M. and L.F.-V.-C.; Methodology, B.A.-B., M.P.-M., L.F.-V.-C., S.B.-P. and T.S.; Formal analysis, M.P.-M., N.V. and S.A.-A.; Investigation, B.A.-B., L.F.-V.-C., M.C., M.P.-M. and S.B.-P.; Resources, L.F.-V.-C. and J.M.-L.; Data curation, Á.M., M.C., M.P.-M., N.V. and S.A.-A.; Writing—original draft preparation, Á.M. and M.P.-M.; Writing—review and editing, Á.M., I.M.M.-I., M.C. and N.V.; Visualization, I.M.M.-I., M.P.-M. and S.A.-A.; Supervision, Á.M., J.M.-L. and L.F.-V.-C.; Project administration, J.M.-L. and L.F.-V.-C.; Funding acquisition, L.F.-V.-C. and J.M.-L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded in part by Programa Jovellanos, Gobierno del Principado de Asturias, Fondo Europeo de desarrollo regional, Unión Europea (IDI/2017/000223); Instituto de Desarrollo Económico del Principado de Asturias, Gobierno del Principado de Asturias, Fondo Europeo de Desarrollo Regional, Unión Europea (IDE/2016/000189) and Fundación Telefónica.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Oviedo and the Animal Production and Health Service of Asturias (Spanish registration code PROAE 36/2019).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all the subjects involved in the study.

Data Availability Statement: All the obtained data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgments: The authors wish to thank Agustín Brea, Cristina Cueli and the staff of the Oviedo University animal center and Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias (Asturias, Spain) for their assistance during the experiments.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Panda, A.; Kumar, S.; Kumar, A.; Bansal, R.; Bhartiya, S. Fibrin Glue in Ophthalmology. *Indian J. Ophthalmol.* **2009**, *57*, 371–379. <https://doi.org/10.4103/0301-4738.55079>.
- Somani, S.N.; Moshirfar, M.; Shmunes, K.M.; Ronquillo, Y.C. Comparison and Application of Commercially Available Fibrin Sealants in Ophthalmology. *Ocul. Surf.* **2020**, *18*, 418–426. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2020.04.006>.
- Romano, V.; Cruciani, M.; Conti, L.; Fontana, L. Fibrin Glue versus Sutures for Conjunctival Autografting in Primary Pterygium Surgery. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2016**, *2016*, 14. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011308.pub2>.
- Chan, S.M.; Boisjoly, H. Advances in the Use of Adhesives in Ophthalmology. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **2004**, *15*, 305–310. <https://doi.org/10.1097/00055735-200408000-00005>.
- Guhan, S.; Peng, S.L.; Janbatian, H.; Saadeh, S.; Greenstein, S.; Al Bahrani, F.; Fadlallah, A.; Yeh, T.C.; Melki, S.A. Surgical Adhesives in Ophthalmology: History and Current Trends. *Br. J. Ophthalmol.* **2018**, *102*, 1328–1335. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2017-311643>.
- Alió, J.L.; Gómez, J.; Mulet, E.; Mahiques Bujanda, M.M.; Martín Martínez, J.M.; Molina, Y. A New Acrylic Tissue Adhesive for Conjunctival Surgery: Experimental Study. *Ophthalmic Res.* **2003**, *35*, 306–312. <https://doi.org/10.1159/000074068>.
- Trujillo-de Santiago, G.; Sharifi, R.; Yue, K.; Sani, E.S.; Kashaf, S.S.; Alvarez, M.M.; Leijten, J.; Khademhosseini, A.; Dana, R.; Annabi, N. Ocular Adhesives: Design, Chemistry, Crosslinking Mechanisms, and Applications. *Biomaterials* **2019**, *197*, 345–367. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.01.011>.
- Radosevich, M.; Goubran, H.A.; Burnouf, T. Fibrin Sealant: Scientific Rationale, Production Methods, Properties, and Current Clinical Use. *Vox Sang.* **1997**, *72*, 133–143. <https://doi.org/10.1046/j.1423-0410.1997.7230133.x>.
- Cho, S.Y.; Kim, M.S.; Oh, S.J.; Chung, S.K. Comparison of Synthetic Glues and 10-0 Nylon in Rabbit Lamellar Keratoplasty. *Cornea* **2013**, *32*, 1265–1268. <https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e31829a3760>.
- Anitua, E.; Andia, I.; Ardanza, B.; Nurden, P.; Nurden, A.T. Autologous Platelets as a Source of Proteins for Healing and Tissue Regeneration. *Thromb. Haemost.* **2004**, *91*, 4–15. <https://doi.org/10.1160/TH03-07-0440>.
- Nugent, R.B.; Lee, G.A. Ophthalmic Use of Blood-Derived Products. *Surv. Ophthalmol.* **2015**, *60*, 406–434. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2015.03.003>.
- Agarwal, A.; Kumar, D.A.; Jacob, S.; Baid, C.; Agarwal, A.; Srinivasan, S. Fibrin Glue-Assisted Sutureless Posterior Chamber Intraocular Lens Implantation in Eyes with Deficient Posterior Capsules. *J. Cataract Refract. Surg.* **2008**, *34*, 1433–1438. <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2008.04.040>.

13. Kheirkhah, A.; Casas, V.; Raju, V.K.; Tseng, S.C.G. Sutureless Amniotic Membrane Transplantation for Partial Limbal Stem Cell Deficiency. *Am. J. Ophthalmol.* **2008**, *145*, 787–794. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2008.01.009>.
14. Spontnitz, W.D. Commercial Fibrin Sealants in Surgical Care. *Am. J. Surg.* **2001**, *182*, 8–14. [https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(01\)00771-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9610(01)00771-1).
15. Chen, T.M.; Tzeng, Y.S.; Tsai, J.C.; Burnouf, T. Single-Donor Allogeneic Platelet Fibrin Glue and Osteoconductive Scaffold in Orbital Floor Fracture Reconstruction. *Ann. Plast. Surg.* **2013**, *70*, 370–374. <https://doi.org/10.1097/SAP.0b013e31823b6880>.
16. Thorn, J.J.; Sørensen, H.; Weis-Fogh, U.; Andersen, M. Autologous Fibrin Glue with Growth Factors in Reconstructive Maxillofacial Surgery. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **2004**, *33*, 95–100. <https://doi.org/10.1054/ijom.2003.0461>.
17. Alston, S.M.; Solen, K.A.; Broderick, A.H.; Sukavaneshvar, S.; Mohammad, S.F. New Method to Prepare Autologous Fibrin Glue on Demand. *Transl. Res.* **2007**, *149*, 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2006.08.004>.
18. Buchta, C.; Hedrich, H.C.; Macher, M.; Höcker, P.; Redl, H. Biochemical Characterization of Autologous Fibrin Sealants Produced by CryoSeal® and Vivostat® in Comparison to the Homologous Fibrin Sealant Product Tissucol/Tisseel®. *Biomaterials* **2005**, *26*, 6233–6241. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.04.014>.
19. Rock, G.; Neurath, D.; Semple, E.; Harvey, M.; Freedman, M. Preparation and Characterization of Human Thrombin for Use in a Fibrin Glue. *Transfus. Med.* **2007**, *17*, 187–191. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2006.00717.x>.
20. DePalma, L.; Criss, V.R.; Luban, N.L. The Preparation of Fibrinogen Concentrate for Use as Fibrin Glue by Four Different Methods. *Transfusion* **1993**, *33*, 717–720. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1993.33994025019.x>.
21. Yoshida, H.; Kamiya, A. A Quicker Preparation Method for Autologous Fibrin Glue. *Biol. Pharm. Bull.* **1998**, *21*, 1367–1370. <https://doi.org/10.1248/bpb.21.1367>.
22. Aizawa, P.; Winge, S.; Karlsson, G. Large-Scale Preparation of Thrombin from Human Plasma. *Thromb. Res.* **2008**, *122*, 560–567. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2007.12.027>.
23. Quarmby, J.W.; Engelke, C.; Chitolie, A.; Morgan, R.A.; Belli, A.M. Autologous Thrombin for Treatment of Pseudoaneurysms. *Lancet* **2002**, *359*, 946–947. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)07991-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)07991-6).
24. Clauss, A. Gerinnungsphysiologische schnellmethode zur bestimmung des fibrinogens [Rapid physiological coagulation method in determination of fibrinogen]. *Acta Haematol.* **1957**, *17*, 237–246. <https://doi.org/10.1159/000205234>.
25. ASTM-F 2255-05; Standard Test Method for Strength Properties of Tissue Adhesives in Lap-Shear by Tension Loading. ASTM Int.: West Conshohocken, PA, USA, 2005.
26. Marticorena, J.; Rodríguez-Ares, M.T.; Touriño, R.; Mera, P.; Valladares, M.J.; Martínez-De-La-Casa, J.M.; Benitez-Del-Castillo, J.M. Pterygium Surgery: Conjunctival Autograft Using a Fibrin Adhesive. *Cornea* **2006**, *25*, 34–36. <https://doi.org/10.1097/ico.0000164780.25914.0a>.
27. Szurman, P.; Warga, M.; Grisanti, S.; Roters, S.; Rohrbach, J.M.; Aisenbrey, S.; Kaczmarek, R.T.; Bartz-Schmidt, K.U. Sutureless Amniotic Membrane Fixation Using Fibrin Glue for Ocular Surface Reconstruction in a Rabbit Model. *Cornea* **2006**, *25*, 460–466. <https://doi.org/10.1097/ico.0000183493.00884.8f>.
28. Sekiyama, E.; Nakamura, T.; Kurihara, E.; Cooper, L.J.; Fullwood, N.J.; Takaoka, M.; Hamuro, J.; Kinoshita, S. Novel Sutureless Transplantation of Bioadhesive-Coated, Freeze-Dried Amniotic Membrane for Ocular Surface Reconstruction. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2007**, *48*, 1528–1534. <https://doi.org/10.1167/IOVS.06-1104>.
29. Higa, K.; Shimmura, S.; Kato, N.; Kawakita, T.; Miyashita, H.; Itabashi, Y.; Fukuda, K.; Shimazaki, J.; Tsubota, K. Proliferation and Differentiation of Transplantable Rabbit Epithelial Sheets Engineered with or without an Amniotic Membrane Carrier. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2007**, *48*, 597–604. <https://doi.org/10.1167/IOVS.06-0664>.
30. Nanavaty, M.A.; Vijjan, K.S.; Yvon, C. Deep Anterior Lamellar Keratoplasty: A Surgeon's Guide. *J. Curr. Ophthalmol.* **2018**, *30*, 297–310. <https://doi.org/10.1016/j.joco.2018.06.004>.
31. Alharbi, S.S.; Alameer, A. Use of Fibrin Glue in the Management of Descemet Membrane Perforation during Deep Anterior Lamellar Keratoplasty. *Middle East Afr. J. Ophthalmol.* **2019**, *26*, 168–171. https://doi.org/10.4103/meajo.MEAJO_97_19.
32. Lee, J.H.; Kang, N.Y. Comparison of Fibrin Glue and Sutures for Conjunctival Wound Closure in Strabismus Surgery. *Korean J. Ophthalmol.* **2011**, *25*, 178–184. <https://doi.org/10.3341/KJO.2011.25.3.178>.
33. Tonelli, E.; De Almeida, H.C.; Bambirra, E.A. Tissue Adhesives for a Sutureless Fadenoperation: An Experimental Study in a Rabbit Model. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2004**, *45*, 4340–4345. <https://doi.org/10.1167/IOVS.04-0049>.
34. Daponte, P.L.; Cigna, A.; Lescano, O.; Sipowicz, F.; Pena, B.; Abud, G.; Di-Virgilio, G.; Chirinos, A.; Bodino, G.F. Conjunctival Autograft With Fibrin Glue for Pterygium: A Long Term Recurrence Assessment. *Med. Hypothesis Discov. Innov. Ophthalmol. J.* **2019**, *8*, 272–277.
35. Uy, H.S.; Reyes, J.M.G.; Flores, J.D.G.; Lim-Bon-Siong, R. Comparison of Fibrin Glue and Sutures for Attaching Conjunctival Autografts after Pterygium Excision. *Ophthalmology* **2005**, *112*, 667–671. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2004.08.028>.
36. Alston, S.M.; Solen, K.A.; Sukavaneshvar, S.; Fazal Mohammad, S. In Vivo Efficacy of a New Autologous Fibrin Sealant. *J. Surg. Res.* **2008**, *146*, 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2007.08.006>.
37. Kumar, V.; Chapman, J.R. Autologous Thrombin: Intraoperative Production from Whole Blood. *J. Extra. Corpor. Technol.* **2008**, *40*, 94–98.
38. Hartman, A.R.; Galanakis, D.K.; Honig, M.P.; Seifert, F.C.; Anagnostopoulos, C.E. Intraoperative Procurement. *Arch. Surg.* **1992**, *127*, 357–359.
39. C-radi, S.M. Article The Use of Single-Donor Brin Glue Prepared by Recycled Cryoprecipitation in Experimental Liver Surgery. *Facilities* **2002**, *32*, 135–145. <https://doi.org/10.1163/15685902320387970>.

40. Dietrich, M.; Heselhaus, J.; Wozniak, J.; Weinandy, S.; Mela, P.; Tschoeke, B.; Schmitz-Rode, T.; Jockenhoevel, S. Fibrin-Based Tissue Engineering: Comparison of Different Methods of Autologous Fibrinogen Isolation. *Tissue Eng. Part C. Methods* **2013**, *19*, 216–226. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2011.0473>.
41. Wolberg, A.S.; Campbell, R.A. Thrombin Generation, Fibrin Clot Formation and Hemostasis. *Transfus. Apher. Sci.* **2008**, *38*, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2007.12.005>.

15. FINANCIACIÓN

El trabajo desarrollado en esta tesis doctoral ha contado con financiación del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades y la Agencia Estatal de Investigación. Esta ayuda (nº de ref. RTC-2017-6760-1) corresponde a la convocatoria de tramitación anticipada de Retos Colaboración 2017, y se enmarca en el Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación, orientada a los Retos de la Sociedad, en el Plan Estatal de Investigación Científica, Técnica y de Innovación, 2013-2017.



