

**TRASPLANTE
DE
STEM CELLS DE CORNEA
Y
BIOADHESIVOS
EN LA
QUERATOPLASTIA LAMINAR**

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FEDERICO LUENGO GIMENO

**UNIVERSIDAD AUSTRAL
FACULTAD DE CIENCIAS BIOMÉDICAS
DIRECTOR: JUAN E. GALLO
CO DIRECTOR: JUAN O. CROXATTO**

*PORQUE EL OJO MUERE EN LA OSCURIDAD,
EN LA OSCURIDAD
UNO DEBE CREAR UN HOYO EN LA PARED,
UN HOYO
QUE SIRVA PARA NUTRIR EL ALMA.*

*YA QUE LA LUZ ES PARA LOS OJOS
COMO LOS NUTRIENTES SON PARA EL ORGANISMO.*

TALMUD, OHOLOTH 13:4

A VOS, A ELLA, A USTEDES.

AGRADECIMIENTOS

A Cecilia, ser grandioso y brillante que invadió de amor mi vida y por tanto mi trabajo.

A mi familia, por haberme acompañado en los momentos justos para ser quien hoy soy.

A mis amigos, por ser grandes amigos.

A Roberto logna, un académico de peso increíble que despierta esa fuerza de crecer.

A Juan Gallo, un gigante entre los grande, un maestro en la vida.

A Juan O. Croxatto, un mentor en el trabajo.

A Victoria Lavigne, Laura Correa y Laboratorios Craveri, quienes permitieron y formaron parte de cada una de las páginas siguientes.

A Silvia Gatto y José Ferro por su entereza profesional. Al servicio de Hemoterapia del HUA.

A mis compañeros de laboratorio, a Soledad Arregui, Guillermo Gastón, German y Silvina Ruffolo, Norma Montalbetti y Rodrigo Guantay.

A Isabel Farias, Nora Torry, Virginia Tomsing, y a la Fundación Oftalmológica Argentina “Jorge Malbran”.

A Kala, Luz y Pepine por su ayuda cuando “clínico” y amistad de ahí en más. Al servicio de Clínica Médica del HUA.

A Enrique Segundo Malbran, por su entusiasmo. Por su incentivo. Por su apoyo.

A Marcelo Villar por incorporarme en el proyecto Austral. Un gran padrino de imponente grandeza.

A todo el plantel de Anatomía, a mis escueleutas de enorme entusiasmo.

A Edgardo Narbais, Mariano Díaz de Vivar y departamento contable de la FCB.

A la Universidad Austral, por ser la Universidad Austral.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| AGRADECIMIENTOS | 4 |
| PALABRAS CLAVE Y ABREVIATURAS | 8 |
| LISTADO DE PUBLICACIONES ORIGINALES DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS | 10 |
| RESUMEN | 12 |
| TABLA DE FIGURAS | 16 |
| INTRODUCCIÓN Y FUNDAMENTOS | 34 |
| FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LA CÓRNEA | 34 |
| ESTRUCTURA CORNEAL ANTERIOR | 35 |
| <i>Epitelio corneal – Estructura y Funciones</i> | 35 |
| <i>Limbo Corneal y Stem Cells</i> | 38 |
| DÉFICIT DE STEM CELLS LIMBARES DE CÓRNEA (DSCL) | 39 |
| <i>Definición</i> | 39 |
| <i>Etiología</i> | 40 |
| <i>Prevalencia</i> | 41 |
| <i>Clasificación</i> | 41 |
| CULTIVO CELULAR DE STEM CELLS DE CORNEA | 42 |
| <i>Soportes Celulares Comerciales vs Autólogos</i> | 42 |
| TRASPLANTE DE CÓRNEA | 43 |
| <i>Queratoplastia Laminar Convencional</i> | 43 |
| <i>Trasplante de Neopitelio Corneal a partir de Stem Cells Autólogas</i> | 44 |
| <i>Trasplante de Neopitelio Corneal a partir de Stem Cells Homólogas</i> | 45 |
| <i>Fotocoagulación Laser en Neovascularización Corneal</i> | 46 |
| BIOADHESIVOS | 47 |
| <i>Bioadhesivos No Autólogos. Fibrin Glue</i> | 49 |
| <i>Bioadhesivos Autólogos. Plasma Rico en Plaquetas</i> | 49 |
| <i>Bioadhesivo en Cirugía de Córnea</i> | 53 |
| OBJETIVOS | 56 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 58 |
| DÉFICIT STEM CELLS LIMBARES (DSCL) | 63 |
| <i>Modelo Animal Químico de DSCL</i> | 63 |
| <i>Modelo Animal Mecánico de DSCL</i> | 63 |
| <i>Plasma Pobre en Plaquetas como Soporte Celular</i> | 64 |
| <i>Trasplante Autólogo de Stem Cells de Córnea en Conejos con DSCL</i> | 65 |
| <i>Estudio Comparativo entre Soportes Celulares Comerciales vs Autólogos</i> | 68 |
| <i>Trasplante Homólogo de Stem Cells de Córnea en Conejos con DSCL</i> | 69 |
| <i>Estudio Pre Clínico de Trasplante de Neopitelio Corneal a partir de Stem Cells Autólogas Montadas sobre Plasma Pobre en Plaquetas Autólogo en conejos con DSCL</i> | 73 |
| BIOADHESIVOS | 78 |
| <i>Plasma Rico en Plaquetas (PRP)</i> | 78 |
| <i>Queratoplastia Laminar utilizando PRP como Bioadhesivo Vs. Suturas convencionales</i> | 81 |

| | |
|---|------------|
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 84 |
| TRASPLANTE AUTÓLOGO DE STEM CELLS DE CÓRNEA EN CONEJOS CON DSCL | 84 |
| <i>Discusión</i> | 86 |
| ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE SOPORTES CELULARES COMERCIALES VS. AUTÓLOGOS | 87 |
| <i>Discusión</i> | 87 |
| FOTOCOAGULACIÓN LASER DIRECTA EN NEOVASCULARIZACIÓN CORNEAL..... | 88 |
| <i>Discusión</i> | 88 |
| TRASPLANTE HOMÓLOGO DE SC DE CÓRNEA EN CONEJOS CON DSCL | 89 |
| <i>Grupo Tratado</i> | 89 |
| <i>Grupo Control C1 (no lámina de epitelio, no PPP. 90 días postoperatorios)</i> | 91 |
| <i>Grupo Control C2 (no lámina de epitelio, botón de PPP, un año postoperatorio)</i> | 92 |
| <i>Estudio Genético</i> | 92 |
| <i>Discusión</i> | 93 |
| PREPARACIÓN DEL PRP Y PPP..... | 94 |
| <i>Estudio in Vitro</i> | 94 |
| <i>Estudio in Vivo</i> | 95 |
| <i>Discusión</i> | 95 |
| QUERATOPLASTIA LAMINAR UTILIZANDO PRP COMO BIOADHESIVO VS. SUTURAS CONVENCIONALES | 96 |
| <i>Discusión</i> | 97 |
| ESTUDIO PRE CLÍNICO DE TRASPLANTE DE NEOEPITELIO CORNEAL A PARTIR DE STEM CELLS AUTÓLOGAS MONTADAS SOBRE PLASMA POBRE EN PLAQUETAS AUTÓLOGO EN CONEJOS CON DSCL | 98 |
| <i>Análisis Estadístico</i> | 102 |
| <i>Discusión</i> | 104 |
| CONCLUSIONES | 105 |
| TRASPLANTE AUTÓLOGO DE STEM CELLS DE CÓRNEA EN CONEJOS CON DSCL | 105 |
| TRASPLANTE HOMÓLOGO DE STEM CELLS DE CÓRNEA EN CONEJOS CON DSCL..... | 107 |
| PREPARACIÓN DEL PLASMA RICO Y POBRE EN PLAQUETAS..... | 110 |
| QUERATOPLASTIA LAMINAR UTILIZANDO PLASMA RICO EN PLAQUETAS COMO BIOADHESIVO VS. SUTURAS | 113 |
| ESTUDIO PRE CLÍNICO DE TRASPLANTE DE EPITELIO CORNEAL A PARTIR DE STEM CELLS AUTÓLOGAS MONTADAS SOBRE PLASMA POBRE EN PLAQUETAS EN CONEJOS CON DSCL | 115 |
| BIBLIOGRAFÍA | 116 |

PALABRAS CLAVE Y ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------------|------|
| CÉLULA DE AMPLIFICACIÓN TRANSITORIA | CAT |
| DEFECTOS EPITELIALES PERSISTENTES | DEP |
| DÉFICIT DE STEM CELLS LIMBARES | DSCL |
| GLUE DE FIBRINA, FIBRIN GLUE | FG |
| HEMATOXILINA Y EOSINA | H&E |
| INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA | IFI |
| INMUNOHISTOQUÍMICA | IHQ |
| PERIODIC ACID SCHIFF | PAS |
| PLASMA POBRE EN PLAQUETAS | PPP |
| PLASMA RICO EN PLAQUETAS | PRP |
| POLIMORFONUCLEARES | PMN |
| POSTOPERATORIO | POP |
| QUERATOPLASTIA LAMINAR | QL |
| STEM CELLS | SC |

LISTADO DE PUBLICACIONES ORIGINALES DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS

1. Luengo Gimeno F, Gatto S, Ferro J, Croxatto JO, Gallo JE. Preparation of platelet rich plasma as a tissue adhesive for experimental transplantation in rabbits. *Thrombosis Journal* 2006;4:18.
2. Luengo Gimeno F, Lavigne V, Gatto S, Croxatto JO, Correa L, Gallo JE. Advances in corneal stem-cell transplantation in rabbits with severe ocular alkali burns. *J Cataract Refract Surg.* 2007;33:1958-65.
3. Luengo Gimeno F, Lavigne V, Gatto S, Ferro J, Croxatto JO, Correa L, Gallo JE. Implante de epitelio organotípico en el tratamiento del déficit de stem cells limbares. *Archivos de Oftalmología BsAs* 2008;79:13-9.
4. Luengo Gimeno F, Lavigne V, Gatto S, Croxatto JO, Correa L, Gallo JE. Corneal limbal epithelial cell Allograft in rabbits. 2008. Submitted to publication. Under second review.
5. Luengo Gimeno F, Gatto S, Ferro J, Croxatto JO, Gallo JE. The use of Autologous Platelet Rich Plasma (PRP) as a bioadhesive agent in lamellar keratoplasty in rabbits. *Eye.* 2009 Mar 20. [Epub ahead of print]
6. Luengo Gimeno F, Lavigne V, Gatto S, Ferro JI, Croxatto JO, Correa L, Gallo JE. Autologous limbal epithelial cells transplantation was statistically effective to restore corneal surface in rabbits with LSCD. Manuscript 2009.

RESUMEN

La córnea es un tejido transparente y avascular, propiedades cruciales para lograr una visión normal. Esta propiedad puede verse amenazada por enfermedades o traumas que afecten las llamadas stem cells del limbo esclero-corneal. Estas células, ubicadas en el subepitelio, son las encargadas de mantener la homeostasis en la superficie ocular y así evitar la invasión de células del epitelio conjuntival y vasos conjuntivales en el parénquima corneal. El primer hecho se conoce con el nombre de conjuntivalización de la córnea, situación que se encuentra en el Síndrome de Steven Johnson, Pénfigo, Pterigion gigantes, quemaduras por álcalis y otras enfermedades, que causan el déficit de stem cells limbares (DSCL). Esta afección se acompaña de defectos epiteliales recurrentes, opacidad corneal, y presencia de neovascularización. En estos casos el trasplante convencional de córnea fracasa, ya que el DSCL imposibilita a largo plazo la salubridad del injerto y la presencia de vasos en cornea incrementa significativamente la posibilidad del rechazo. Por este motivo se han llevado a cabo nuevos tratamientos para estos casos como el injerto de limbo y el trasplante de stem cells de córnea. Esta última técnica - incluye biopsia, replicación y expansión celular- presenta mejores posibilidades de éxito debido al avance acaecido en el área de la bioingeniería de tejidos. Sin embargo, el problema no es fácil de resolver, especialmente en aquellos pacientes con afección bilateral, en quienes no es posible realizar una técnica autóloga y es necesario buscar una fuente celular homóloga.

El uso de suturas en la cirugía corneal ha sido objeto de muchas investigaciones. Actualmente el nylon 10.0 es la sutura más utilizada. Sin embargo, aún en manos de eximios cirujanos las suturas pueden ser causa de aberraciones refractivas produciendo serios problemas visuales. Además, la presencia de un elemento extraño favorece la inflamación corneal, el desarrollo de queratitis infecciosas, y la invasión de vasos en el parénquima corneal. Por estas razones varias investigaciones se han llevado a cabo utilizando adhesivos artificiales como el fibrin glue (FG). No obstante, con la utilización de material biológico no propio, es decir proveniente de un animal u otra persona, se corre el riesgo, limitado, de transmitir agentes infecciosos. Además el costo de estos adhesivos suele ser muy elevado. Teniendo en cuenta el creciente uso del plasma rico en plaquetas (PRP) como adhesivo tisular en varias especialidades médicas y al ser el PRP un gel autólogo fácil de manipular y aplicar en espacios pequeños como es la cirugía de la cornea, nos propusimos evaluar su aplicación en el trasplante no perforante o laminar de cornea.

La insuficiencia de stem cells limbares fue abordada desde la bioingeniería de tejidos con la cooperación de Laboratorios Craveri, utilizando la técnica del trasplante de stem cells de

cornea ex vivo. Se realizó un trabajo de investigación y desarrollo en el cual fue necesario innovar muchos pasos de la técnica. Para la biopsia de limbo corneal utilizamos un trépano de 1.8 mm de diámetro, debiendo regular el grado de profundidad de la biopsia, muy cercana a la superficie. La contaminación por otras células se evitó logrando una adecuada asepsia y desbridamiento de la conjuntiva adyacente. El transporte de la muestra al laboratorio se llevó a cabo sin mayores inconvenientes. Las stem cells fueron separadas del tejido y aisladas. La replicación, expansión y desarrollo de una membrana para trasplantar llevó 21 días. Para el soporte celular fue utilizado Tissucol y plasma pobre en plaquetas (PPP). Este último fue elegido como la alternativa más adecuada debido a su elasticidad y consistencia así como por su transparencia que permitió la evaluación celular bajo microscopio. Los implantes se colocaron en córneas con DSCL producidas con quemaduras alcalinas. La membrana trasplantada se suturó a la esclera con nylon 10.0. En el postoperatorio se utilizaron colirios con corticoides, antibióticos y ciclosporina. Los signos clínicos se documentaron en formato digital bajo el microscopio operador. Los animales fueron sacrificados a los 90, 180 y 360 días. Los casos que desarrollaron neovascularización corneal fueron fotocoagulados con laser de argón sobre la parte escleral, más cercana al limbo, del recorrido del vaso. Se realizaron análisis histológicos con distintas coloraciones e inmunohistoquímicos para la identificación de citoquinas k3, k12, k19. Esta última no debería encontrarse en la parte central de la cornea. Su hallazgo nos señala la presencia de epitelio conjuntival. Todo el estudio fue autólogo. Posteriormente se realizó un estudio similar con seguimiento de 6 meses, con una cantidad de animales que permitiese realizar análisis estadísticos. Para ello se utilizó un modelo estadístico ad-hoc.

El otro modo de abordar el DSCL fue a través del trasplante homólogo. Para este fin, se tomó como donantes a conejos machos y como receptoras a conejas hembras. La técnica utilizada fue similar a la anterior, con la diferencia de que en este grupo de conejos el DSCL se produjo de modo mecánico y solo se utilizó como soporte celular el PPP del animal receptor. Es decir, se realizó una queratectomía laminar anterior de aproximadamente un tercio del grosor corneal que incluyó el limbo en los 360 grados y luego se implantó la membrana neoepitelial homóloga. La misma técnica se llevó a cabo en dos grupos controles, uno que recibió la membrana de PPP sin SC y otro que no recibió ni PPP ni SC. Los animales fueron sacrificados a los 90, 180 y 360 días. Se llevaron a cabo exámenes histológicos e inmunohistoquímicos. A través de técnicas de citogenética se buscó el cromosoma Y en las células epiteliales con el objetivo de identificarlas y evaluar la sobrevivencia de ellas.

El PRP se pudo fabricar de la sangre de los conejos a trasplantar con la cooperación del Servicio de Hemoterapia del Hospital Universitario Austral. Para actuar como bioadhesivo el PRP

debe ser activado con cloruro de sodio. En la bibliografía no hay consenso acerca de la concentración adecuada a utilizar de esa solución. Por este motivo se realizó un estudio *in vitro*, para luego aplicar los resultados a un estudio *in vivo*. El mismo día de la cirugía corneal la sangre era extraída del conejo y el PRP formado. El estudio *in vivo* incluyó un grupo control a quien se le suturó la córnea con nylon 10.0. Los animales fueron sacrificados a los 7, 30 y 90 días. Se llevaron a cabo exámenes histológicos, inmunohistoquímicos (anticuerpos anti SMA) y por microscopía electrónica.

Las SC limbares pudieron ser biopsiadas, aisladas, replicadas y expandidas sobre un soporte biológico para luego ser trasplantadas. El uso del PPP como soporte celular tuvo un buen resultado. Hubo un proceso de mejora continua, significativa, en la biopsia, aislamiento, replicación, expansión y trasplante de las membranas. El estudio estadístico demostró la eficacia de esta técnica para mejorar la superficie corneal, logrando mayor transparencia y disminución de vasos sanguíneos en córnea. Resultados del estudio homólogo revelaron la presencia de células con cromosoma Y a los 4, 6 y 12 meses del postoperatorio. Esto constituye un dato relevante asociado a la ausencia de signos de rechazo inmunológico durante todo el seguimiento. Por otra parte los dos grupos controles mostraron alteraciones clínicas e histológicas de importancia, señalando así efectiva a la terapia celular realizada.

La solución de PRP que mejores condiciones mostró fue aquella activada con cloruro de sodio al 5%. El botón corneal trasplantado con PRP mostró una adecuada adhesión al lecho estromal. La histología no mostró elementos inflamatorios y el análisis inmunohistoquímico reveló una significativa reducción de miofibroblastos estromales comparado con la cantidad hallada en el grupo control con suturas. En un segundo grupo control sin uso de sutura ni PRP se observó desprendimiento del botón corneal a los 3 días del postoperatorio.

El trasplante ex vivo de stem cells de cornea, tanto autólogo como homólogo, fue capaz de restaurar la superficie corneal en conejos con DSTL. Los estudios pre-clínicos demuestran la eficacia de esta técnica. La realización de un ensayo clínico en Argentina está siendo planificada. Resultados promisorios del uso del PRP como adhesivo en la queratoplastia laminar, nos han llevado a preparar un estudio similar en el trasplante perforante de córnea.

TABLA DE FIGURAS

Figura 1: A: Biomicroscopía con tinción de fluoresceína de una cornea con cicatrización de una herida epitelial con afectación del limbo.

Figura 2: Biomicroscopía del limbo en donde se pueden apreciar las palizadas de Vogt.

Figura 3: DSCL.

Figura 4: Citología de impresión de una superficie corneal con DSCL y pannus fibrovascular.

Figura 5: DSCL por quemadura alcalina.

Figura 6: Biomicroscopía de una cornea con queratoplastia laminar profunda anterior realizada con disección manual y control óptico de la profundidad.

Figura 7: Diagrama del “Arco Reflejo de Inmunidad”: circuito conlleva al rechazo del implante luego de una queratoplastia.

Figura 8: Complicaciones de la neovascularización corneal que conllevan a la reducción de la agudeza visual.

Figura 9: Modelo computarizado teórico de la red de fibrina resultante luego de la activación de los adhesivos comerciales.

Figura 10: Modelo computarizado teórico de las uniones bilaterales de fibrina.

Figura 11: “Coágulo de Fibrina” del PRP:

Figura 12: Módulo teórico computarizado de la red de fibrina del PRP.

Figura 13: Modulo teórico computarizado del coágulo de PRP.

Figura 14: Fotocoagulación láser de neovascularización corneal.

Figura 15: Modelo de DSCL químico.

Figura 16: Modelo de DSCL mecánico.

Figura 17: Preparación del PPP.

Figura 18: Toma de biopsia y cultivo de SC de limbo.

Figura 20: Características macroscópicas de las láminas corneales cultivadas sobre distintos soportes celulares.

Figura 21: Características histológicas de las membranas cultivadas.

Figura 22: Cambios histopatológicos a un año de seguimiento luego del implante de SC autólogas sobre un cornea con DSCL secundario a quemadura alcalina (H&E).

Figura 23: Evolución clínica durante un año de seguimiento en conejos con implantes autólogos de SC luego de haber sido lesionados con soda cáustica.

Figura 24: Análisis inmunohistoquímico de las queratinas al año POP.

Figura 25: Resultados clínicos de los animales con DSCL mecánico que recibieron implantes de neopitelio vs grupo control.

Figura 26: Autoregresión de la neovascularización corneal en un animal tratado.

Figura 27: Resultados histológicos de los animales con DSCL mecánico a un año de haber recibido implantes de neopitelio vs grupo control.

Figura 28: Inmunofluorescencia de los animales con DSCL mecánico a un año de haber recibido implantes de neopitelio vs grupo control.

Figura 29: Resultados clínicos e histopatológicos 30 días luego de haber realizado un trasplante laminar autólogo adherido con PRP.

Figura 30: Resultados clínicos e histopatológicos 90 días luego de haber realizado un trasplante laminar autólogo adherido con PRP.

Figura 31: Evolución clínica del PRP en las horas postoperatorias inmediatas.

Figura 32: Evolución clínica de la queratoplastia laminar con PRP como adhesivo en conejos.

Figura 33: Análisis histopatológico de la queratoplastia laminar entre los grupos con PRP y con suturas.

Figura 34: Microscopía electrónica del estroma del grupo P y grupo S.

Figura 35: Inmunofluorescencia del SMA en el grupo P y grupo S.

Figura 36: Resultados genéticos de las corneas con DSCL mecánico a un año de haber recibido implantes de neo epitelio homólogo.

Figura 37: Resultados clínicos a los 6 meses del POP de los animales con DSCL químico que recibieron implantes de neopitelio montado sobre PPP vs grupo control.

Figura 38: Inmunofluorescencia de K3/12 y K4 a los 6 meses del POP de los animales con DSCL químico que recibieron implantes de neopitelio autólogo montado sobre PPP vs grupo control.

Figura 39: Análisis de imágenes de marcación de SMA en el estroma de corneas sanas y a los 90 días de queratoplastias laminares realizadas con PRP o Suturas.

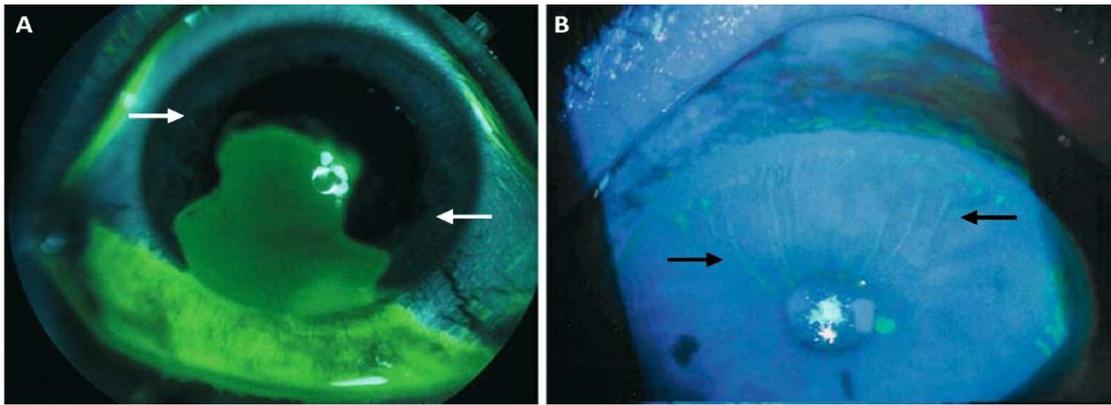


Figura 1 A: Biomicroscopía con tinción de fluoresceína de una cornea con cicatrización de una herida epitelial con afectación del limbo: se aprecia la migración, preferentemente circunferencial, de láminas de epitelio limbar a partir de sectores de cornea sana (flechas). **B:** Queratopatía columnar o signo temprano de DSCL: nombre dado a la tinción de columnas alternantes de epitelio corneal teñido con fluoresceína y epitelio corneal sano que corresponden a las palizadas de Vogt (flechas). (Con permiso de Br J Ophthalmol: Dua et al. 2001; 85:1379-1383).

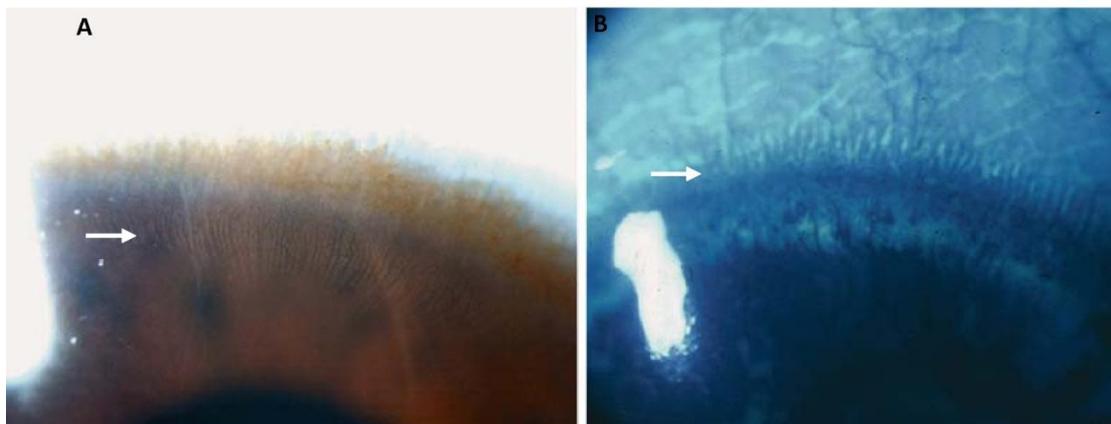


Figura 2: Biomicroscopía del limbo en donde se pueden apreciar las palizadas de Vogt. **A:** Columnas pigmentadas que están migrando dentro de la cornea periférica (flechas). **B:** Tinción con fluoresceína de las columnas migrando en respuesta a una lesión abrasiva central de la cornea (flechas). Con permiso de Reinhard T, Larkin DFP. Essentials in Ophthalmology: Cornea and External Eye Disease 2006.¹¹

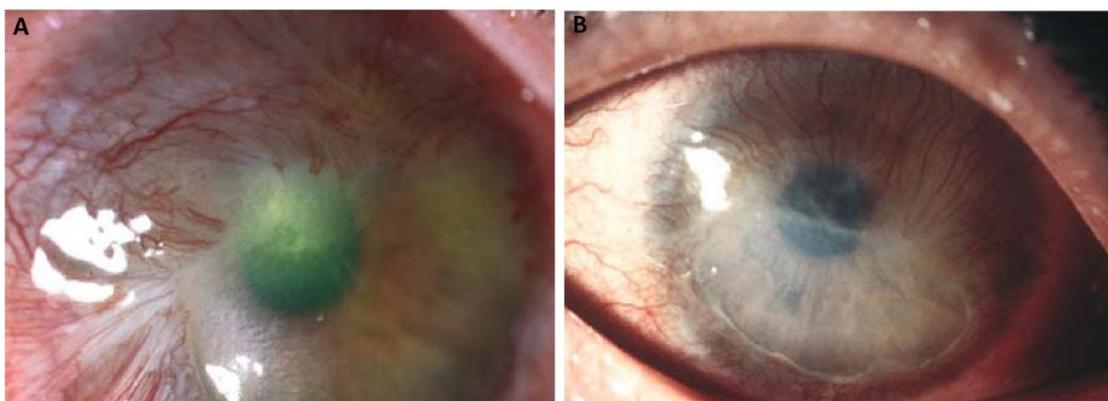


Figura 3: DSCL. A: Vascularización superficial y profunda con pannus fibrovascular que invade el tejido corneal luego de una herida química que afectó 9.5 husos horarios del limbo y 60% de la conjuntiva. **B:** Defecto epitelial persistente y pannus fibrovascular en una córnea con quemadura con cemento (solución alcalina). Con permiso de Br JOphthalmol: Dua et al. 2001; 85:1379-83 y Br JOphthalmol: Dua HS and Azuara-Blanco A 2000;84:273-8.

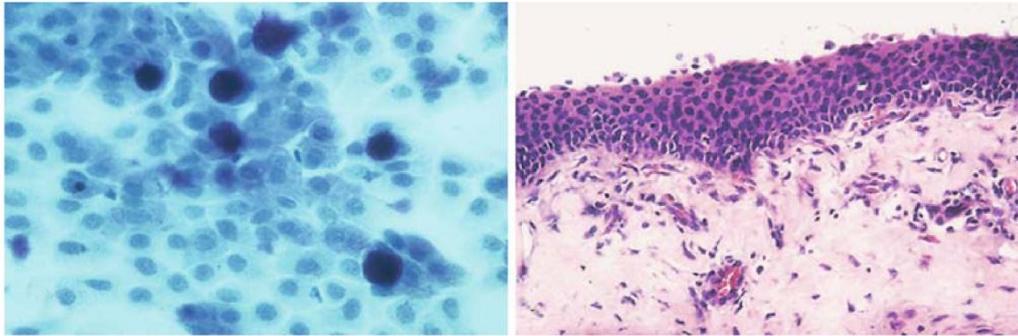


Figura 4: A: Citología de impresión de una superficie corneal con DSCL y pannus fibrovascular: El análisis muestra células caliciformes PAS positivas $\times 400$. B: Biopsia del pannus fibrovascular: Muestra un epitelio multiestratificado, vascularización (flecha) y linfocitos intraepiteliales en las capas basales del epitelio corneal dañado (flecha). Con permiso de Reinhard T, Larkin DFP. Essentials in Ophthalmology: Cornea and External Eye Disease 2006.²⁰³



Figura 5: DSCL por quemadura alcalina: A: Ojo derecho de un paciente con afectación de 10 husos horarios del limbo y 70% de la conjuntiva. B: Ojo izquierdo del mismo paciente con afectación de 12 horas del limbo y 90% de la conjuntiva. Se puede observar cicatrización con queratinización, vascularización corneal, adhesiones símil simblefaron. La conjuntiva tarsal fue también severamente dañada. Con permiso de Reinhard T, Larkin DFP. Essentials in Ophthalmology: Cornea and External Eye Disease 2006.²⁰³

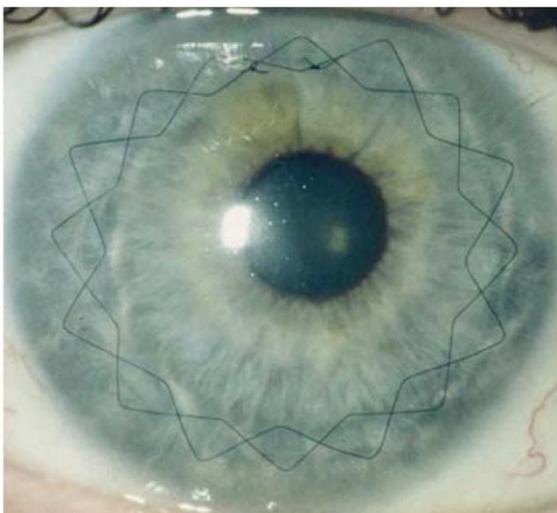


Figura 6: Biomicroscopía de una cornea con queratoplastia laminar profunda anterior realizada con disección manual y control óptico de la profundidad. Con permiso de Reinhard T, Larkin DFP. Essentials in Ophthalmology: Cornea and External Eye Disease 2006.²⁰³

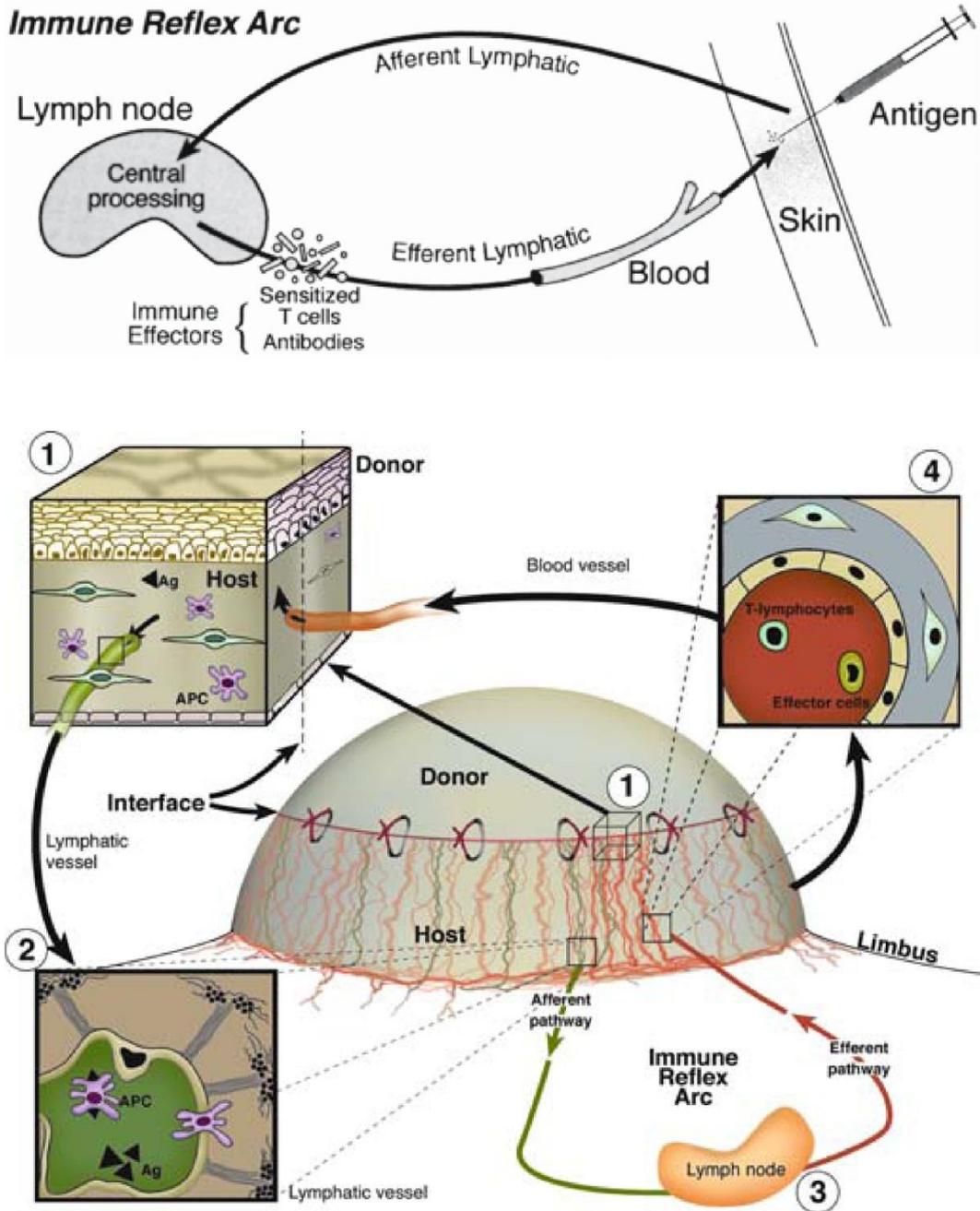


Figura 7: A Diagrama del "Arco Reflejo de Inmunidad": este circuito conlleva al rechazo del implante luego de una queratoplastia. El brazo aferente consiste en vasos linfáticos que transportan las células presentadoras de antígenos de la cornea donante. El proceso de esta información se realiza en los ganglios linfáticos cervicales profundos superiores donde se inicia la producción de las células inmunológicas efectoras. Estas células llegan a la cornea implantada por medio del brazo eferente, el cual consiste en vasos sanguíneos que neovascularizan la cornea y permiten la entrada e inicio del rechazo del injerto. **B: Arco reflejo de inmunidad en una cornea altamente neovascularizada:** La cornea donante neovascularizada tiene acceso directo al brazo linfático aferente y por lo tanto a los ganglios linfáticos cervicales profundos así como también al brazo arterial eferente del arco de inmunidad reflejo. Esto explicaría el riesgo mayor de rechazos que ocurre en una cornea implantada que sufra de neovascularización. Modificado de Streilein JW. Immune responses and the eye 1999;17.⁷³

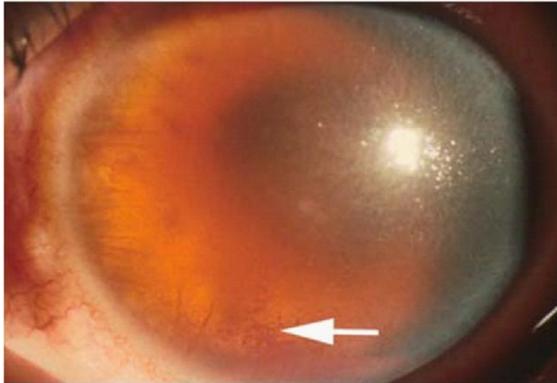
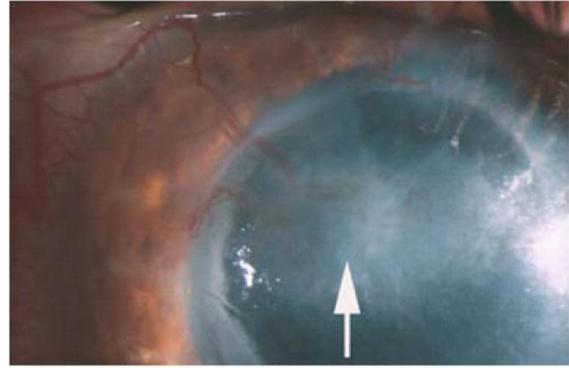
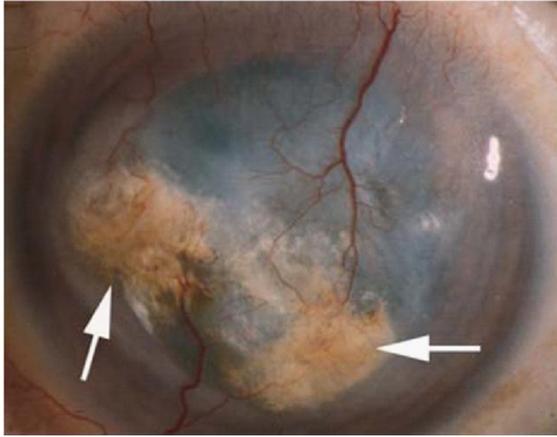


Figura 8 A-C. Complicaciones de la neovascularización corneal que conllevan a la reducción de la agudeza visual. **A:** Queratopatía grasa (flechas). **B:** Hemorragia intraestromal. **C:** Edema estromal secundario a la filtración de los vasos sanguíneos inmaduros. Con permiso de Reinhard T, Larkin DFP. *Essentials in Ophthalmology: Cornea and External Eye Disease* 2006.201

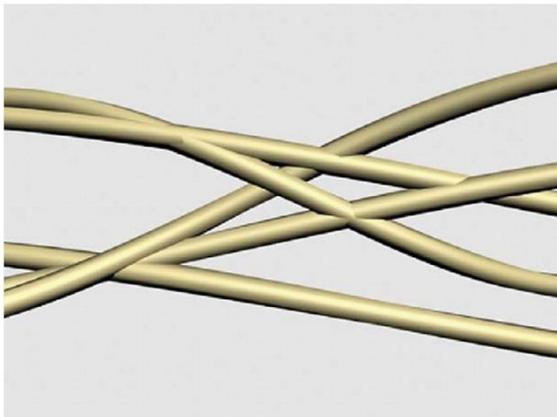
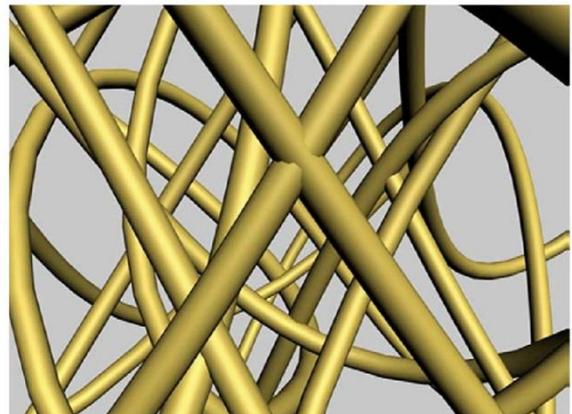


Figura 9: Modelo computarizado teórico de las uniones bilaterales de fibrina: Se puede apreciar la rigidez de su arquitectura. (D-TEP v1.3).

Figura 10: Modelo computarizado teórico de la red de fibrina resultante luego de la activación de los adhesivos comerciales. En estos adhesivos al fibronectina es atrapada en forma de redes



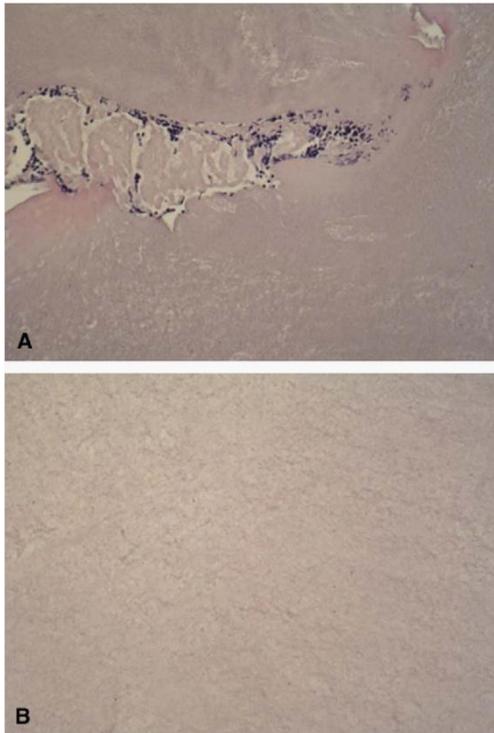


Figura 11 "Coágulo de Fibrina" del PRP: A: La porción inferior de la matriz de fibrina del PRP está ocupada por estrías blanquecinas como agregados de fragmentos celulares. Estos son los acúmulos de plaquetas que constituyen el "coágulo de fibrina". B: En la porción superior no se aprecian plaquetas o algún otro cuerpo celular. H&E 400X

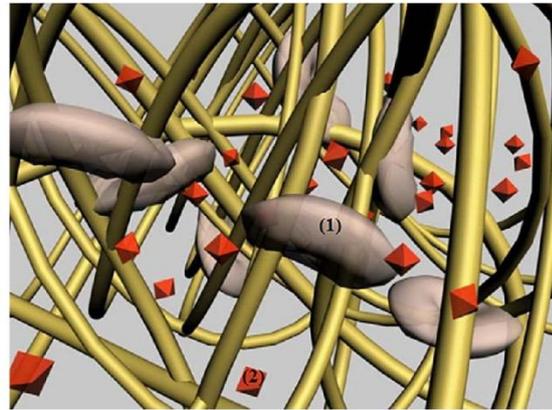


Figura 12 Módulo teórico computarizado de la red de fibrina del PRP. 1: Las plaquetas activadas son atrapadas en la malla de fibrina y liberan una significativa cantidad de citoquinas que son retenidas extrínsecamente junto a la arquitectura de fibrina. 2: Citoquinas plaquetarias en solución. (D-TEP v1.3; escalas no respetadas).

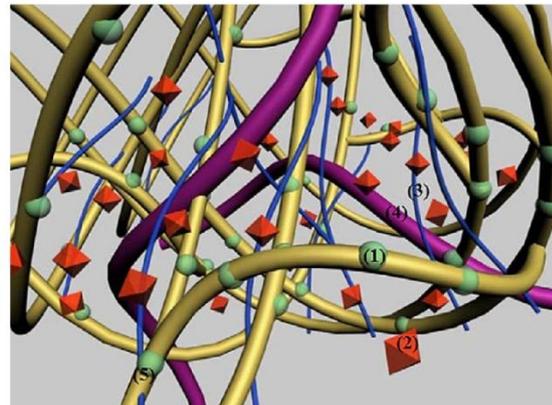


Figura 13 Módulo teórico computarizado del coágulo de PRP. Se aprecian distintas glicoproteínas estructurales, como al fibronectina y citoquinas extrínsecas en solución embebidas dentro de la matriz de fibrina. La activación del PRP incluso permitiría retener cadenas polimerizadas de fibrina y citoquinas, semejándose a un trombo de fibrina natural. 1: Citoquinas retenidas en la malla de fibrina intrínseca. 2: Citoquinas plaquetarias en solución asociadas a polímeros de fibrina. 3: Cadenas polimerizadas de fibrina y citoquinas. 4: Glicoproteínas circulantes (fibronectina). 5: Fibrillas de fibrina asociadas a cadenas polimerizadas de fibrina y citoquins. (D-TEP v1.3; escalas no respetadas).



Figura 14 Fotocoagulación láser de neovascularización corneal: El láser se aplicó sobre el origen de los neovasos en su porción conjuntival más cercana al limbo. No se realizaron disparos sobre la cornea.

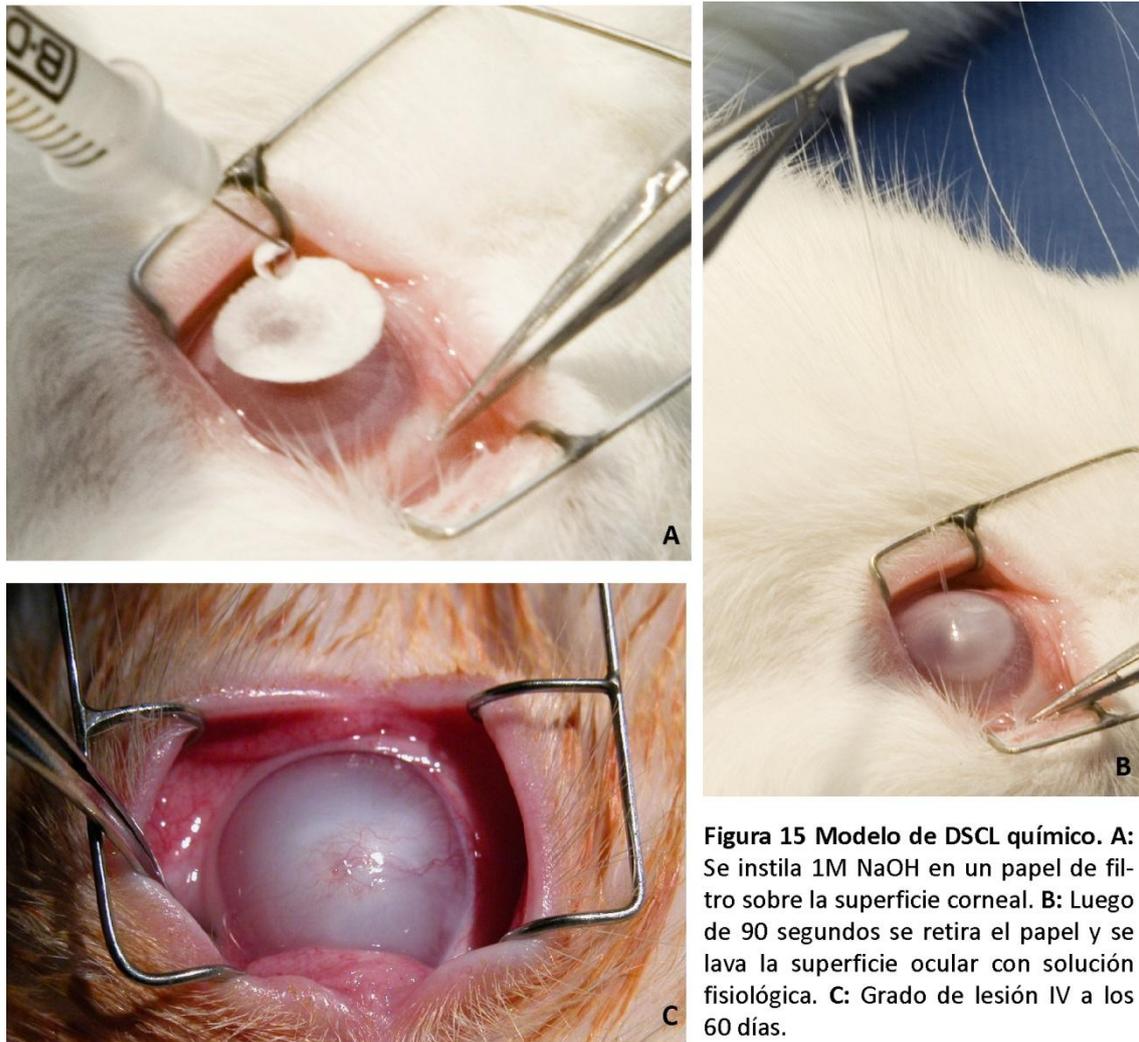


Figura 15 Modelo de DSCL químico. A: Se instila 1M NaOH en un papel de filtro sobre la superficie corneal. B: Luego de 90 segundos se retira el papel y se lava la superficie ocular con solución fisiológica. C: Grado de lesión IV a los 60 días.

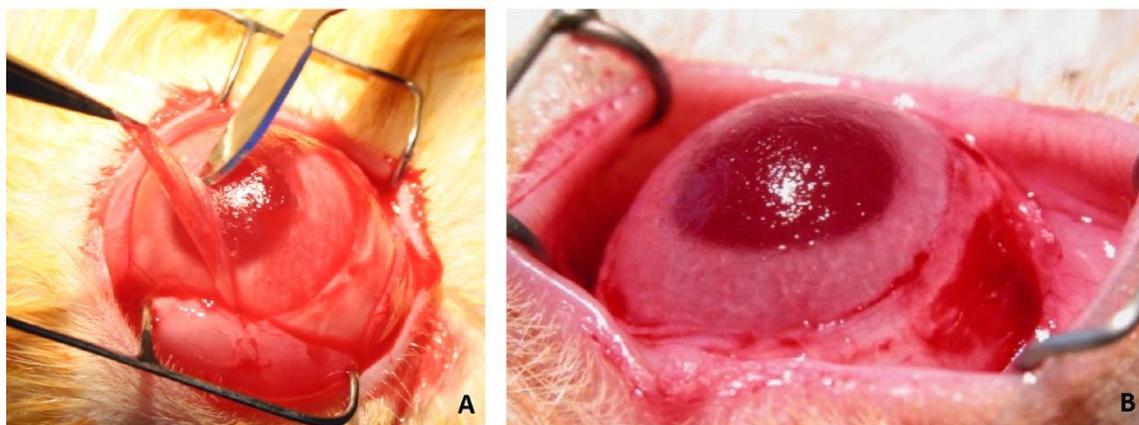
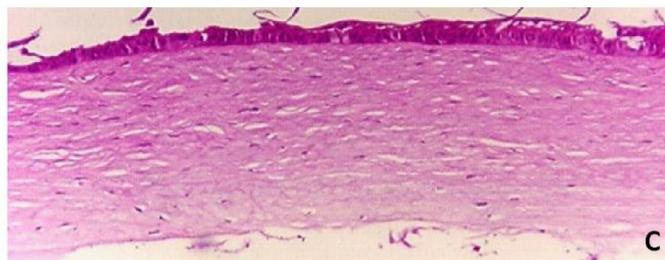


Figura 16: Modelo de DSCL mecánico. A: Queratectomía laminar mediante peeling off del tercio anterior de cornea, epitelio y la totalidad del limbo esclero corneal. B: Estroma remanente denudado. C: Botón corneal incluyendo estroma y totalidad de epitelio



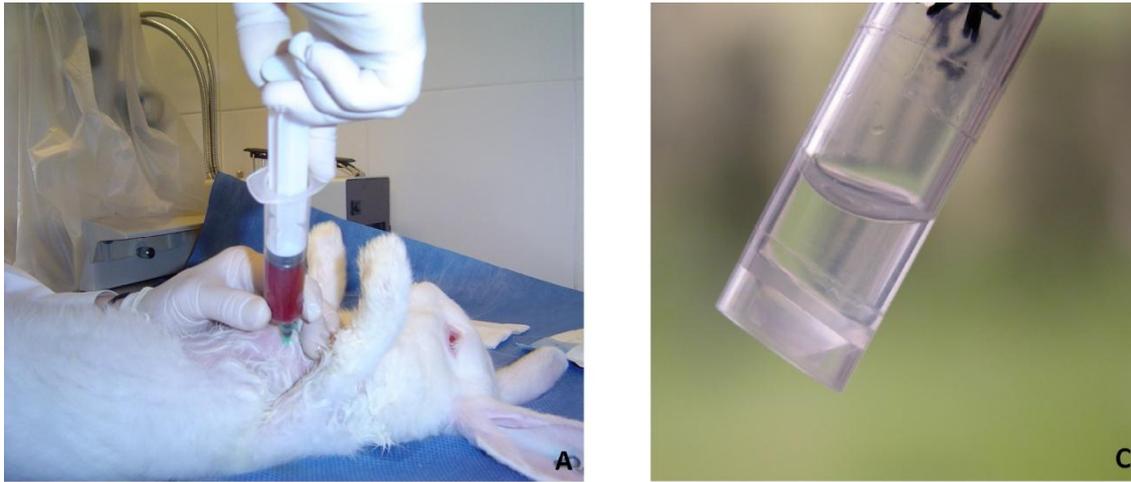


Figura 17 Preparación del PPP.
A: Se extraen 20ml de sangre intracardiaca. **B:** Luego de la primer centrifugación se separa el plasma y las plaquetas (superior) de los globulos blancos (intermedio) y los globulos rojos (inferior). Luego de una segunda centrifugación, se obtiene un PPP (**C**) que es colocado en un freezer de -20°C hasta su utilización y PRP (**D**) que activado con CaCl comienza a formar el coagulo adhesivo (flechas).

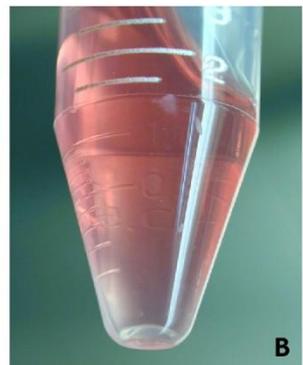
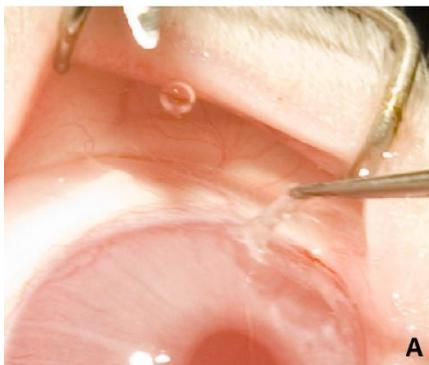
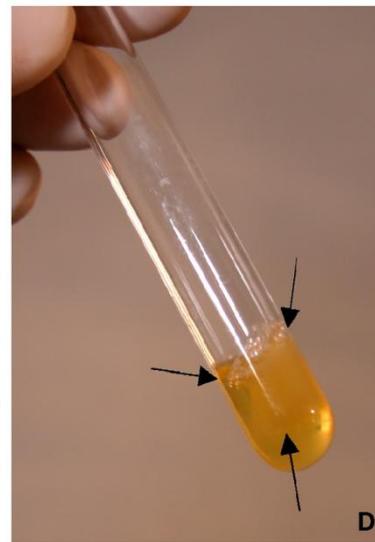
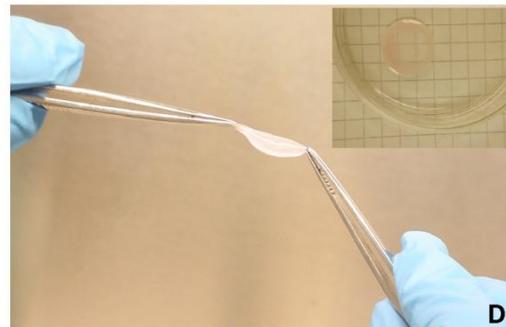


Figura 18 Toma de biopsia y cultivo de SC de limbo.
A: Mediante un trépano 3,2mm² se biopsia el limbo esclerocorneal. **B:** La biopsia se deposita en un medio de transporte **C:** Las células epiteliales limbares se siembran sobre una capa de fibroblastos de ratón 3T3 irradiados durante 21 días **D:** La lámina de epitelio obtenida se ensambla sobre PPP logrando una lámina elástica, resistente y con gran transparencia en condiciones de ser utilizada.



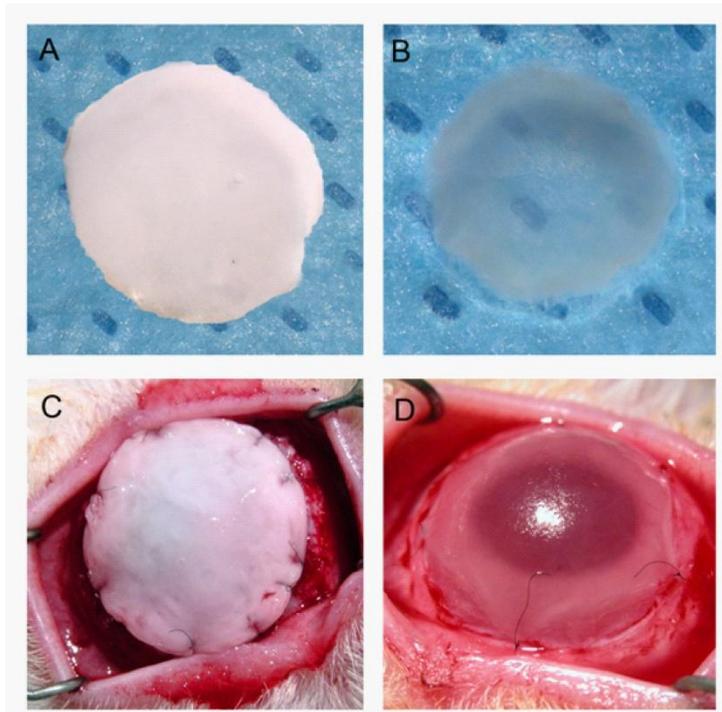


Figura 20: Características macroscópicas de las láminas corneales cultivadas sobre distintos soportes celulares. **A y C:** láminas corneales con Tissucol como soporte. **B y D:** láminas corneales con PPP como soporte. Las láminas con Tissucol son opacas mientras que el PPP otorga gran transparencia al implante a suturar.

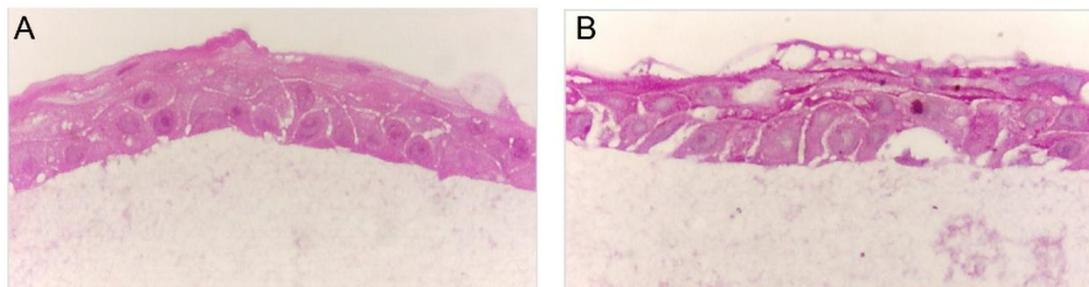


Figura 21 Características histológicas de las membranas cultivadas. **A:** Lamina corneal cultivada sobre PPP. **B:** Lámina corneal cultivada sobre Tissucol. Ambas imágenes muestran un epitelio estratificado en 4 capas. Las células inferiores son poligonales y muestran un núcleo prominente. Las células de las capas intermedias presentan morfología irregular y la capa superficial está formada por células planas con núcleos compactos de cromatina homogénea.

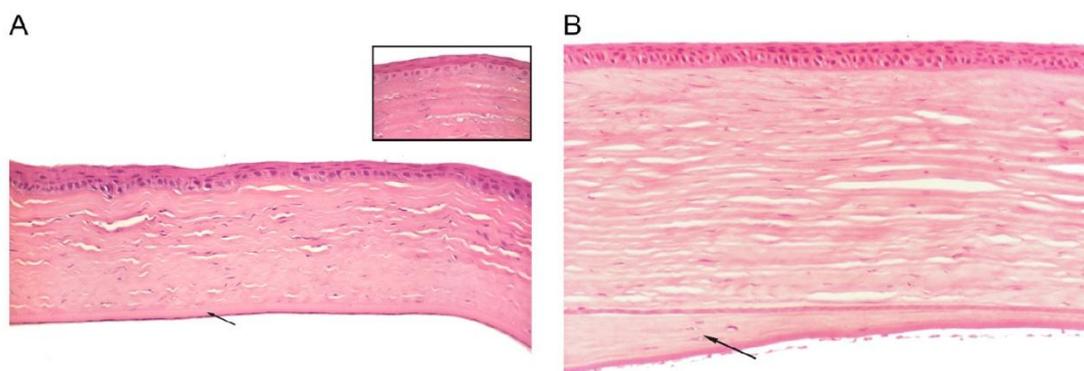


Figura 22: Cambios histopatológicos a un año de seguimiento luego del implante de SC autólogas sobre una cornea con DSCL secundario a quemadura alcalina (H&E). **A:** 30 días POP. Se observa una ectasia cicatrizal con endotelio duplicado secundario a la lesión alcalina. La superficie presenta un epitelio estratificado no queratinizado con una configuración y morfología normal. Células símil epiteliales con citoplasma claro se observan en la porción profunda del epitelio. **B:** 1 año POP. La cornea presenta un espesor normal y pérdida de queratocitos, La membrana de Descemet está cubierta de un tejido proliferativo fibrocolagenoso con duplicación del endotelio. El epitelio estratificado de 5 capas muestra una morfología normal.

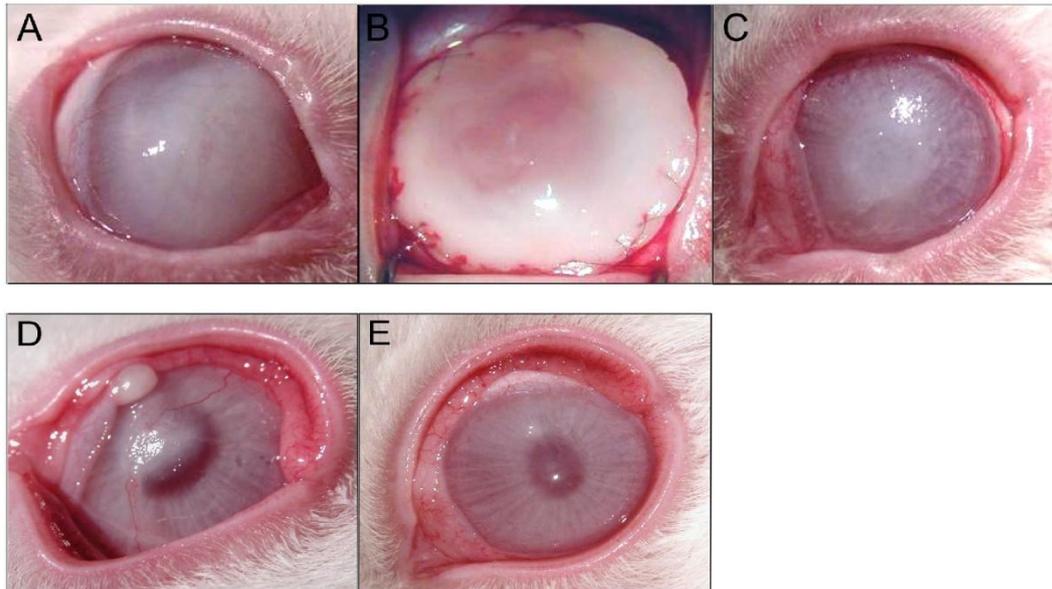


Figura 23: Evolución clínica durante un año de seguimiento en conejos con implantes autólogos de SC luego de haber sido lesionados con soda cáustica. A: Opacificación y vascularización corneal preoperatoria. B: Implante de la lámina epitelial. C: 30 días luego del trasplante persiste un leucoma central e irregularidad del epitelio. D: 90 días POP. Neovascularización corneal que fue luego tratada con fotocoagulación con láser argón. E: 1 año POP. Se aprecia una cornea clara y ausencia de signos de DSCL.

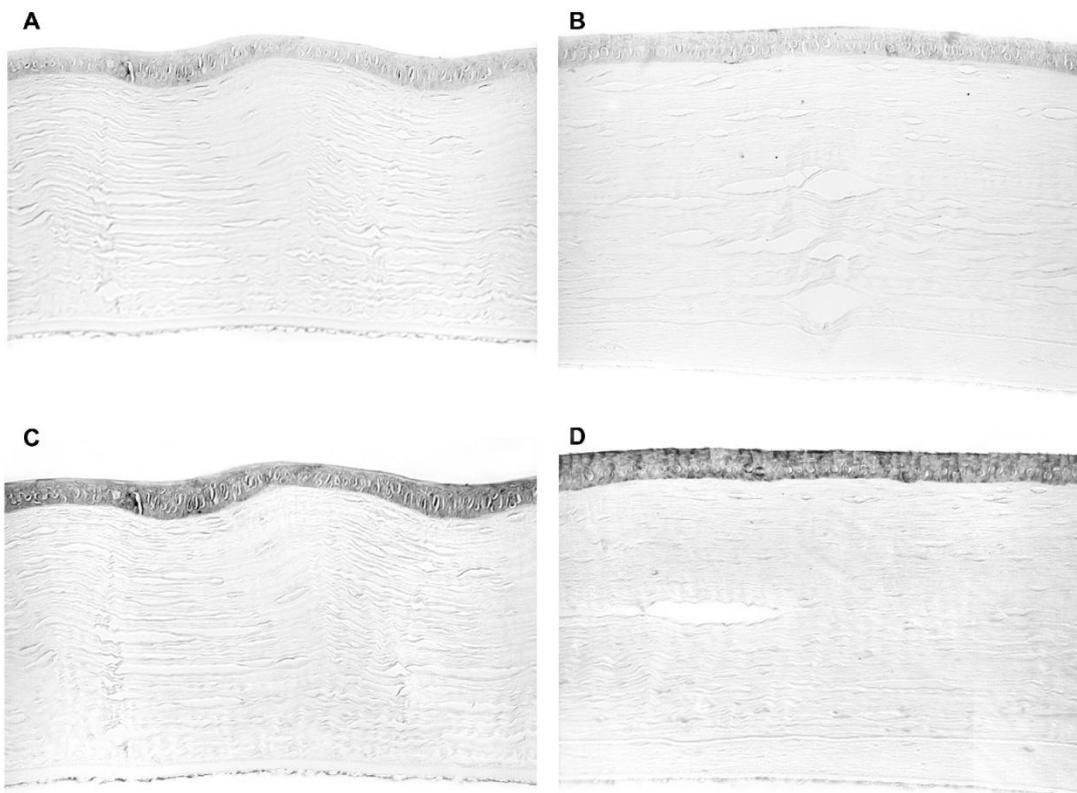


Figura 24: Análisis inmunohistoquímico de las queratinas al año POP. A y C: Inmunoreactividad de K19 (A) y K3/12 (C) en una córnea de conejo normal. B y D: Inmunoreactividad de K19 (B) y K3/12 (D) en una córnea con DSCL implantada con neo epitelio cultivado. En ambas corneas se observa marcación negativa para K19 y positiva para K3/12. LA expresión de K3/12 en las corneas implantadas muestra diferentes grados de intensidad mientras que en la cornea normal se ve una marcación homogénea.

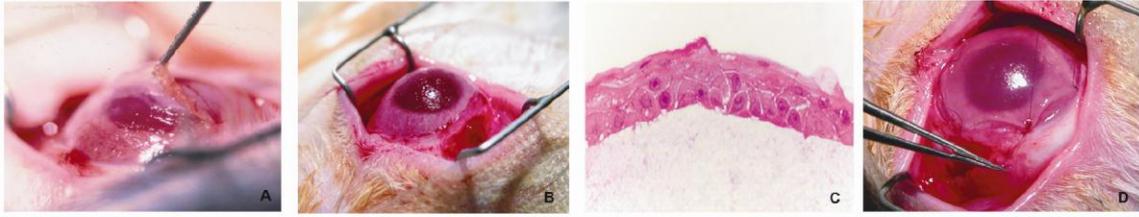


Figura 25 Implantes homólogos de laminas de neo epitelio cultivado sobre PPP. A-B-D: Una vez que la queratectomía fue realizada, el estroma receptor es cubierto por la lámina epitelial que es suturada a la esclera mediante puntos simples de nylon 10-0. C: Se puede apreciar una lámina de epitelio estratificado en 4 capas sobre PPP.

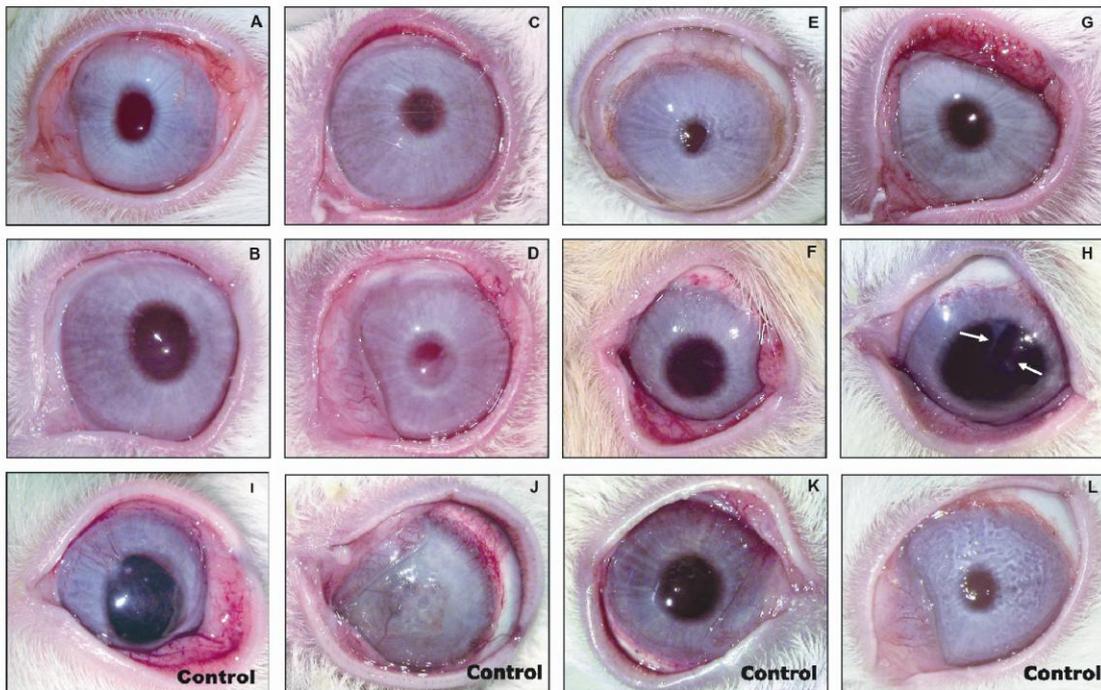


Figura 26: Resultados clínicos de los animales con DSCL mecánico que recibieron implantes de neo epitelio vs grupos control. A-H: Grupo Tratado. B-C-E-F-G: corneas claras y avasculares con superficie reepitelizada. No hay signos de DSCL. A: Neovascularización. D: leucoma estromal. H: Leucoma consecuente a neovascularización en regresión. I: Grupo control sin implante a 3 meses. J-L: Grupo control con PPP a 4 meses POP (J), 8 meses POP (K) y 1 año POP (L). En todos los casos se pueden observar signos de DSCL.

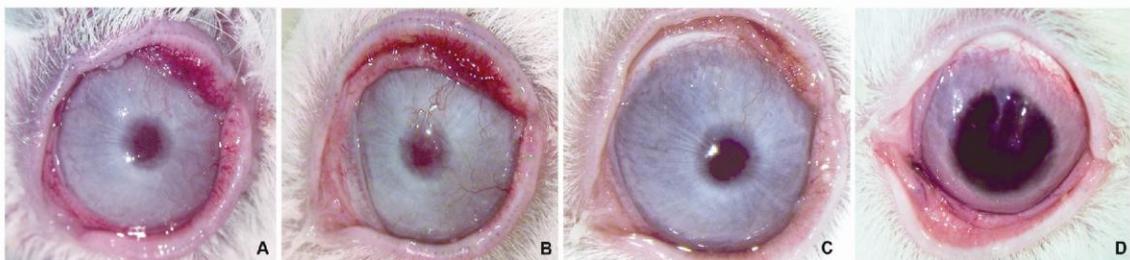


Figura 27: Autoregresión de la neovascularización corneal en un animal tratado. A: 4 meses POP. B: 8 meses POP. C: 10 meses POP. D: 1 año POP

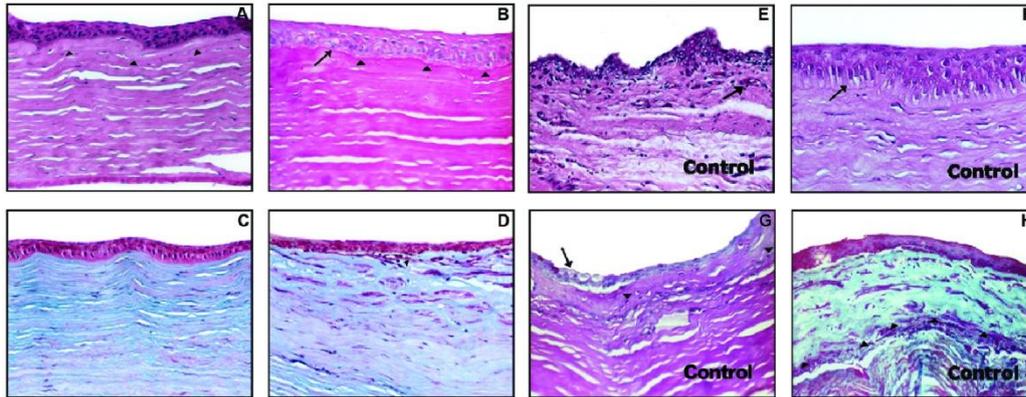


Figura 28: Resultados histológicos de los animales con DSCL mecánico a un año de haber recibido implantes de neo epitelio vs grupo control. A-D: Grupo tratado. A: A 90 días POP, las corneas implantadas muestran un epitelio de configuración multilaminar con maduración de células basales poligonales a planas superficiales. Debajo del epitelio se observa una capa acelular hialina de colágeno con queratocitos aislados (flechas). El estroma medio y profundo, así como la membrana de Descemet y el endotelio presentan una configuración normal (H&E). **B:** PAS de otra cornea que muestra células tipo epiteliales con citoplasma claro en la capa basal del epitelio corneal (flecha) y una membrana basal continua. Una capa acelular PAS positiva se observa entre la membrana basal epitelial y el estroma corneal (cabeza de flechas). **C:** En el área central de la cornea, debajo de una lámina homogénea de epitelio se puede apreciar un estroma corneal remanente con disposición laminar y queratocitos normales (Masson). **D:** En la córnea periférica se observa, entre el epitelio implantado y el estroma residual, una lámina gruesa de miofibroblastos y depósitos colágenos que contienen algunas células inflamatorias (cabeza de flechas) (Masson). **E-H: Grupo control. E:** Se distinguen un epitelio irregular regenerativo de la conjuntiva limbar sobre el estroma receptor y una cicatriz subepitelial con células inflamatorias y neovascularización (flecha) (H&E). **F:** En estas corneas se aprecia un epitelio de mayor altura comparado con corneas sanas o tratadas, con diferenciación celular incompleta (flecha) (H&E). **G:** PAS de la periferia de la cornea que muestra células caliciformes intraepiteliales (flecha) y una cicatriz estromal (cabeza de flechas). **H:** Cornea central de un ojo control con epitelio corneal escamoso multilaminar y una gruesa cicatriz con miofibroblastos, depósitos colágenos y células inflamatorias en la interface con el estroma remanente (cabeza de flechas) (Masson).

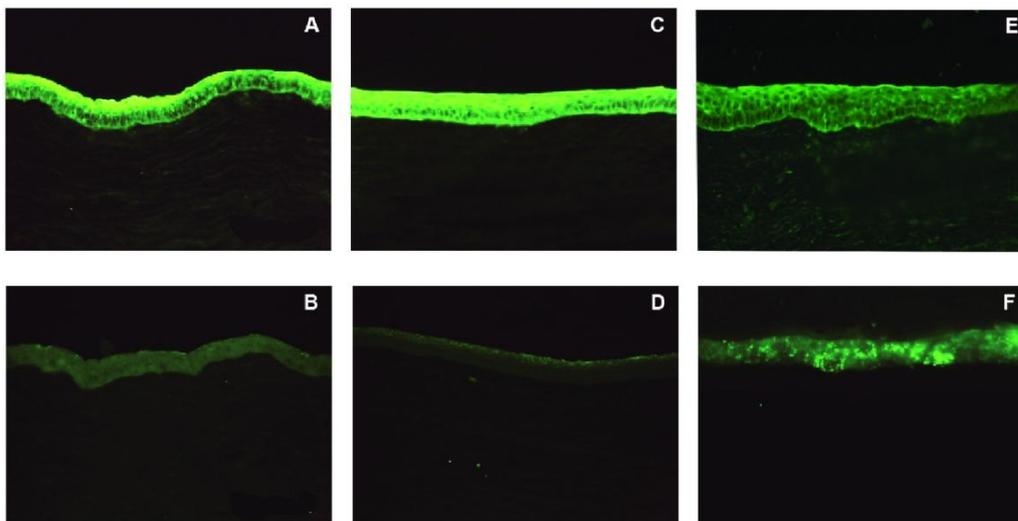


Figura 29: Inmunofluorescencia de los animales con DSCL mecánico a un año de haber recibido implantes de neo epitelio vs grupo control. A-B: Epitelio corneal normal. A: K3/12 positivo. **B:** K19 negativo. **C-D: Grupo tratado: C:** K3/12 positivo. **D:** K19 negativo. **E-F: Grupo control a 1 año. E:** K3/12 levemente positivo. **F:** K19 positivo con patrón parcheado y errático.

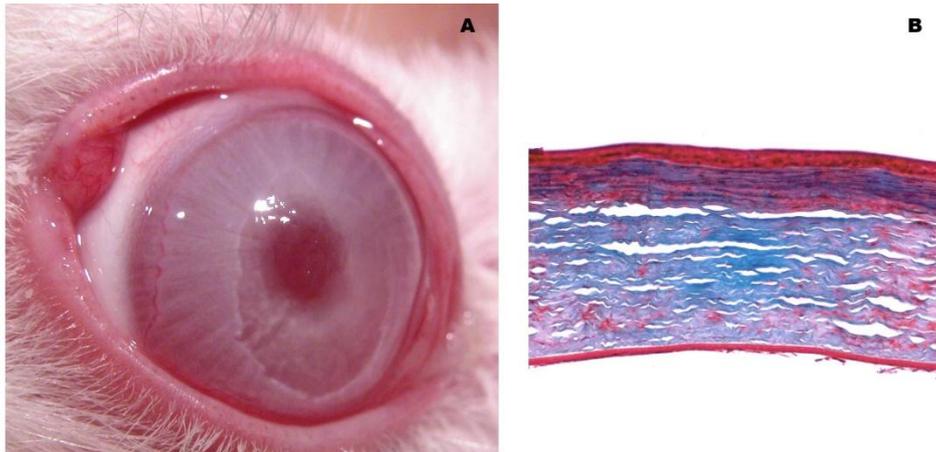


Figura 30: Resultados clínicos e histopatológicos 30 días luego de haber realizado un trasplante laminar autólogo adherido con PRP. A: Se observa un flap adherido y claro, sin signos de inflamación. B: Mediante tinción con Masson se puede apreciar el implante laminar ocupando un tercio de la cornea sin defectos epiteliales (Masson 60X).

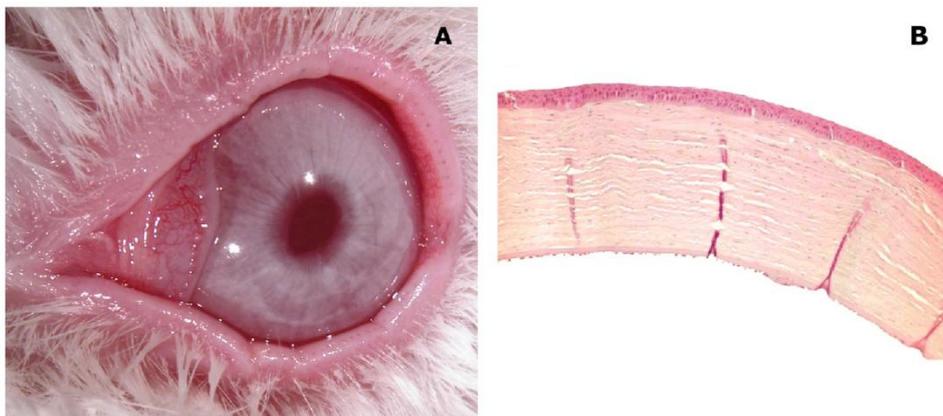


Figura 31: Resultados clínicos e histopatológicos 90 días luego de haber realizado un trasplante laminar autólogo adherido con PRP. El implante permanece adherido con características macro (A) y microscópicas (B) normales (H&E 60X)

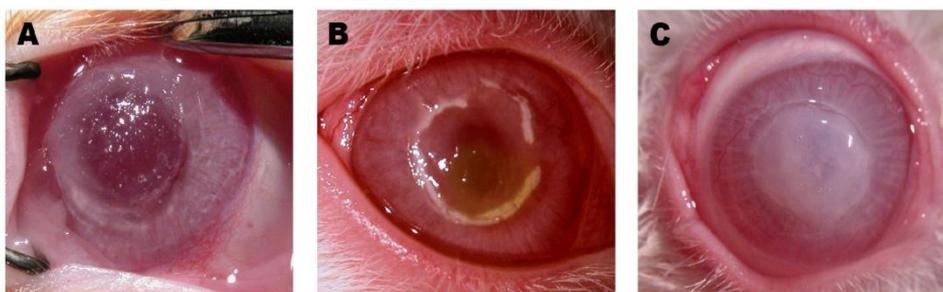


Figura 32: Evolución clínica del PRP en las horas postoperatorias inmediatas. A: El PRP activado es instilado entre el estroma y el flap. B: Un halo periférico opalescente de PRP coagulado se observa a los 10 minutos de haber sido aplicado como adhesivo. C: La coagulación de las plaquetas da a la cornea un aspecto blanquecino a las 6 horas de haber sido instilado.

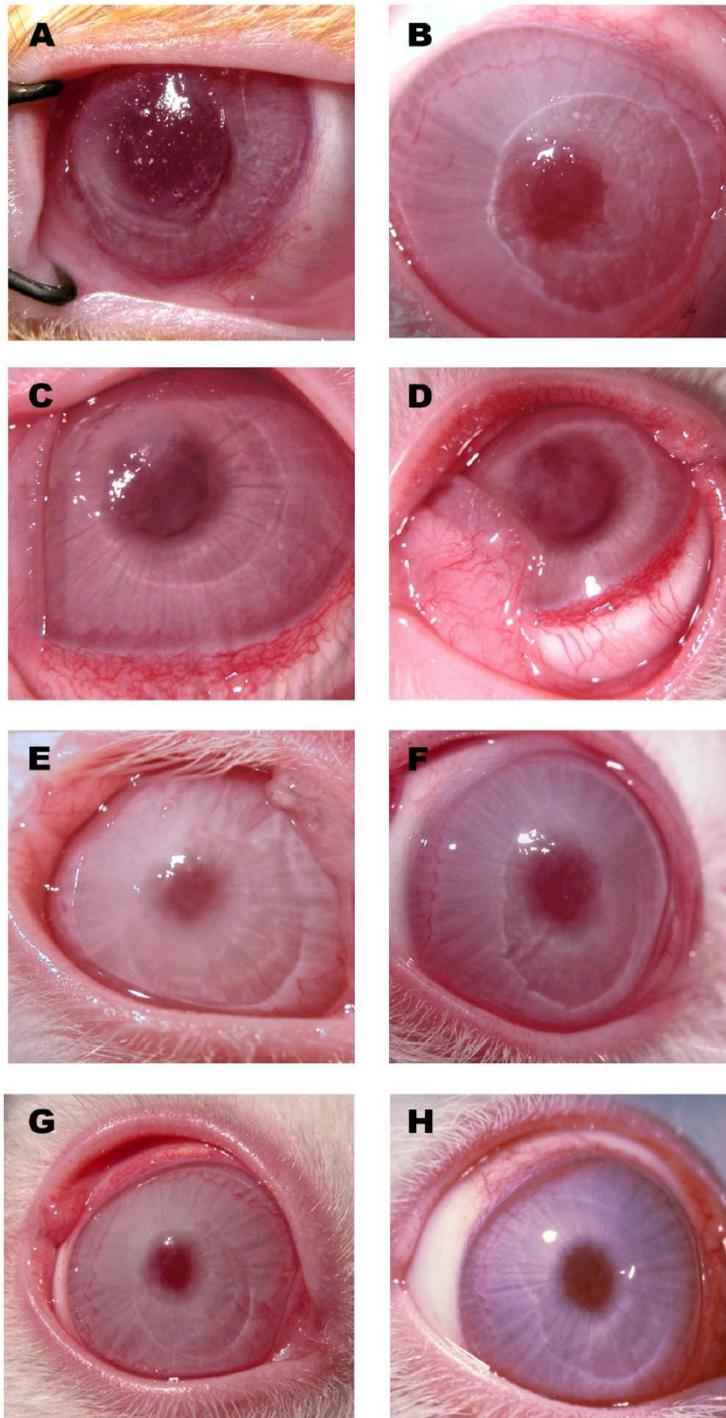


Figura 33: Evolución clínica de la queratoplastia laminar con PRP como adhesivo en conejos. A-B: Flaps corneales adheridos a los 2 días con interfase opalescente. C-D: Al 7mo día POP se observa una opacidad media que progresa a una cornea clara a los 30 días (E-F) y se mantiene hasta los 90 días POP (G-H)

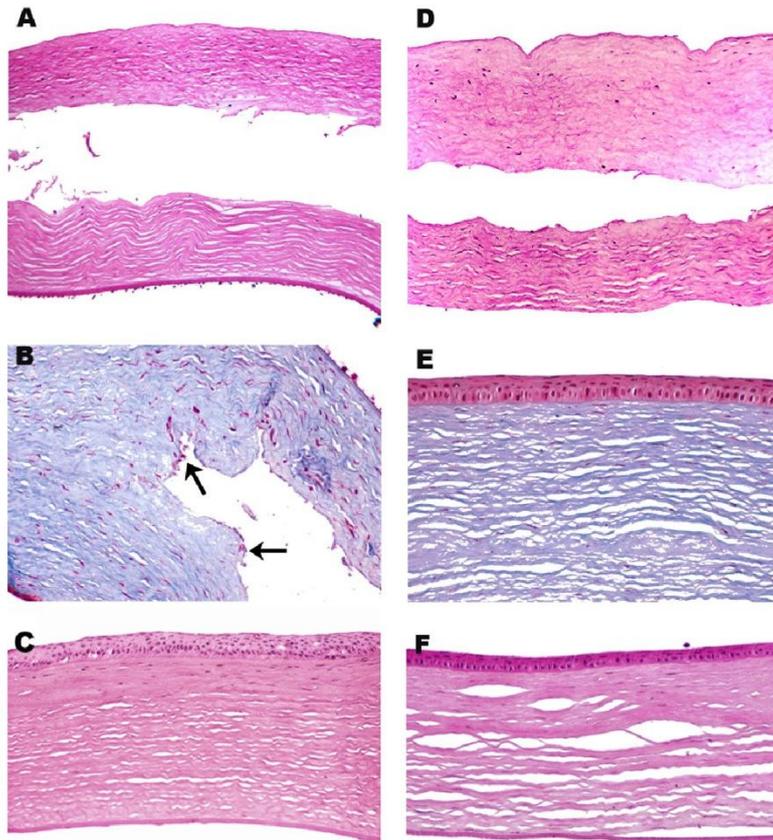


Figura 34 Análisis histopatológico de la queratoplastia laminar entre los grupos con PRP (A-C) y con suturas (D-F). A y D: Interfaces desprendidas al 2do día POP secundario a la retracción del propio análisis histológico (PAS y H&E 60X). B: Depósitos granulares de PRP coagulado están presentes al 7mo día POP (flechas) compatibles con la apariencia clínica (Masson 125X). C: Flap adherido a los 90d POP (H&E 125X). E-F: En el grupo con suturas los flaps están adheridos sin inflamación del estroma corneal al 7mo día POP (Masson 125X) así como a los 90d POP (H&E 215X)

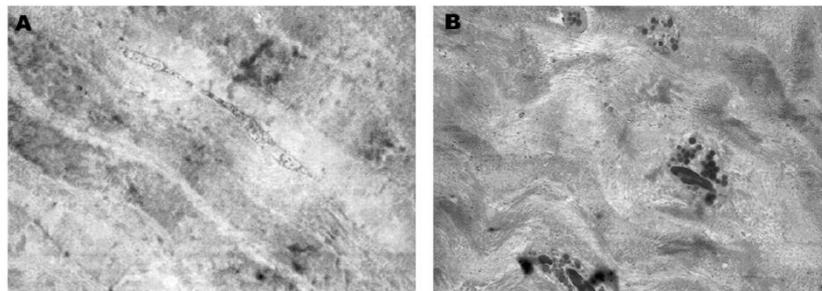


Figura 35: Microscopía electrónica del estroma del grupo P (A) y grupo S (B). A: Se observa una disposición regular del colágeno formando las lamelas estromales y queratocitos de morfología normal. B: Se puede apreciar el desarreglo de las láminas de colágeno y células inflamatorias, representado probablemente leucocitos cerca de los puntos de sutura.

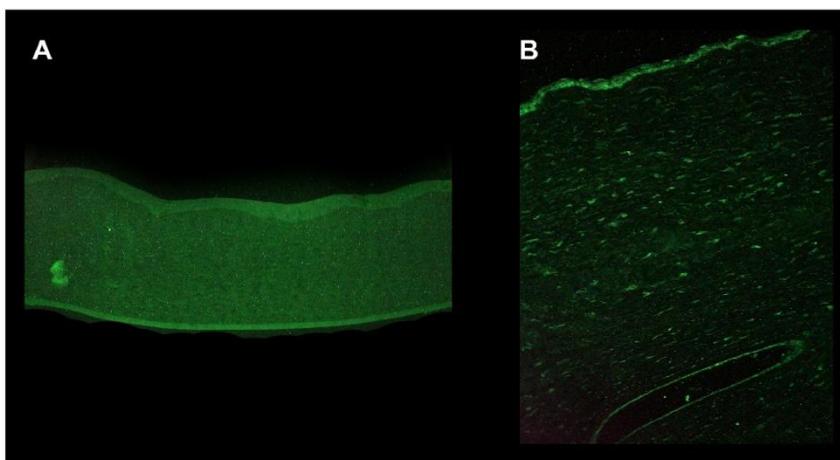


Figura 36: Inmunofluorescencia del SMA en el grupo P (A) y grupo S (B). A: En el grupo P no se observa positividad para SMA. B: El grupo S, particularmente cerca de los puntos de sutura, muestra positividad fluorescente para SMA.

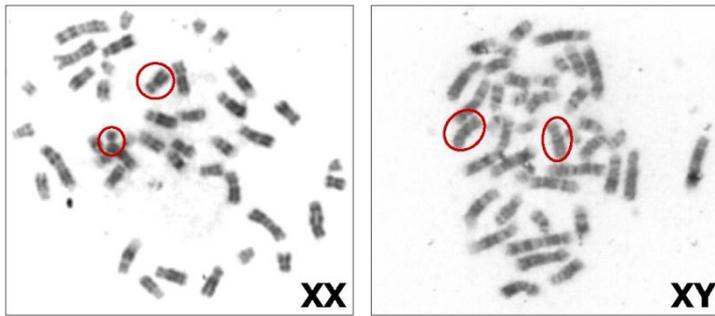


Figura 37: Resultados genéticos de las corneas con DSCL mecánico a un año de haber recibido implantes de neopitelio homólogo: Cromosomas alogénicos fueron detectados en 1 de cada 2 animales biopsiados a los 4, 7 y 12 meses del POP

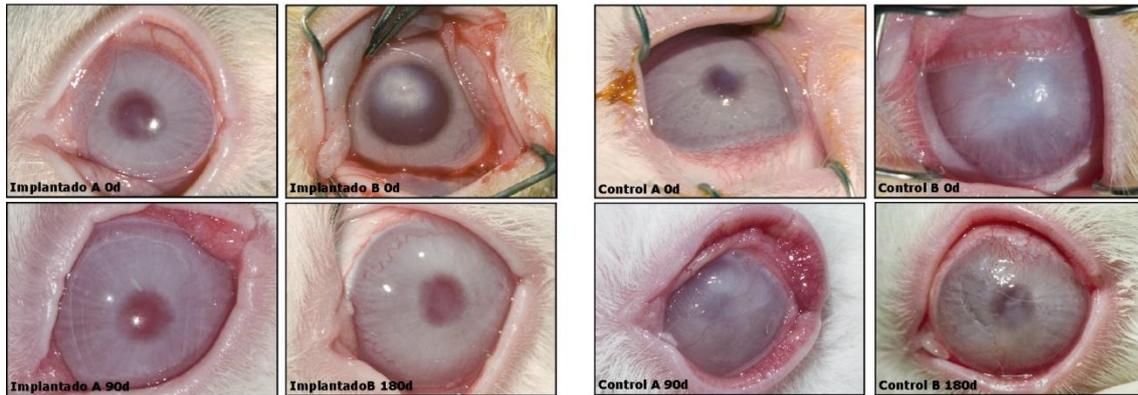


Figura 38: Resultados clínicos a los 6 meses del POP de los animales con DSCL químico que recibieron implantes de neopitelio autólogo montado sobre PPP vs grupo control: La isquemia limbar declinó en los animales implantados mientras que el grupo control mantuvo o empeoró sus signos de DSCL. La opacidad corneal evolucionó favorablemente en el grupo tratado, no así en el grupo control. No hubo signos clínicos de rechazo del injerto. No se observaron daños en al cornea por la fotocoagulación.

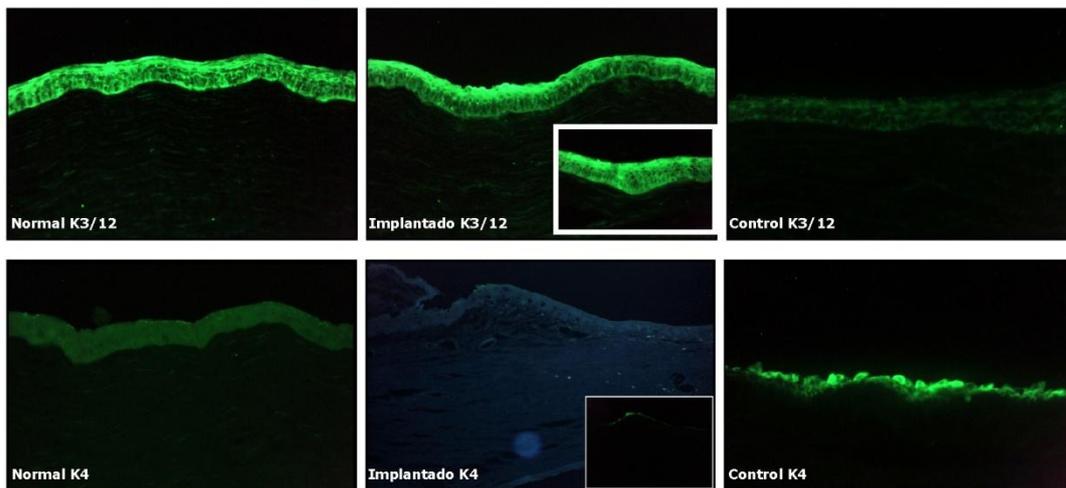


Figura 39: Inmunofluorescencia de K3/12 y K4 a los 6 meses del POP de los animales con DSCL químico que recibieron implantes de neopitelio autólogo montado sobre PPP vs grupo control: La expresión de citoqueratinas 4 y 3/12 en las corneas de los 16 animales tratados fue similar a lo hallado en corneas normales (C 4 negativa y C 3/12 positiva). El grupo control mostró una leve marca positiva para citoqueratinas 3/12 y una fuerte expresión de citoqueratina 4

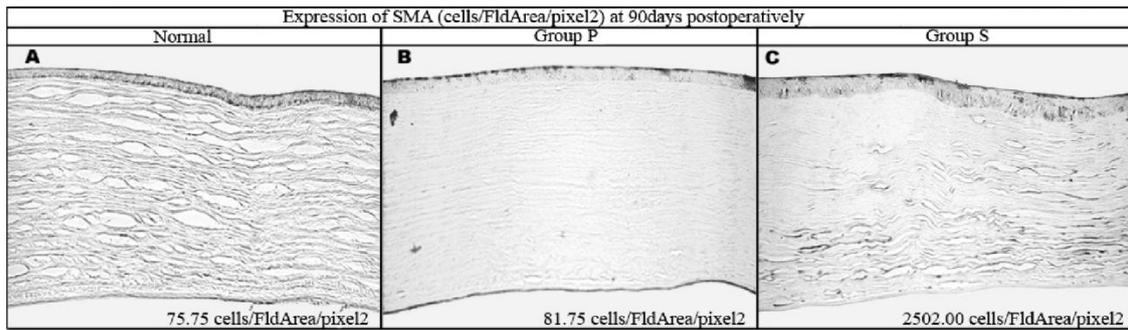


Figura 40: Análisis de imágenes de marcación de SMA en el estroma de corneas sanas (A) y a los 90 días del queratoplastias laminares realizadas con PRP (B) o Suturas (C). La marcación del grupo P y la cornea normal es similar. El grupo S muestra una clara diferencia. Las medidas fueron realizadas por densitometría cuantitativa y los valores mostrados son las medianas.

INTRODUCCIÓN Y FUNDAMENTOS

La córnea es un órgano único en la naturaleza. Un elemento de intrincada composición que permite, a través de su transparencia, lograr su función como el mayor elemento óptico del ojo. Es un segmento vulnerable pero al mismo tiempo suficientemente fuerte para actuar como una gran barrera ante el medio externo. La córnea es expuesta durante gran parte del día y así aún es capaz de mantener su superficie delicada y sensible necesaria para la formación de una imagen efectivamente focalizada en la retina.

El epitelio de su superficie es continuamente reemplazado a través de la regeneración efectuada por las stem cells del limbo corneal. La cornea tolera repetidas distorsiones por la misma frotación con las manos, y sin embargo vuelve satisfactoriamente a su forma original. A pesar de que esté en permanente contacto con la flora microbiológica y otras noxas del medio ambiente, la cornea generalmente logra defenderse de los mismos. Su envejecimiento es un proceso extremadamente fabuloso y si las cosas llegan a ir mal, esta misma cornea permite su reemplazo y aceptación de un nuevo órgano en su lugar.¹

FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LA CÓRNEA

La cornea comprende una sexta parte del ojo. Su unión con la esclera, conocida como el limbo esclero corneal, es la zona donde se encuentran las células madre o stem cells capaces de regenerar gran parte de la superficie ocular. La cornea tiene dos funciones principales: proteger el contenido intraocular y refractar la luz. Para esto debe mantener su integridad y transparencia. Cualquier opacidad en la cornea provocará una degradación en la imagen óptica.²

La córnea es una estructura transparente y libre de vasos sanguíneos. Todas sus capas tisulares obtienen oxígeno a través de la superficie anterior, principalmente del film lagrimal. El resto de los nutrientes son obtenidos por la superficie posterior, salvo el retinol que también proviene de las lágrimas. Este compuesto es importante para evitar la queratinización de las células epiteliales superficiales de la cornea. Sin *retinol*, el epitelio se vuelve queratinizado como sucede en el déficit de vitamina A, principal causa de ceguera corneal.³

El epitelio se presenta como una estructura continua sobre la superficie anterior de la cornea, y las células basales del epitelio toman contacto con la membrana basal epitelial. El endotelio se encuentra en su cara posterior y descansa sobre su membrana basal (Membrana de Descemet). Entre ambas membranas basales se encuentra el estroma. El epitelio inhibe la difusión de agua y solutos de las lágrimas al estroma, en parte evitando el edema corneal. En el

estroma, los proteoglicanos y glicosaminoglicanos (GAGs) mantienen las fibrillas de colágeno en una disposición ordenadamente laminar requerida para la claridad óptica. A fin de lograr esto, los GAGs deben estar relativamente deshidratados. El endotelio es quien cumple esta función de deshidratarlos, impidiendo la entrada de humor acuoso a partir del interior del ojo y removiendo el agua que se encuentre en el estroma mediante un mecanismo activo de bombeo, que requiere oxígeno obtenido del film lagrimal por medio del epitelio corneal.⁴

Ultraestructuralmente, la superficie externa de la cornea de 5 a 7 capas de epitelio plano estratificado no es lisa. Contiene proyecciones tipo microvellosidades que le dan a esta superficie un contorno reticular e irregular. Sin embargo, para poder actuar como un elemento óptico, la superficie ocular de la cornea está cubierta de una delgada capa de lagrimas conocida como film lagrimal pre corneal. Esta interfase lagrimal – aire es la superficie más poderosa del ojo, contando con un 80% (60 dioptrías) del total del poder refractivo del ojo, es decir, un 80% de la capacidad óptica del ojo para poder actuar como órgano de la visión.⁵

ESTRUCTURA CORNEAL ANTERIOR

EPITELIO CORNEAL – ESTRUCTURA Y FUNCIONES

El epitelio corneal plano, estratificado, no queratinizado, compuesto en 5 a 7 capas, forma parte del 10% del grosor de la córnea. Morfológicamente se divide en 3 secciones:

1. Una capa simple de células columnares basales y membrana basal.
2. Dos o tres capas de células aladas poligonales.
3. Dos o tres capas de células planas superficiales.

Normalmente las células basales son las que se replican y sus células hijas se mueven apicalmente y se convierten en células aladas, que luego migran a la superficie permaneciendo en forma aplanada hasta que son desprendidas del epitelio y desechadas al film lagrimal. Este reemplazo total del epitelio corneal dura 1 semana. Este epitelio está expuesto continuamente a fuerzas de choque como es el mismo parpadeo, por lo que las células epiteliales deben permanecer fuertemente adheridas unas a otras y a la estructura basal. Estas uniones son de oclusión, conocidas como zónula ocludens, de anclaje, llamadas zónula adherens y de comunicación o uniones gap y sinápticas.⁶

El citoesqueleto del citoplasma de estas células epiteliales corneales está compuesto por tres tipos de filamentos, que son filamentos de queratina o citoqueratinas, microtúbulos y

filamentos de actina. Las citoqueratinas proveen un marco estructural al citoplasma celular y forman también parte de los desmosomas, estructuras de adhesión intercelular y de los hemidesmosomas, estructuras de adhesión entre las células basales y la matriz extracelular. Los microtúbulos le proveen polaridad a las células epiteliales y los filamentos de actina son microaplicaciones densas de la superficie apical de las células planas como así también forma parte de las uniones adherentes.¹ Las células epiteliales también conviven con otras células, como neuronas, melanocitos, células de Langerhans y ocasionalmente leucocitos.

CÉLULAS COLUMNARES BASALES Y MEMBRANA BASAL

Las células basales son columnares en forma y están adheridas a la membrana basal. Se interdigitan entre ellas mediante uniones adherentes y desmosomas. Sus citoplasmas contienen gránulos de glicógeno, entre otras cosas, como fuente de energía frente al estrés metabólico, por ejemplo la cicatrización tisular. Estas células secretan la mayoría de los componentes de la lámina basal, quien cumple con dos funciones principales: actuar como sustrato en la organización de las células epiteliales y separar el epitelio del estroma. Ante la ausencia de esta lámina, las células basales penetran la membrana de Bowman y el estroma superficial.

En corneas lesionadas la lámina basal evidencia colágeno tipo IV, así como también fibronectina y laminina. Estas sustancias forman un complejo que sirve como sustrato del epitelio regenerativo. Luego de una queratectomía superficial, donde la lamina basal y las lamelas anterior del estroma son removidas junto con el epitelio, la fibronectina es depositadas inicialmente por las lagrimas y luego sintetizada por los propios queratocitos de la cornea. El agregado exógeno de laminina no acelera la reepitelización, pero el agregado de fibronectina ha demostrado ser útil en esta cicatrización epitelial.

CÉLULAS ALADAS POLIGONALES

A medida que las células basales se van dividiendo, estas dan origen a las células intermedias del epitelio que migran anteriormente para formar dos o tres capas de células aladas poligonales. Éstas se interdigitan fuertemente mediante abundantes desmosomas permitiendo un escaso pasaje de fluido intercelular. Cuando existen defectos de la cornea como erosiones epiteliales recurrentes o alteraciones del epitelio, el liquido que esta cornea enferma no puede frenar entra y se deposita entre las uniones firmes de esta capa de células, dando el aspecto característico de una cornea edematosa y difractando la luz con la consecuente visión borrosa de halos que padecen estos pacientes con edema epitelial.

CÉLULAS PLANAS

Estas células que migran desde la base del epitelio hasta la superficie sufren cambios morfológicos considerables. Poseen características únicas para mantener el film lagrimal, poseyendo un alto peso molecular y glicoproteínas fuertemente glicosiladas que forman las microvellosidades apicales para mantener la capa mucinosa del film adherido a su superficie, y por lo tanto estabilizando el film precorneal. Estas células poseen fuertes uniones entre ellas que mantienen un equilibrio en el pasaje de líquido, electrolitos y solutos hacia las capas posteriores y lograr así que el estroma permanezca deshidratado.

FUNCIONES

El epitelio corneal tiene 3 funciones principales:

1. Actuar como una barrera mecánica a cuerpos extraños y microorganismos y, vía células de Langerhans, como una posta de defensa inmunológica.
2. Crear una superficie óptica lisa y transparente.
3. Mantenerse como barrera de difusión frente al agua, solutos y drogas.

CICATRIZACIÓN DEL EPITELIO CORNEAL

El trauma epitelial que no lesiona la lámina basal es reparado por migración hacia el fondo del sitio de injuria de las células epiteliales basales y aladas adyacentes. Una vez migradas al sitio de injuria, estas células comienzan a proliferar (mitosis) y estratificarse con síntesis excesiva de queratinas y uniones celulares.

Si la lámina basal es removida durante el evento traumático, las células epiteliales deben migrar alrededor y dentro del área de la herida, donde comienzan a apilarse. Clínicamente esto es observado como un engrosamiento del borde de la herida. Estas células, para rodear el defecto, deben migrar, cubrir la herida y comenzar a estratificarse para luego regenerar las estructuras de anclaje y unión intercelular. Este extenso camino de cicatrización requiere de una resíntesis de las proteínas involucradas. Durante largos períodos de cicatrización, la lámina basal puede presentar soluciones de continuidad y/o reduplicaciones. Habitualmente, después de este tipo de lesión, se deben aguardar meses para poder observar una correcta adhesión del epitelio restablecido.⁷

LIMBO CORNEAL Y STEM CELLS

El limbo clínicamente es una zona semitransparente transicional de 1 a 2 mm de ancho y 1 mm de profundidad que se encuentra entre la cornea y la esclera en los 360 grados de la cornea. En la superficie marca la transición entre el epitelio conjuntival y el corneal (Figura 1). El limbo se diferencia de la cornea en que tiene solo dos capas: un epitelio y un estroma por debajo y en que es rico en vasos sanguíneos y linfáticos. Histológicamente, el limbo se define como una zona con límite anterior en el final de la membrana de Bowman y un límite posterior en el estroma en un arco cóncavo adyacente cercano a la membrana de Descemet, finalizando en la parte anterior del trabeculado del ángulo iridocorneal. El patólogo lo define como una zona que va desde una línea perpendicular que une la membrana de Bowman con la de Descemet a otra línea perpendicular, 1,5mm de la primera, que pasa a través del espolón escleral. Por lo tanto, el limbo está compuesto por tejido proveniente del epitelio y estroma conjuntival, de la cápsula de Tenon, de la epiesclera y del estroma corneoescleral.⁸

La superficie del limbo está marcada por pliegues radiales, conocidos como palizadas de Vogt, que se encuentran entre los vasos sanguíneos y linfáticos (Figura 2). Estas palizadas tienen un largo de 2 a 4 mm y un ancho de 0,5mm y se pueden contabilizar 36 por cuadrante limbar y proveen un microambiente ideal para la sobrevivencia de las SC.⁹ Se piensa que estas células son capaces de mantener su población a partir de una combinación de características inherentes a ellas y el microambiente que le brinda el propio limbo corneal.¹⁰

Las SC son capaces de lograr su auto renovación ilimitada a través de su propia división que da lugar a dos células hijas: una nueva SC y una célula de amplificación transitoria (CAT), con una capacidad, esta última, de renovación limitada.¹¹ Por lo tanto se postula que luego de la división asimétrica de las SC, una célula hija vuelve al nicho en las palizadas de Vogt y la otra CAT entra en un ciclo de diferenciación terminal o división finita, donde luego de varias repeticiones mitóticas pierde esta capacidad proliferativa y se convierte en lo que se llama célula postmitótica (CPM). En última instancia, estas CPMs terminan diferenciándose en células epiteliales de la córnea.¹²

Las SC deben tener una vida prolongada, equivalente a la vida del huésped en el que se hallen; deben tener un potencial de división libre de errores, ya que cualquier error genético en cualquier nivel de su división pasaría indefectiblemente y permanentemente a su progenie, deben ser de ciclo lento, reflejando una actividad mitótica baja; deben tener una segregación de su ADN asimétrica durante la mitosis, de forma tal que mantengan su mensaje genético original

y pasen una nueva copia a las TACs; y por ultimo poseer un citoplasma primitivo con pocos o algunos productos diferenciados¹³ (Tabla 1).

| PROPIEDADES DE LAS SC |
|--|
| Vida prolongada |
| Potencial de división libre de errores |
| Ciclo lento de división |
| Segregación asimétrica de su ADN |
| Citoplasma primitivo |

Tabla 1 Propiedades de las stem cells del limbo esclero corneal

Si bien las SC se dividen relativamente infrecuente en tejidos maduros no traumáticos, frente a una situación traumática o en condiciones de cultivo *in vitro* éstas tienen un gran potencial de proliferación¹⁴ con una alta tasa de división.¹⁵

DÉFICIT DE STEM CELLS LIMBARES DE CÓRNEA (DSCL)

DEFINICIÓN

Distintas enfermedades o mecanismos destructores del limbo producen consecuentemente situaciones muy poco favorables de la superficie ocular que determinan que el paciente presente baja visión o incluso ceguera.

Las enfermedades de las SC de la córnea son un problema mayor en oftalmología y muchos investigadores han estado trabajando en el desarrollo del tratamiento ideal de esta situación.^{16 17 18 19 20 21 22 23}

El DSCL se caracteriza por defectos epiteliales persistentes (DEP), irregularidades del epitelio, úlceras múltiples y con frecuencia abscesos infecciosos o no; que en última instancia permiten que la conjuntiva invada la superficie corneal deficitaria, provocando así la conjuntivalización de la misma. Esto provoca una reepitelización errática con un epitelio símil corneal. Finalmente se produce la entrada de tejido fibrovascular (vascularización corneal) provocando la ceguera del paciente por causas corneales.²⁴

Clínicamente los pacientes con DSCL presentan un ojo irritable, hiperémico, con disminución de su agudeza visual, fotofobia, lagrimeo y frecuentemente padecen de episodios de gran dolor secundarios a las erosiones corneales recurrentes. Oftalmológicamente se observa un epitelio irregular y opaco con áreas de neovascularización (Figura 3).

Técnicas de impresión citológica revelan la presencia de células caliciformes de la conjuntiva (Figura 4). Estudios de inmunohistoquímica demuestran la ausencia de diferenciación del epitelio corneal a través de la ausencia de citoqueratina 3 así como la presencia de mucina de las células caliciformes.²⁵

El tratamiento de esta entidad es un desafío para la oftalmología contemporánea.^{26 27} El manejo es muy dificultoso, ya que no basta con tratar la enfermedad de base, muchas veces imposible, ni tampoco con reemplazar el tejido dañado; porque al no haber un limbo suficientemente sano como para mantener la salud de injerto corneal implantado, en un plazo no muy largo de tiempo la superficie ocular vuelve a estar opaca y conjuntivalizada.

ETIOLOGÍA

El DSCL puede ser causado por distintas entidades, tanto corneales como sistémicas, que lesionan de forma aguda o en el tiempo la superficie ocular, especialmente el limbo esclero corneal. Estas entidades pueden ser hereditarias como son la aniridia, la queratitis asociada con deficiencias endócrinas múltiples o la eritroqueratodermia congénita. También el DSCL es secundario a enfermedades adquiridas difusas como el daño químico o térmico de la cornea, el síndrome de Stevens Johnson o el uso crónico de lentes de contacto o enfermedades adquiridas focales como el pterigion, el uso de diferentes antimetabolitos, como el 5 F-Uracilo o la Mitomicina C o múltiples cirugías oculares que depreciaran la cornea de SC.

Entre las causas de mayor frecuencia de DSCL se encuentran las quemaduras químicas de la cornea, especialmente las alcalinas, el síndrome de Steven-Johnson y el pterigion gigante. A pesar de los grandes esfuerzos realizados para mejorar el pronóstico del DSCL, el final común en todas estas entidades es un resultado insatisfactorio.

El daño de la cornea por quemaduras químicas puede variar de moderado a severo, requiriendo en los profesionales un rápido diagnóstico del nivel de injuria y una correcta instauración de los pasos a seguir con el objetivo de minimizar la pérdida de la función visual. Las quemaduras oculares alcalinas son consideradas uno de los accidentes de trabajo más devastadores ya que las sustancias alcalinas penetran rápidamente las membranas celulares y logran entrar en cuestión de minutos en el interior del globo ocular, donde mantienen su actividad destructora.^{28 29} Estas lesiones tienen gran impacto socio económico debido al alto costo de los tratamientos y a la invalidez visual que suele quedar como consecuencia de esta patología (Figura 5).

PREVALENCIA

El número de personas con ceguera corneal en el mundo no es menor.^{30 31 32} Se estima que 1.500.000 de personas desarrollan neovascularización corneal anualmente en los Estados Unidos de Norteamérica por DSCL, lo que conlleva a la opacificación corneal y la ceguera legal, con todo el impacto socio económico que esto implica.³³

CLASIFICACIÓN

El DSCL ha tenido diversas clasificaciones en base a su origen, daño de estructuras y probable pronóstico a largo plazo. Nosotros basamos nuestros estudios en la clasificación propuesta por Bagley et al,³⁴ quien utiliza criterios clínicos de injuria y propone un pronóstico visual a largo plazo en seres humanos; subrayando que no necesariamente toda lesión alcalina de la cornea provocará consecuencias fatales en la visión, sin embargo, lesiones de mediana y gran envergadura predisponen a la pérdida de visión definitiva tomando en cuenta las terapias oftalmológicas actuales.

Su explicación se encuentra detallada en la Tabla 2.

| CRITERIOS CLÍNICOS A UTILIZAR EN LA ESTADIFICACIÓN DE LESIONES CORNEALES POR ÁLCALIS | | | | | |
|--|--|----------------------------|--|--|--|
| PARÁMETROS\GRADOS | GRADO 0 | GRADO I | GRADO II | GRADO III | GRADO IV |
| ISQUEMIA LIMBAR (CIRCUNFERENCIA AFECTADA, %) | Sin isquemia | <25% | 25-50% | 50-75% | 75-100% |
| EPITELIO CORNEAL | Normal | <33% pérdida geográfica | >33%-100% de pérdida | Ausente | |
| ESTROMA CORNEAL | Detalles del iris claramente visibles | | Opacidad causa borramiento de los detalles del iris | Opacidad solo permite discernir la pupila | Opacidad total: pupila no visible |
| PROFUNDIDAD DEL DAÑO CORNEAL | Totalidad del epitelio | | Epitelio y <1/3 estroma anterior | Epitelio y estroma | Toda la cornea |
| PRONÓSTICO | Sin consecuencias | Recuperación total | Recuperación con DSCL parcial | Pérdida de visión permanente | Pérdida del globo ocular |

Tabla 2 **Criterios clínicos a utilizar en la clasificación de lesiones corneales por álcalis.** Estadificación clínica y pronóstico de corneas humanas lesionadas por soda cáustica descrita por Bagley et al.

CULTIVO CELULAR DE STEM CELLS DE CORNEA

A partir del trabajo innovador de Graziella Pellegrini publicado en 1997,⁴³ las investigaciones sobre el tratamiento de DSCL con células epiteliales limbares cultivadas *ex vivo* han evolucionado en forma imperiosa. Las metodologías de cultivo utilizadas para el tratamiento clínico son muy variadas.

Mediante la técnica de explante se utilizan pequeñas biopsias de tejido limbar que usualmente se siembran sobre membrana amniótica, ya sea en forma directa o sobre una monocapa de fibroblastos murinos (células 3T3) irradiados. El primer pasaje usualmente es el que se utiliza para el trasplante y la propia membrana amniótica se utiliza como soporte durante aquél.

En el paso siguiente se requiere la digestión enzimática con tripsina para liberar y aislar las células epiteliales de la biopsia y así poder sembrarlas ya sea sobre membrana amniótica o sobre cultivos en monocapa de células 3T3 irradiadas. En este último caso, las colonias se vuelven a sembrar y cultivar hasta obtener láminas de células confluentes, las cuales posteriormente se desprenden utilizando para ello dispa y se colocan en un soporte que puede consistir en una gaza parafinada, lente de contacto, colágeno, fibrina u otros, para finalmente ser trasplantadas.

A pesar de que el uso de membrana amniótica se basa en la capacidad de la misma para permitir el cultivo de las células epiteliales limbares, esta capacidad está limitada a unos pocos pasajes, lo cual indica que las células stem necesitan ciertos factores para poder expandirse en cultivo. La utilización de monocapas de células 3T3 parecería ser más apropiado para mantener o preservar un cultivo de stem cells. Debido a que aún no se cuenta con inmunomarcadores específicos para las SC del limbo corneal, no es posible conocer el porcentaje de supervivencia de estas células después de ser trasplantadas y saber si ellas son las únicas encargadas de la regeneración epitelial. El hecho de que se hayan observado resultados clínicos similares utilizando diferentes técnicas de cultivo indica que es posible que otros factores tales como la repoblación por células remanentes en el nicho y/o por células provenientes de médula ósea intervengan en el proceso de re-epitelización.

SOPORTES CELULARES COMERCIALES VS AUTÓLOGOS

El uso de materiales de soporte para el cultivo, transporte y trasplante de las láminas de epitelio cultivado también ha tenido una revolución técnica muy importante en estos últimos años. Los materiales que habitualmente se utilizan son la membrana amniótica^{35 36 37} y adhesi-

vos tisulares comerciales.³⁸ La primera presenta beneficios potenciales en la adhesión, proliferación y diferenciación de las células epiteliales mientras que los segundos tienen una acción más directa sobre la interacción entre el epitelio implantado y las células estromales luego de la cirugía.³⁹

Los adhesivos tisulares como el Tissucol® han sido desarrollados en un primer momento solo para técnicas quirúrgicas, ya que promueven la hemostasia y la cicatrización tisular, pero recientemente también han sido utilizados en el cultivo celular. Son compuestos que concentran fibrinógeno humano más trombina bovina y calcio. Cuando se mezclan todos los componentes se logra una sustancia gelatinosa que imita los últimos estadios de la cascada de la coagulación formando un coagulo de fibrina. El problema es que al ser productos hemoderivados no propios del paciente, pueden ser capaces de transmitir distintas enfermedades relacionadas a su origen.

El PPP es una sustancia propia del paciente, y este es el concepto primordial: que es puramente autólogo. Al obtenerse del mismo paciente, el PPP no acarrea el riesgo de transmisión de patógenos, como los bioadhesivos comerciales. Sus propiedades biocompatibles y biodegradables previenen que induzca reacciones inmunológicas, necrosis tisular o fibrosis extensa. El PPP se activa con el uso de Ca_2Cl formando una sustancia coagulada sin propiedades adhesivas que rápidamente se absorbe una vez colocado en el sitio de injuria (estroma corneal) con la membrana cultivada en su superficie. Al no tener propiedades adhesivas, la lámina epitelial con PPP debe ser sujeta al estroma receptor con técnicas convencionales de sutura o con el uso de bioadhesivos.

Su uso en oftalmología varía entre distintos autores, siendo utilizado en muchos casos como suplemento del medio de cultivo, en reemplazo del suero bovino.⁴⁰ Nosotros hemos testado el uso del PPP en el desarrollo de una nueva técnica de cultivo y trasplante de epitelio limbar en cirugía experimental de córnea.^{41 57}

TRASPLANTE DE CÓRNEA

QUERATOPLASTIA LAMINAR CONVENCIONAL

La queratoplastia laminar (QL) consiste en el trasplante parcial de una cornea donante, sin el endotelio, la membrana de Descemet y el estroma profundo, sobre un lecho receptor que previamente fue disecado del estroma anterior y epitelio (Figura 6)

Las indicaciones clásicas de esta cirugía son la remoción de opacidades estromales anteriores o de irregularidades de la superficie corneal, la restauración de un contorno refractivo normal o el tratamiento del queratocono.

Comparada con la queratoplastia penetrante, la QL, aunque sea técnicamente más difícil, posee grandes ventajas. Con este procedimiento se minimizan la mayoría de las complicaciones típicas de una cirugía a cielo abierto, ya que al ser un procedimiento extraocular se evitan las alteraciones de la anatomía interna del ojo; se logra menor inflamación postoperatoria; las suturas pueden ser removidas antes y el riesgo de dehiscencia de la herida o rechazo del injerto es menor.

Los ojos con QL pueden padecer de algunas complicaciones, como una menor ganancia visual debido a errores refractivos como el astigmatismo irregular, producto de las suturas o del “haze”, debris atrapados o pseudo cámara en la interfase estroma – donante. También pueden resultar cicatrices residuales del estroma receptor.

TRASPLANTE DE NEOEPITELIO CORNEAL A PARTIR DE STEM CELLS AUTÓLOGAS

Debido a los avances de la ingeniería de tejidos y la terapia celular nuevas esperanzas han aparecido en el tratamiento de los pacientes lesionados con quemaduras por álcalis.²¹ El éxito del trasplante de SC corneales se basa en restituir al limbo dañado y con éste lograr una cornea clara o una mejor superficie corneal sin tejido conjuntival invasor. Esto permite, en una segunda instancia, el injerto penetrante de cornea, el llamado procedimiento de dos tiempos (two-steps procedure).⁴²

El uso de injertos autólogos de láminas de epitelio corneal en humanos fue primeramente descrito por Pellegrini *et al* en 1997⁴³ y a partir de ella una gran cantidad de protocolos en animales y en pacientes se han implementado utilizando esta nueva metodología.^{44 45 46 47 48 49 50 51} Una de las principales ventajas con respecto a lo que hasta el momento se realizaba con mayor éxito, injerto de limbo autólogo, ha sido lograr un menor grado de inflamación.⁵²

En la mayoría de los casos, las láminas epiteliales fueron cultivadas sobre membrana amniótica o sobre geles de fibrina comercial. Los reportes clínicos incluyen grupos de pacientes reducidos y muestran diferentes resultados.^{18 42 53 54 55} La mayor complicación reportada por estos trabajos es la entrada de vasos sanguíneos en la cornea, causando una reducción de la

transparencia asociada a una reducción o pérdida de la visión, que a largo plazo produce el fallo del injerto, es decir, del tratamiento.^{33 56}

Si bien un gran número de pacientes ha sido tratado con esta técnica innovadora y los resultados son mayoritariamente favorables, es aún necesario incorporar mayor cantidad de estudios animales y clínicos para establecer la eficacia del tratamiento de esta técnica en pacientes con DSCL.^{57 58 59 60}

Nosotros evaluamos la eficacia del implante autólogo de neopitelio corneal a partir de SC del limbo en recuperar la transparencia corneal en ojos de conejo severamente dañados con soluciones alcalinas, como lo es el hidróxido de sodio (NaOH).

TRASPLANTE DE NEOEPITELIO CORNEAL A PARTIR DE STEM CELLS HOMÓLOGAS

El DSCL es considerado una situación devastadora desencadenada por múltiples causas. Se presenta como defectos epiteliales persistentes (DEP) y recurrentes que determinan la irregularidad de la superficie corneal.⁶¹ Esto desencadena que la cornea sufra de múltiples procesos infecciosos e inflamación corneal crónica, situaciones promotoras de la opacidad y la neovascularización del tejido avascular corneal. Finalmente, y como signo más ingrato del DSCL, surge la conjuntivalización de la cornea; situación que se cree consecuencia de la incapacidad del epitelio corneal de regenerar eficazmente.

Cuando el DSCL se presenta en ambos ojos, la situación cobra aún un grado mayor de complejidad. Pacientes con esta condición, al igual que en la lesión unilateral, son pobres candidatos al trasplante de cornea convencional, ya que el reemplazo de la cornea central no restituye las células limbares.⁶² El injerto de limbo autólogo no siempre se puede realizar y el injerto de limbo homólogo acarrea múltiples complicaciones, como el rechazo del injerto. Más aún, a largo plazo la superficie corneal reconstituida suele estar plagada de DEP, inflamación y riesgos aumentados de infección. Este proceso promueve la inestabilidad corneal, causando un serio malestar y alta tasa de morbilidad en el paciente.⁶³

La situación en estos pacientes con déficit bilateral de SC es completamente diferente ya que al no haber alguna porción de limbo sano en alguno de los ojos no hay posibilidad de obtener células limbares para su posterior replicación.

Los avances en el cultivo celular del epitelio limbar han permitido el descubrimiento de nuevos tratamientos, incluso para estos pacientes con DSCL bilateral.⁶⁴

Las opciones posibles de brindar a personas con DSCL bilateral son el uso de células epiteliales limbares alogénicas o la utilización de una fuente sana de células epiteliales autólogas, por ejemplo de la mucosa bucal, que puedan imitar el crecimiento y propagación de las células limbares. Dentro de la primer opción se pueden utilizar tanto células de donantes vivos como de corneas cadavéricas.^{65 66}

El uso de materiales de soporte para el transporte y trasplante de las láminas de epitelio cultivado también ha tenido una revolución técnica muy importante en estos últimos años. Los materiales que habitualmente se utilizan son la membrana amniótica^{67 68 69} y el fibrin glue.⁷⁰ La primera presenta beneficios potenciales en la adhesión, proliferación y diferenciación de las células epiteliales mientras que el fibrin glue tiene una acción más directa sobre la interacción entre el epitelio implantado y las células estromales luego de la cirugía.⁷¹

Nuestro estudio intenta mostrar la utilidad de las láminas de epitelio corneal homólogo montadas sobre PPP autólogo y su implante en corneas de conejos con DSCL con un seguimiento postoperatorio de un año.

FOTOCOAGULACIÓN LASER EN NEOVASCULARIZACIÓN CORNEAL

La invasión de vasos sanguíneos en la cornea es un evento desafortunado; al ser ésta un tejido avascular, la presencia de neovasos perjudica en gran medida el buen funcionamiento y la transparencia que las distintas capas corneales logran en una situación de total salud (Figura 8). Se cree que esta neovascularización sería una de las vías principales por las cuales se produce el rechazo del injerto implantado.⁷² Se postula que si los neovasos son evitados o en última instancia eliminados se lograría la prevención del rechazo corneal (Figura 7).⁷³

Sumado al rechazo inmunológico, la neovascularización también produce queratopatía grasa por depósito, hemorragias intraestromal e incluso edema estromal secundario a la filtración de los vasos sanguíneos inmaduros.⁷³ El desarrollo de esta angiogénesis provoca un lecho receptor de alto riesgo de fracaso en el caso de ser necesaria una subsecuente queratoplastia.⁷⁴

El intento por erradicar esta neovascularización ha incursionado por distintas áreas. Se han estudiado tratamientos médicos, antiinflamatorios, fototerapéuticos, fotodinámicos e incluso terapia antiangiogénica.^{75 76}

El uso de la fotocoagulación con laser argón para el tratamiento de la neovascularización corneal ha sido descrito por varios autores.^{77 78} El regreso de los neovasos se logró en algunos casos;⁵⁶ sin embargo, esta técnica terapéutica aun no se ha utilizado en la neovascularización

corneal en un ojo implantado con láminas de neopitelio cultivado a partir de SC del limbo. No está demostrado si esta tecnica tiene el potencial de causar algún daño sobre las SC implantadas.

Nosotros evaluamos el potencial beneficio de la fotocoagulación con láser argón en el tratamiento de los neovasos secundarios a una cirugía de implante de neopitelio corneal a partir de SC autólogas.

BIOADHESIVOS

Uno de los principales desafíos en toda técnica quirúrgica es la correcta cicatrización, que conlleva a un menor proceso inflamatorio y por lo tanto mayor bienestar en nuestros pacientes. Es así como hoy en día la búsqueda del componente biológico cicatrizante ideal permanece en pie en toda área de investigación.

Los bioadhesivos son en su mayoría productos que concentran fibrina. La fibrina es la forma activada de la molécula plasmática llamada fibrinógeno. Una molécula fibrilar que se encuentra en forma masiva tanto en el plasma como en los gránulos plaquetarios α y que juega un rol determinante en la agregación plaquetaria durante la hemostasia.

El fibrinógeno es un componente soluble de la sangre que representa el 0,2% de la volemia de cada individuo. Ante la presencia de trombina se convierte en una red de fibrina insoluble (Figura 9) y esto es lo que sucede en la cascada intrínseca y extrínseca de la coagulación. El fibrinógeno contiene 3 pares de cadenas polipeptídicas agrupadas por enlaces disulfídicos formando una estructura dimérica simétrica.⁷⁹ El dominio central de la molécula contiene fibrinopéptidos A y B, unidades monoméricas de fibrina ensambladas por uniones no covalentes. En presencia del factor XIII de la cascada de la coagulación (Factor estabilizantes de la fibrina), la fibrina se transforma en una red entrecruzada estable. Esta red es lograda frente a una concentración de Ca_2Cl de entre 5 y 20 mM.⁸⁰ La composición de las soluciones utilizadas para polimerizar la fibrina y el grado de degradación influyen directamente el grado de cicatrización. Este grado de cicatrización ha sido reportado solo como importante en los primeros días luego de un trauma, durante las fases de proliferación y granulación tisular.⁸¹ La lisis de esta red de fibrina (coágulo) luego de la activación del plasminógeno es retrasada agregando concentraciones adicionales del factor XIII.⁸² Esto es especialmente útil en lugares donde las enzimas fibrinolíticas están presentes en altas concentraciones, como órganos

parenquimatosos o vasos sanguíneos. El retraso en esta lisis de fibrina también puede ser obtenido con la adición de factores como la aptotina.

En otras palabras, los bioadhesivos corresponden a un mecanismo biológico natural que es la polimerización de la fibrina durante la hemostasia, amplificada, en estos compuestos, artificialmente.⁸³

Este tipo de bioadhesivos pueden ser utilizados para controlar el sangrado luego de una herida traumática o quirúrgica, adherir tejidos entre sí o promover la cicatrización. Los bioadhesivos son obtenidos a partir del propio paciente (autólogos) o a partir de donantes de la misma especie (homólogos) o de razas distintas (heterólogos). El producto verdaderamente autólogo se llama plasma rico en plaquetas (PRP) que se prepara a partir de la sangre de cada paciente y consta de una concentración de los factores pro coagulantes y cicatrizantes propios del humano, incluyendo en gran medida al fibrinógeno. Los bioadhesivos comerciales, en su mayoría llamados glue de fibrina o fibrin glue (FG), combinan fibrinógeno comercial humano concentrado más trombina comercial humana (fibrin glue homólogo) o bovina (fibrin glue heterólogos).

Las aplicaciones quirúrgicas de cada uno de estos productos son múltiples y son utilizados por una gran parte de las especialidades quirúrgicas de nuestra medicina, principalmente por su control sobre el sangrado del lecho quirúrgico y el permitir la unión de los bordes de una herida. Esto logrado a partir de las propiedades mecánicas del adhesivo como de las propiedades biológicas pro cicatrizantes de la fibrina.⁸⁴

Sin embargo, los bioadhesivos comerciales son aún criticados debido a que son productos hemoderivados no propios de cada paciente y lo que esto implica. Producidos por industrias farmacéuticas, son lábiles de contaminaciones virales, como es la posibilidad de transmitir el virus de la Hepatitis C. Por esto muchos adhesivos comerciales fueron prohibidos en Estados Unidos de América desde 1978. Y es a causa de esta posibilidad de infección que consecuentemente hubo tantos intentos por lograr bioadhesivos autólogos, que a pesar de no concentrar tasas altas de fibrinógeno como los industriales, logren de todas formas las propiedades de estos.

A pesar de que estos bioadhesivos se utilizan desde hace más de 30 años en una vasta variedad de protocolos relacionados con la cicatrización tisular,^{85 86} aún son controversiales sus resultados, ya sea por la metodología utilizada en su producción (bioadhesivos autólogos) o el riesgo de infección cruzada (bioadhesivos comerciales).⁸⁷

BIOADHESIVOS NO AUTÓLOGOS. FIBRIN GLUE

El FG puede ser preparado a partir de un pool de sangre donante. Su purificación incluye la desactivación viral mediante el tratamiento con solventes y detergentes o con calor seco.⁸⁸ El fibrinógeno es aislado de la sangre entera utilizando centrifugaciones distintas en combinación con crioprecipitación, etanol, sulfato de amoníaco o precipitación por poli etilenglicol. Concentraciones resolubilizadas de este fibrinógeno son combinadas con trombina y así se obtiene el FG, capaz de adherir tejidos en distintas fases de un procedimiento quirúrgico.^{83 89}

El modo operativo de este adhesivo de fibrina reproduce las últimas etapas de la cascada de la coagulación, durante el cual el fibrinógeno es transformado en fibrina en presencia de trombina, factor XIII, fibronectina e iones de calcio.⁸⁶ Un ejemplo perfecto es el kit de Tiseel de Baxter Healthcare, que consiste en:

1. Fibrinógeno humano liofilizado concentrado, asociado a fibronectina y factor XIII
2. Una solución de aprotinina como agente antifibrinolítico
3. Un concentrado de trombina bovina
4. Una solución de cloruro de calcio

El fibrinógeno es entonces mezclado con la aprotinina y forma así una solución "A" a temperatura ambiente. La solución "B" se logra mezclando la trombina con el cloruro de calcio. Luego se unen ambas soluciones en una misma jeringa en el momento de su utilización en el lecho quirúrgico.

Desde una perspectiva de propiedades mecánicas, las incisiones en piel tratadas con FG adquieren su máxima fuerza ténsil luego de dos días de su aplicación, y esta fuerza es a su vez un 75% mayor a la encontrada en heridas no tratadas.⁹⁰ En tiempos más prolongados, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. El cierre de la herida fue Incluso reforzado por el FG en presencia de infecciones bacterianas.⁹¹

BIOADHESIVOS AUTÓLOGOS. PLASMA RICO EN PLAQUETAS

Tayapongsak et al describieron su bioadhesivo autólogo en 1994.⁹² Ellos fueron capaces de mantener fragmentos óseos implantados en la región mandibular. El bioadhesivo fue logrado a través de la concentración de plaquetas a partir de la sangre del propio paciente obtenida 1-3 semanas antes de la intervención quirúrgica y utilizando 2 días para su preparación. Sus esfuerzos en este desarrollo terapéutico reactivaron tecnologías quiescentes y ampliaron el

campo de investigación tecnológica: el uso de concentrados de plaquetas como bioadhesivo de fibrina autólogo basado en el concepto de terapia celular por sus factores de crecimiento.⁹³

El PRP es un producto bioadhesivo puramente autólogo que concentra gran cantidad de plaquetas en un volumen reducido de plasma.⁹⁴ Esta sustancia imita la última etapa de la cascada de la coagulación, con la consiguiente formación del botón de fibrina, que rápidamente se consolida y se adhiere en la zona donde fue aplicado. Con propiedades hemostáticas y cicatrizantes demostrables, el PRP es capaz de adherir tejidos o materiales entre sí en la posición en la que fueron colocados.⁹⁵ Sus propiedades biocompatibles y biodegradables permiten que el PRP no induzca reacciones tipo cuerpo extraño, necrosis tisular o fibrosis extensa.⁹⁶ La absorción del coágulo de fibrina se logra en las primeras semanas de cicatrización luego de la aplicación y es naturalmente degradado en 2 a 3 semanas posteriores a su activación.^{97 98 99}

A pesar de que el PRP parezca un gel de fibrina autólogo con propiedades cicatrizantes, el PRP hoy es realmente un nuevo concepto comparado al descrito por Tayapongsak et al.^{100 101 102 103} Todos los datos clínicos obtenidos desde su primera utilización revelan que este biomaterial sería una matriz favorable que permitiría la correcta cicatrización sin exceso de inflamación.^{104 105}

Su utilización se basa en el tratamiento de una herida con un coagulo de fibrina formado por una gran cantidad de plaquetas y todas las citoquinas que estas liberan. Estas citoquinas constituyen el pilar fundamental en la incorporación de este biomaterial en nuestra terapéutica médica, ya que su liberación, por parte de las plaquetas concentradas en un pequeño volumen, es la clave real de la mediación tanto de la inflamación como de la cicatrización.¹⁰⁶

Las plaquetas, estructuras discoideas y sin núcleo con una vida media que ronda los 10 días, son formadas en la médula ósea por los megacariocitos. En su citoplasma contienen varios gránulos, cuyo contenido es secretado en el momento de su activación. Los gránulos α contienen varias proteínas específicas de las plaquetas, como la β tromboglobulina y proteínas no específicas, como la fibronectina, trombospondina, fibrinógeno, factores de crecimiento, inhibidores de la fibrinólisis, inmunoglobulinas, etc. Los gránulos densos contienen calcio y serotonina entre otras sustancias. La activación de estas células es fundamental para iniciar y mantener la hemostasia mediante la agregación plaquetaria en el sitio de injuria y la interacción con los mecanismos de coagulación. Más aún, la degranulación también implica la liberación de citoquinas capaces de estimular la migración y proliferación celular dentro de la matriz de fibrina, iniciando así los primeros pasos de la cicatrización.

El PRP contiene todos los componentes plasmáticos que contribuyen a la cicatrización tisular.¹⁰⁷ Estas citoquinas plaquetarias son:

- 1) **El TGFβ-1 (Factor de crecimiento transformante β-1 o Agente de fibrosis):** forma parte de la súper familia “factor de crecimiento transformante β” con más de 30 miembros. Particularmente la isoforma β-1 es la que se produce en forma masiva, tanto en los gránulos α de las plaquetas como a través del diálogo intercelular.¹⁰⁸ In vitro, sus efectos son extremadamente variados de acuerdo a la cantidad aplicada, el medio en el que se encuentra y el tipo celular. Es capaz de estimular la proliferación de osteoblastos así como de inhibirlos.¹⁰⁹ De todas formas esta molécula es el agente fibrótico más potente entre todas las citoquinas, capaz de producir una síntesis masiva de colágeno y fibronectina, tanto por los osteoblastos como por los fibroblastos. Es por esto que el TGFβ-1 es considerado un regulador de la inflamación a través de su capacidad de inducir cicatrización fibrótica.
- 2) **Los PDGFs (Factores de crecimiento derivado de plaquetas o Estimulante del linaje mesenquimatoso):** son reguladores esenciales de la migración, proliferación y sobrevivencia de los linajes celulares mesenquimatosos.^{110 111} Cumplen un rol fundamental en el desarrollo embrionario y en la remodelación tisular. Por esta razón los PDGFs juegan un papel crítico en los mecanismos fisiológicos de cicatrización, así como también en la patogénesis de aterosclerosis y otras enfermedades proliferativas, como distintas neoplasias y fibrosis pulmonar.¹¹²
- 3) **IGFs (factores de crecimiento insulina símil o Agentes celulares protectores):** los IGFs I y II son reguladores positivos de la proliferación y diferenciación de casi todas las estirpes celulares, incluyendo células tumorales.¹¹³ A pesar de que estas citoquinas actúan como mediadores de multiplicación celular, en su mayoría constituyen el mayor eje de regulación de la muerte celular programada (apoptosis), induciendo señales de protección celular frente a estímulos de apoptosis.¹¹⁴
- 4) **EL VEGF (Factor de Crecimiento Vascular Endotelial):** es una proteína señalizadora implicada en la vasculogénesis y en la angiogénesis así como en la inflamación. Tiene efectos sobre el endotelio vascular y otros tipos celulares, estimulando la migración de monocito/macrófagos, neuronas, células epiteliales renales y células tumorales. In vitro, se ha demostrado que el VEGF estimula la división y la migración de células endoteliales. El VEGF también es un vasodilatador e incrementa la permeabilidad vascular.¹¹⁵ Está involucrado en el mecanismo de varias enfermedades oculares.

- 5) **Fibronectina:** Las moléculas de fibronectina se organizan en fibrillas en la superficie de ciertas células. Ello es debido a que para su formación son necesaria proteínas complementarias, como las integrinas. En los fibroblastos, las fibrillas de fibronectina se asocian con las integrinas en regiones de la membrana denominadas adhesiones fibrilares y éstas suelen alinearse con las fibras de estrés adyacentes. Los filamentos de actina intracelulares son los que estimulan el ensamblaje y orientación de las moléculas de fibronectina. El resultado es el estiramiento de la fibrillas que provoca la exposición de un lugar de unión críptico (no accesible) mediante el cual las moléculas de fibronectina pueden unirse directamente unas a otras. De esta forma el citoesqueleto de actina estimula la polimerización de la fibronectina y el ensamblaje de la matriz. Las señales extracelulares pueden regular este ensamblaje alterando el citoesqueleto de actina, modificando así la fuerza de tracción de las fibrillas. La fibronectina juega un papel importante en la adhesión de las células a la matriz.
- 6) **La fibrina:** es el último eslabón en la cascada de la coagulación. Proteína que por su estructura en forma de malla favorece el depósito y distribución de las plaquetas a través de la herida y la adecuada liberación de su contenido.
- 7) **Factores de crecimiento epiteliales:** estos factores epiteliotróficos se creería que promueven la epiteliogénesis.¹¹⁶

También la matriz lograda por el PRP contiene distintos glicosaminoglicanos (heparina, ácido hialurónico) que se incorporan a los polímeros de fibrina. Los glicosaminoglicanos tienen una gran afinidad con los péptidos circulantes, como las citoquinas plaquetarias y una gran capacidad de mantener la migración celular y el proceso de cicatrización.¹¹⁷

Debido a su fácil manipulación, el PRP puede ser utilizado en pequeñas áreas quirúrgicas. El PRP tiene una fuerza extraordinaria y una gran elasticidad y resistencia, es por esto que ha sido utilizado en zonas de gran impacto por distintas especialidades médicas. En los seres humanos, el PRP ha sido utilizado por varias especialidades, como en odontología,^{118 119 120} ortopedia y traumatología,¹²¹ cirugía maxilofacial,^{122 123} cirugía plástica,^{124 125} otorrinolaringología,¹²⁶ cirugía cardiovascular¹²⁷ y oftalmología.¹²⁸ Incluso, el PRP ha sido considerado como transportador de agentes biológicos activos^{129 130} y sustancias pro-cicatrizantes causando menor dolor postoperatorio.^{131 132} Recientemente fue publicado en revistas oftalmológicas el uso del PRP en el tratamiento del ojo seco¹³³ y en el tratamiento de úlceras corneales.¹³⁴

A pesar de que la preparación del PRP en humanos está estandarizada y debidamente establecida,¹³⁵ la preparación del mismo en conejos es un tanto más dificultosa debido al escaso volumen de sangre que se puede extraer del animal por su reducida volemia. Por lo tanto se debe extraer la menor cantidad de sangre que no sea letal para el animal, y obtener así una dosis eficaz de PRP. Los reportes en la literatura difieren sobre la intensidad y duración de la centrifugación de la muestra de sangre, así como también el número de plaquetas presente en el PRP y el uso de trombina bovina y eventualmente otros factores para activar el PRP.^{94 96 136} Los investigadores incluso no concuerdan con el sitio de extracción ni con el volumen de sangre a ser extraída en los conejos.^{136 137 138} Por último, los estudios publicados no cuentan con un estudio *in vivo* del testeo de la adhesividad del PRP en conejos, un animal de uso frecuente en cirugías de trasplante experimental.

Nosotros desarrollamos un método normatizado de preparación de PRP en conejos e identificamos los componentes cruciales del procedimiento. También testeamos la adhesividad del PRP en tejidos blandos realizando implantes laminares de cornea (queratoplastia laminar o llamada también no perforante).

BIOADHESIVO EN CIRUGÍA DE CÓRNEA

La queratoplastia laminar es un procedimiento ampliamente reconocido y mundialmente utilizado. La mayoría de los cirujanos están de acuerdo en que la sutura de la lámina corneal (el flap) implantada cumple un rol fundamental en la obtención del éxito terapéutico, ya sea logrando la correcta adaptación del implante sobre el tejido receptor, así como brindando bienestar postoperatorio, obteniendo una buena agudeza visual y evitando el rechazo del injerto.¹³⁹ Desde los primeros implantes hasta la actualidad se ha trabajado en descubrir el mejor tipo de sutura así como de técnica. Suturas bien colocadas minimizan las aberraciones refractivas y las reacciones inflamatorias, ya que las suturas son consideradas como un factor de riesgo importante en las erosiones epiteliales, queratitis inflamatorias o infecciosas, abscesos, errores refractivos y hasta el rechazo del injerto.¹⁴⁰

Las cirugías corneales sin el uso de suturas podrían brindarle al paciente ciertos beneficios, como un tiempo menor de cirugía, menor reacción inflamatoria y menor riesgo de neovascularización corneal e infecciones. Evitar las suturas podría prevenir la cicatrización asimétrica del implante, por lo tanto, resultaría en menores aberraciones refractivas postoperatorias. Estas son las razones por las cuales los adhesivos tisulares han estado en la mira en varios estudios experimentales desde los años 60'.¹⁴¹ Actualmente, se están comercializando varios adhesivos tisulares. Se han probado con múltiples propósitos, como el

tratamiento de úlceras corneales perforadas, sea cicatrizando la perforación¹⁴² o previniendo futuras infecciones.¹⁴³ Se han utilizado en cirugías de estrabismo con la intención de cerrar la conjuntiva,¹⁴⁴ o en cirugías de pterigion evitando las clásicas molestias postoperatorias de los múltiples puntos de sutura que se realizan en este procedimiento.¹⁴⁵ También se empleó el uso de bioadhesivos en las cirugías de trabeculectomía del glaucoma, con intención de cerrar debidamente la ampolla conjuntival y lograr un mayor bienestar en el paciente.¹⁴⁶ Muchos especialistas han utilizado también los adhesivos tisulares en el injerto de parches esclerales,¹⁴⁷ en el cierre de incisiones esclerales luego de una cirugía de extracción extra capsular de cataratas¹⁴⁸ o en la estabilización de heridas de queratotomía radial.¹⁴⁹ Incluso, estos adhesivos han sido utilizado como suturas biológicas en queratoplastias laminares en cornea.¹⁵⁰

Nosotros hemos evaluado el PRP como bioadhesivo en cirugías de queratoplastia laminar en conejos, evaluando la evolución clínico - inmunohistológica del flap corneal así como la interacción entre el PRP y el tejido corneal en estos animales.

OBJETIVOS

1. Evaluar la eficacia del implante de epitelio corneal autólogo obtenido a partir de stem cells limbares con el propósito de restaurar la transparencia corneal en corneas de conejo lesionadas con quemaduras por álcalis.
2. Demostrar la utilidad a largo plazo de los injertos autólogos y homólogos de células epiteliales de cornea a partir de células pluripotentes montadas sobre Plasma Pobre en Plaquetas (PPP).
3. Experimentar la eficacia de la fotocoagulación externa en el tratamiento de la neovascularización corneal posterior al trasplante de stem cells de cornea.
4. Determinar la presencia de células donantes en la cornea receptora de trasplante de epitelio corneal homólogo mediante el estudio cromosómico del implante.
5. Desarrollar un estudio pre-clínico autólogo en conejos utilizando la combinación de implantes laminares de cornea a partir stem cells limbares montados sobre PPP.
6. Obtener la experiencia y los conocimientos suficientes para desarrollar un ensayo clínico en pacientes argentinos utilizando la técnica de trasplante autólogo de stem cells limbares
7. Obtener una solución bioadhesiva autóloga compuesta por Plasma Rico en Plaquetas (PRP) en conejos.
8. Examinar la evolución clínica, histológica e inmuohistoquímica de la interacción entre el PRP y el tejido corneal en conejos.
9. Analizar la efectividad del PRP en la queratoplastia laminar (trasplante no perforante de cornea) en conejos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante todas las etapas de esta investigación mantuvimos los lineamientos institucionales y gubernamentales acerca del uso ético de animales de laboratorio así como también todos los animales fueron tratados de acuerdo a las normas y guías de “Usos y manejos de animales en investigación oftalmológica y de la visión” de la Association for Research in Vision & Ophthalmology (ARVO).¹⁵¹

TÉCNICAS GENERALES

A continuación se describen las técnicas generales utilizadas en cada modelo y protocolo.

SACRIFICIO DE LOS ANIMALES

Los animales fueron sacrificados bajo anestesia general utilizando una combinación intramuscular de 3mg/kg de midazolam (Roche, Basel, Suiza) y 100 mg/kg de ketamina (Fada, Buenos Aires, Argentina). Una vez anestesiado el animal, se le inyectó una solución intracardiaca de 15 meq de cloruro de potasio (Drawer, Buenos Aires, Argentina) logrando de forma instantánea el deceso del animal.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS PARA ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

El material a estudiar fue el globo ocular in toto. La enucleación del mismo se realizó en la primer hora post mortem del animal, liberando el ojo del tercio intracanalicular del nervio óptico y desbridando la inserción proximal de los 6 músculos extra oculares.

EL globo una vez enucleado se colocó en paraformaldehído al 10% durante una hora. Luego la totalidad de la cornea y del iris fueron extraídos mediante una tijera curva y un par de fórceps delicados. El material fue cortado en 3 porciones verticales del total del espesor. Una porción para el análisis histopatológico, otra para técnicas de inmunohistoquímica y la última se utilizó para microscopia electrónica (en algunos protocolos) o como reserva de material que fue guardada en un freezer de -80°C.

El procesamiento posterior de este material varió de acuerdo a las técnicas de análisis utilizadas.

ESTUDIOS DE MICROSCOPIA ÓPTICA

El tejido a estudiar se fijó en paraformaldehído al 4% durante 24 horas. Luego se deshidrató en pasajes por alcohol crecientes (80%, 90%, 100%) y acetato de butilo. Las muestras fueron incluidas en parafina y luego se realizaron cortes con espesor entre 5 y 7 μm que fueron montadas sobre un portaobjetos con carga positiva o sialinizados.

Previamente a la realización de las coloraciones y técnicas especiales de tinción, los cortes fueron desparafinizados con xilol y rehidratados con diluciones decrecientes de alcohol hasta llegar a agua 100%.

Todas las muestras procesadas para microscopía óptica fueron observadas y analizadas, y los hallazgos fueron documentados fotográficamente con un microscopio óptico Nikon Eclipse E800 (Nikon, Tokio, Japón).

TÉCNICA DE HEMATOXILINA Y EOSINA DE MAYER

SOLUCIONES

La solución de hematoxilina de Mayer se obtuvo disolviendo 1 gr de hematoxilina en 1 L de agua destilada hirviendo durante 15 minutos. Luego se agregó 0,2 gr de yodato de Na⁺ para su maduración y 50 gr de sulfato de aluminio, 1 gr de ácido cítrico y 50 gr de hidrato de cloral.

La solución de eosina/floxina fue obtenida a partir de 10 ml de eosina Y al 1%, 1ml de floxina al 1%, 78 ml de alcohol 95% y 0,4ml de ácido acético glacial.

COLORACIÓN

Las muestras se desparafinizaron e hidrataron y se sumergieron en solución de hematoxilina durante 20 minutos. Luego se lavaron en agua corriente durante 10 minutos para su diferenciación. Una vez coloreadas con hematoxilina, las muestras se sumergieron en la solución de eosina/floxina durante 1 minuto, se deshidrataron en alcohol 95%, después se pasaron por xilol y se cubrieron con bálsamo de Canadá y portaobjeto para su observación.

TÉCNICA DE PAS (PERIODIC ACID SCHIFF) DE MCMAMUS

SOLUCIONES

El reactivo de Schiff se obtuvo hirviendo durante 4 minutos 100 cm³ de agua destilada con 1 gr de fucsina básica. Se dejó enfriar a 60°C y se agregó 2 gr de bisulfito de Na⁺. Una vez enfriado a 20°C se agregó 20 cm³ de solución de HCl normal. La solución sulfurosa se compuso

de 6 ml de metabisulfito de Na al 10%, 5 ml de HCl normal y volumen necesario de agua destilada para un total de 100 ml.

COLORACIÓN

Las muestras luego de ser desparafinadas e hidratadas se sumergieron en una solución de ácido periódico al 0,5 % durante 10 minutos y luego del lavado en agua destilada se sumergieron en reactivo de Schiff durante 30 minutos, seguido de lavado en solución sulfurosa al 10% durante 2 minutos. Las muestras fueron coloreadas con solución de hematoxilina durante 5 minutos, lavadas en agua corriente, deshidratadas y montadas para su observación.

TRICRÓMICO DE MASSON

SOLUCIONES Y COLORACIÓN

Los cortes histológicos se postfijaron en solución de Bouin precalentada a 56°C – 60°C durante 1 hora seguido de lavados en agua destilada. Se coloreó con hematoxilina de la forma habitual y luego se sumergieron en solución de Ponceau (90 ml Biebrich Scarlet solución acuosa al 1%, 10 ml fucsina acida solución acuosa al 1% y 1 ml ácido acético glacial) durante 5 minutos seguido de lavado rápido en agua acetificada. Luego se diferenció en la solución de 200 ml de ácido fosfomolibdico (5 gr) – fosfotúngstico (5 gr) durante 15 minutos y finalmente en solución de azul de anilina (2,5 gr de azul de anilina, 2 ml de ácido acético glacial y 100 ml de agua destilada) durante otros 5 minutos. Se lavó rápidamente en ácido acético glacial al 1%, se deshidrataron y se montaron de la manera habitual para su observación microscópica.

ESTUDIOS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Un segmento de la cornea de cada animal fue fijado en glutaraldehído al 3,2%, pH 7,4 a 4°C durante 12 horas, lavados en solución buffer y postfijados en tetróxido de osmio 1%. Las muestras de 2 x 2 mm se deshidrataron e incluyeron en resina (Der Resin, Polysciences, Inc., Warrington, PA) mediante polimerización en estufa. Se realizaron cortes gruesos (1 µm) con cuchillas de vidrio que fueron coloreados con una solución de azul de toluidina 1% alcalina para determinar la orientación adecuada y el área a observar. Los cortes finos (60 µm) realizados con cuchilla de diamante se suspendieron en grillas de cobre (200 Mesh) y fueron coloreadas con soluciones de acetato de uranilo 1% y citrato de plomo 1% en atmósfera libre de CO₂ seguidas de lavado en agua destilada. Las grillas fueron examinadas utilizando un microscopio electrónico Zeiss EM-109 (Carl Zeiss, Overckochen, Alemania).¹⁵²

ESTUDIOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Un tercio corneal de cada animal se fijó en paraformaldehído al 4% durante una hora. Luego se comenzaron los pasajes por sacarosa, comenzando con sacarosa al 5% durante 12 horas y posteriores pasajes por sacarosa al 7,5%, 10% y 15% durante dos horas cada concentración llegando a concentraciones de sacarosa al 20% durante 12 horas. Luego el preparado fijado fue cortado en el criostato a -20°C en láminas de $14\mu\text{m}$. Se despilidizó en alcoholes crecientes hasta el xilol y luego se volvió a hidratar en alcohol 96° . Se inhibió la peroxidasa endógena con una mezcla de 200ml de alcohol 96° y 1ml H_2O_2 durante 20 minutos. Se bloquearon las uniones inespecíficas con suero normal diluido 1:30 en primer diluyente durante 30 minutos.

Se incubó con el anticuerpo primario de suero monoclonal de ratón contra el epítoto específico de cada protocolo durante 12 horas en cámara húmeda a 4°C . Se hicieron dos lavados en PBS. Se incubó con el anticuerpo secundario IgG biotilada de cabra anti ratón en una concentración 1:100 (Vector, CA, USA) durante una hora a temperatura ambiente. Se hicieron dos lavados de 5 minutos con PBS. Se incubó en el complejo Avidina-Biotina (Vectastain, Vector, CA, USA) diluido en segundo diluyente 1:100 durante 1 hora. Luego las muestras fueron reveladas con DAB enriquecido en Sulfato de Níquel Amonio. Se hicieron dos lavados en PBS y 0,1M acetato. Se deshidrató en alcoholes crecientes, aclarándolo en xilol y montándolo en bálsamo.

En todos los experimentos se incluyeron controles negativos, donde el anticuerpo primario fue reemplazando por diluyente.

ESTUDIOS DE INMUNOFLUORESCENCIA

Un tercio corneal de cada animal se fijo en paraformaldehído al 4% durante una hora. Luego se comenzaron los pasajes por sacarosa, comenzando con sacarosa al 5% durante 12 horas y posteriores pasajes por sacarosa al 7,5%, 10% y 15% durante dos horas cada concentración llegando a concentraciones de sacarosa al 20% durante 12 horas. Luego el preparado fijado fue cortado en el criostato a -20°C en láminas de $14\mu\text{m}$. Se despilidizó en alcoholes crecientes hasta el xilol y luego se volvió a hidratar en alcohol 96° .

Se incubó con el anticuerpo primario de suero monoclonal de ratón contra el epítoto específico de cada protocolo durante 12 horas en cámara húmeda a 4°C . Se hicieron dos lavados en PBS. Se incubó con el anticuerpo secundario IgG fluorescente de cabra anti ratón por una hora en una concentración 1:40 (Jackson Immune Research Laboratories, PA, USA) y luego las

muestras fueron lavadas y montadas en glicerol y PBS en una proporción de 3:1 conteniendo para-fenilenediamina.¹⁵³

En todos los experimentos se incluyeron controles negativos, donde el anticuerpo primario fue reemplazando por diluyente.

FOTOCOAGULACIÓN CON LASER ARGÓN

En casos de hallar signos de neovascularización se implementó la fotocoagulación con láser argón a través de un oftalmoscopio binocular indirecto Eye Lite, Ophthalas (Alcon, Texas, USA) y una lupa de 20 dioptrías. Los disparos fueron realizados sobre el origen de los neovasos en su porción conjuntival más cercana al limbo, logrando su oclusión. No se realizaron disparos sobre la cornea implantada. Se utilizó una intensidad de 550 mV y una exposición de 0,3 segundos y no se realizaron más de 150 disparos por sesión (Figura 14).

Las sesiones de fotocoagulación fueron repetidas en un lapso no menor a 3 semanas en caso de que nuevos neovasos aparecieran o la sesión anterior no haya ocluido la totalidad de los mismos.

DÉFICIT STEM CELLS LIMBARES (DSCL)

MODELO ANIMAL QUÍMICO DE DSCL

El DSCL secundario a una lesión química alcalina se logró utilizando una solución de 1 M NaOH sobre la superficie corneal de cada animal.

Se utilizaron conejos albinos neozelandeses de 2000gr de peso. Se anestesió al animal por vía general, regional y tópica con anestesia general utilizando una combinación intramuscular de 1mg/kg de midazolam (Roche, Basel, Suiza) y 70 mg/kg de ketamina (Fada, Buenos Aires, Argentina), anestesia subtenoniana de 1ml de lidocaína al 4% (Laboratorio Chile, Santiago de Chile, Chile) S.A y anestesia tópica de proparacaína 0,5% (Alcon, Buenos Aires, Argentina) cada 5 minutos durante 15 minutos.

Una vez dormido el animal se le colocó un blefaróstato pediátrico y luego se aplicó un papel de filtro millipore de 14mm de diámetro sobre toda la superficie corneal y parte de la conjuntiva bulbar. Se instilaron con un microgotero 0,33 ml de 1 M NaOH sobre el papel de filtro (Figura 15 A). A los 90 segundos se retiró el papel y se realizaron 5 lavajes con solución fisiológica sobre la superficie ocular (Figura 16 B).

Los animales fueron depositados en el bioterio y a los 60 días se evaluaron y registraron los signos clínicos de LSCD (Figura 15 C), momento en el cual fueron intervenidos quirúrgicamente según el protocolo al que pertenecieran.

Las heridas corneales por álcalis fueron registradas de acuerdo a la clasificación ILSI descrita por Bagley et al,³⁴ levemente modificada por nosotros.

MODELO ANIMAL MECÁNICO DE DSCL

El DSCL secundario a una lesión mecánica se realizó mediante la extirpación de los 360 grados del limbo y la totalidad del epitelio corneal.

Se utilizaron conejos albinos neozelandeses de 2000gr de peso. Se anestesió al animal por vía general, regional y tópica con anestesia general utilizando una combinación intramuscular de 1mg/kg de midazolam (Roche, Basel, Suiza) y 70 mg/kg de ketamina (Fada, Buenos Aires, Argentina), anestesia subtenoniana de 1ml de lidocaína al 4% (Laboratorio Chile, Santiago, Chile) y anestesia tópica de proparacaína 0,5% (Alcon, Buenos Aires, Argentina) cada 5 minutos durante 15 minutos.

Sobre el animal dormido, se colocó un blefaróstato pediátrico y bajo estrictas normas de asepsia de la conjuntiva y antisepsia del pelaje del animal con iodopovidona al 10% y 5% respectivamente, se realizó una periotomía de 360 grados. Luego se efectuó, con una pinza 0.12 y una hoja de bisturí Nro.15, una queratectomía laminar total que incluyó la totalidad del epitelio y tercio anterior del estroma extendiéndose hasta el limbo esclero corneal inclusive. Todo procedimiento quirúrgico se realizó bajo un microscopio quirúrgico ZEISS S5-Pro (Zeiss C, Overckochen, Alemania) (Figura 16 A-B).

El tejido extirpado fue fijado en paraformaldehído al 4% para su posterior corroboración y documentación del tejido faltante en el animal a tratar (Figura 17 C).

Sin retirar al animal del quirófano, se efectuaron los distintos tratamientos sobre el estroma denudado de acuerdo al protocolo que perteneciese.

PLASMA POBRE EN PLAQUETAS COMO SOPORTE CELULAR

Se utilizaron conejos albinos neozelandeses de 2000gr de peso. Se anestesió al animal por vía general con una combinación intramuscular de 1mg/kg de midazolam (Roche, Basel, Suiza) y 70 mg/kg de ketamina (Fada, Buenos Aires, Argentina).

Se obtuvo 1,5 ml de sangre periférica de cada animal que se colocó en un tubo con EDTA como anticoagulante y se realizó un hemograma completo. Si los resultados eran compatibles con un hemograma de conejo normal se procedía a extraer 20 ml de sangre intracardiaca de cada animal con 2,60 ml de ACD (Anticoagulante citrato-dextrosa). Esta muestra fue centrifugada durante 15 minutos a 1300 revoluciones por minuto (rpm) a 4°C. Así se separó el plasma y las plaquetas de los glóbulos rojos y blancos que fueron aspirados con una pipeta. Luego el plasma y las plaquetas fueron centrifugados durante 5 minutos a 4000 rpm, obteniendo así 7 ml de PPP en la parte superior del tubo y 3 ml de PRP en el fondo del mismo. El PPP fue congelado a -20°C por un tiempo máximo de 90 días para su posterior utilización (Figura 17).

TRASPLANTE AUTÓLOGO DE STEM CELLS DE CÓRNEA EN CONEJOS CON DSCL

GRUPO DE ESTUDIO

Se utilizaron 14 conejos albinos neozelandeses con un peso promedio de 3000gr. Todos los procedimientos invasivos fueron realizados bajo anestesia general, regional y tópica con anestesia intramuscular de 1mg/kg de midazolam (Roche, Basel, Suiza) y 70 mg/kg de ketamina (Fada, Buenos Aires, Argentina), anestesia subtenoniana de 1ml de lidocaína al 4% (Laboratorio Chile, Santiago, Chile) y anestesia tópica de proparacaína 0,5% (Alcon, Buenos Aires, Argentina) cada 5 minutos durante 15 minutos.

MODELO ANIMAL DE LESIÓN

Según el modelo previamente descrito, se lesionaron con 1 M NaOH las corneas izquierdas de cada animal utilizado en el protocolo.

BIOPSIA, CULTIVO Y EXPANSIÓN DE LAS CÉLULAS EPITELIALES LIMBARES DE CÓRNEA

Se tomó una pequeña biopsia de 1,8mm de diámetro de células epiteliales del limbo esclero corneal. La misma fue obtenida del cuadrante supero temporal del ojo sano contralateral. El procedimiento requirió inicialmente el desbridamiento de la conjuntiva con una pequeña periotomía de la zona y luego el lavaje con solución de NaCl con el fin de evitar la contaminación de la muestra por otras células. Luego se utilizó un trépano descartable 1.8 de diámetro que se colocó sobre el limbo temporal superior y se roto 360 grados horarios y con una pinza 0.12 y el dorso de una hoja bisturí Nro. 15 se debridó el mini flap de tejido corneal. Esta biopsia, con las stem cells, se colocó en un tubo Eppendorf con HAM F12 que contiene penicilina 100U/ml, estreptomycin 100µg/ml, anfotericina B 2,5µg/ml y gentamicina 20µg/ml y se mantuvo a temperatura ambiente.

Una vez entregada en el laboratorio a 50km del lugar de toma, la muestra fue lavada en 3 instancias con soluciones antibióticas y antimicóticas. Fue enzimáticamente procesada con tripsina para obtenerse así células aisladas. Las células epiteliales limbares fueron sembradas sobre una capa de fibroblastos de ratón 3T3 irradiados. El cultivo se hizo en un medio compuesto por una solución 3:1 de DMEN y HAM F12 suplementado con suero fetal bovino 10%, hidrocortisona 0,4µg/ml, transferrina 5µg/ml, insulina 5µg/ml, toxina Cholera A 10^{-10} M, adenina 1.8×10^{-4} M, tri-iodotironina 2×10^{-11} M, penicilina 100U/ml y estreptomycin 100µg/ml. Así las

células epiteliales sobre los fibroblastos en el medio de cultivo fueron colocados en una incubadora a 37°C y 5% CO₂ (Figura 18).

ENSAMBLADO DEL INJERTO

PPP autólogo o FG comercial (Tissucol®) fueron utilizados como soportes celulares. Estos se activaron, según la metodología descrita, en el fondo de las placas de cultivo circulares. Estas placas de 14mm de diámetro fueron hechas a medida según el diámetro corneal del animal con el fin de lograr una lámina de neopitelio de la misma circunferencia del lecho quirúrgico a cubrir.

Sobre los coágulos de PPP o Tissucol® se sembraron 4x10⁴ células epiteliales limbares de conejo por cm² montadas sobre la capa de fibroblastos irradiados y luego de 10 +/- 3 días se logró una monolamina. Para lograr su estratificación, se agregó al medio de cultivo Factor de Crecimiento Epitelial (EGF) en una concentración final de 10ng/ml 4 días antes de ser utilizada la lámina epitelial en la cirugía del conejo. En todos los casos, el medio de cultivo fue suplementado con 50000 KIU/ml de aprotinina con el fin de prevenir la fibrinólisis. En el momento de la cirugía, todas las láminas de neopitelio pudieron ser fácilmente removidas de las cámaras de cultivo utilizando un fórceps delicado (Figura 18).

TRASPLANTE DEL NEOPELILIO AUTÓLOGO Y TRATAMIENTO POST QUIRÚRGICO

Se anestesió al animal por vía general, regional y tópica según el procedimiento explicado anteriormente.

Una vez dormido el animal se le colocó un blefarostato pediátrico en el ojo previamente lesionado con álcalis. Se clasificó la herida corneal según la clasificación ILSI previamente descrita y se procedió al implante de neopitelio corneal. Para esto se realizó la asepsia de conjuntiva y antisepsia del pelaje del animal con iodopovidona al 10% y 5% respectivamente. Luego se realizó una periotomía de 360 grados y se extrajo la membrana nictitante o tercer párpado. Posteriormente, con una pinza 0.12 y una hoja de bisturí Nro.15, se realizó una queratectomía laminar anterior total que incluyó la totalidad del epitelio y tercio anterior del estroma. Se utilizó la técnica de peeling off descrita por Malbran.¹⁵⁴ Consiguientemente se extrajo el tejido corneal fibrovascular y el limbo esclero corneal.

Sobre el estroma desnudo se colocó la lámina de neopitelio autólogo corneal cultivado que fue suturada a la esclera utilizando 8 puntos interrumpidos con nylon 10-0. Los nudos fueron enterrados en el estroma receptor. Finalmente se realizó una tarsorrafia parcial de

los dos tercios anteriores de la abertura palpebral con puntos en "X" de seda 5-0. Hasta que el animal despertó se le colocó una mascarilla con O₂ al 21%. Todo procedimiento quirúrgico se realizó bajo un microscopio quirúrgico ZEISS S5-Pro (Zeiss C, Overckochen, Alemania).

El animal fue enviado al bioterio y los puntos de la tarsorrafia fueron retirados a los 3 días del POP). El tratamiento médico se constituyó en colirios de ciprofloxacina 0,3% y dexametasona 0,1% (Bausch & Lomb, Buenos Aires, Argentina) 5 veces al día por 2 semanas, prednisolona 0,1% (Allergan, TX. USA) 4 veces al día y ciclosporina 1% (Allergan, TX. USA) una vez al día por un mes.

La evaluación clínica se realizó periódicamente a los 3, 7, 15, 30, 60 y 90 días, 6 meses y 1 año del POP bajo el mismo microscopio quirúrgico. Todo lo observado fue fotográficamente documentado con una cámara Nikon Coolpix 5700 Digital Camera (Nikon, Tokio, Japón).

FOTOCOAGULACIÓN CON LASER ARGÓN

Se realizaron en promedio 5 sesiones (rango 1 a 8) de 100 a 150 disparos de fotocoagulación con láser argón en 7 de 14 conejos.

SACRIFICIO Y TOMA DE MATERIAL

Los animales fueron sacrificados en los días 30, 60, 90, 180 y 360 del POP.

ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

Un tercio de la cornea e iris fueron procesados mediante tinciones con H&E, PAS y Masson según las técnicas previamente descritas.

ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO

Se utilizaron anticuerpos monoclonales contra las citoqueratinas K3/12 (Mab AE5, Chemicon, CA, USA) y K19 (Mab 1675, Chemicon, CA, USA) para identificar la presencia de estas queratinas en el epitelio corneal. El mismo análisis se realizó en el ojo contralateral que no recibió tratamiento alguno (grupo control).

Las concentraciones fueron de 1:200 y 1:50 de anti K3/12 para el análisis por IHQ e IFI respectivamente y 1:600 Y 1:100 de anti K19 para el análisis por IHQ e IFI respectivamente

Se siguió la metodología según la técnica descrita previamente.

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE SOPORTES CELULARES COMERCIALES VS AUTÓLOGOS

Se estudiaron 20 láminas de neopitelio corneal a partir de SC limbares cultivado sobre dos soportes celulares: FG comercial (Tissucol[®]) o PPP autólogo. Estos se activaron, según la metodología descrita y se colocaron en el fondo de las placas de cultivo circulares. Sobre los coágulos de PPP o Tissucol[®] se sembraron 4×10^4 células epiteliales limbares de conejo por cm^2 montadas sobre la capa de fibroblastos irradiados y luego de 10 +/- 3 días se logró una monolamina. Para lograr su estratificación, se agregó al medio de cultivo Factor de Crecimiento Epitelial (EGF) en una concentración final de 10ng/ml 4 días antes de que la lámina epitelial sea retirada. En todos los casos, el medio de cultivo fue suplementado con 50000 KIU/ml de aprotinina con el fin de prevenir la fibrinólisis. Las láminas fueron estudiadas por métodos de observación directa así como por histopatología e inmunohistoquímica.

ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

Las laminas corneales fueron procesados mediante tinciones con H&E, PAS y Masson según las técnicas previamente descritas.

ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO

En todos las láminas se utilizaron anticuerpos monoclonales contra las citoqueratinas K3/12 (Mab AE5, Chemicon, CA, USA) y K19 (Mab 1675, Chemicon, CA, USA) para identificar la presencia de estas queratinas en el epitelio corneal. Las concentraciones fueron de 1:200 y 1:50 de anti K3/12 para el análisis por IHQ e IFI respectivamente y 1:15 Y 1:5 De anti K4 para el análisis por IHQ e IFI respectivamente.

Se siguió la metodología según la técnica descrita previamente.

TRASPLANTE HOMÓLOGO DE STEM CELLS DE CÓRNEA EN CONEJOS CON DSCL

GRUPOS DE ESTUDIO

Se utilizaron 31 conejos albinos Neozelandeses con un peso promedio de 3000gr. Diez animales machos actuaron como donantes de limbo corneal. El grupo de estudio se constituyó en 21 conejas hembras con DSCL mecánico. Quince de ellas recibieron un injerto de neopitelio homólogo y fueron evaluadas durante un año (grupo tratado), 3 no recibieron ningún implante y fueron seguidas durante 3 meses (grupo control 1), 3 recibieron un implante que sólo contenía PPP coagulado y fueron evaluadas durante un año (grupo control 2).

Todos los procedimientos invasivos fueron realizados bajo anestesia general, regional y tópica con anestesia intramuscular de 1mg/kg de midazolam (Roche, Basel, Suiza) y 70 mg/kg de ketamina (Fada, Buenos Aires, Argentina), anestesia subtenoniana de 1ml de lidocaína al 4% (Laboratorio Chile, Santiago de Chile, Chile) S.A y anestesia tópica de proparacaína 0,5% (Alcon, Buenos Aires, Argentina) cada 5 minutos durante 15 minutos.

SOPORTE CELULAR

Según la técnica descrita previamente se obtuvo PPP de 21 conejas hembras.

BIOPSIA, CULTIVO Y EXPANSIÓN CELULAR

Se tomó una pequeña biopsia de 1,8mm de diámetro de células epiteliales del limbo esclero corneal siguiendo la misma técnica descrita previamente.

Una vez que crecieron varias colonias, la feeder layer fue removida del disco de cultivo. Se re suspendieron las células de cada cultivo y fueron contabilizadas y sembradas nuevamente o crio preservadas en presencia de DMSO 10% y FCS 20% en una densidad aproximadamente de 10^6 células/ml.

ENSAMBLADO DEL INJERTO

Como soporte celular se utilizó PPP autólogo (extraído de la hembra con LSCD). Estos se activo con Ca_2Cl que inhibe el efecto anticoagulante del ACD. El PPP así coagulado se colocó en dos placas de cultivo circulares de de 14mm de diámetro. Aproximadamente 4×10^4 células epiteliales limbares por cm^2 de conejos macho se sembraron sobre una feeder layer de fibroblastos y previamente colocados sobre el PPP en las placas. Luego de 10 +/- 3 días se logró

una monolámina. Para lograr su estratificación, se agregó al medio de cultivo Factor de Crecimiento Epitelial (EGF) en una concentración final de 10ng/ml 4 días antes de ser utilizada la lámina epitelial en la cirugía del conejo. En todos los casos, el medio de cultivo fue suplementado con 50000 KIU (Kallikrein inhibitory units)/ml de aprotinina con el fin de prevenir la fibrinólisis. En el momento de la cirugía, todas las láminas de neopitelio estaban estratificadas y pudieron ser fácilmente removidas de las cámaras de cultivo utilizando un fórceps delicado.

La deshidratación de los implantes se evitó con la aplicación de gotas de hidroxipropilmetilcelulosa cada 5 minutos.

MODELO ANIMAL DE LESIÓN

El modelo de DSCL se realizó mediante una lesión mecánica con la extirpación de los 360 grados del limbo y la totalidad del epitelio corneal como previamente fue descrito.

TRASPLANTE DEL NEOEPITELIO HOMOLOGO Y MANEJO POST QUIRÚRGICO

Las 15 conejas hembras previamente lesionadas mecánicamente recibieron las láminas de neopitelio homologo sobre su estroma denudado. Estas láminas fueron suturadas con 8 puntos no continuos de nylon 10-0 a la esclera. Las láminas cubrieron la totalidad de la cornea y los márgenes limbares.

Los nudos fueron enterrados en el estroma receptor. Finalmente se realizó una tarsorrafia parcial de los dos tercios anteriores de la abertura palpebral con puntos en "X" de seda 5-0. Todo procedimiento quirúrgico se realizó bajo un microscopio quirúrgico ZEISS S5-Pro (Zeiss C, Overckochen, Alemania)

En animal fue enviado al bioterio y los puntos de la tarsorrafia fueron retirados a los 3 días post operatorios (POP). El tratamiento médico se constituyó en colirios de ciprofloxacina 0,3% y dexametasona 0,1% (Bausch & Lomb, Buenos Aires, Argentina) 5 veces al día por 2 semanas y prednisolona 0,1% (Allergan, TX. USA) 4 veces al día por 30 días.

El seguimiento clínico se realizó durante un año en forma periódica y mensual y los resultados clínicos fueron registrados con una cámara Nikon Coolpix 5700 Digital Camera (Nikon, Tokio, Japón).

SACRIFICIO Y TOMA DE MATERIAL

Cinco animales del grupo tratado y los 3 animales del grupo 1 fueron sacrificados a los 90 días del POP mientras que el resto de los animales tratados y el grupo control fue sacrificado al año del POP.

ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

Un tercio de la cornea e iris fueron procesados mediante tinciones con H&E, PAS y Mason según las técnicas previamente descritas.

ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO

En todos los animales se utilizaron anticuerpos monoclonales contra las citoqueratinas K3/12 (Mab AE5, Chemicon, CA, USA) y K19 (Mab 1675, Chemicon, CA, USA) para identificar al presencia de estas queratinas en el epitelio corneal. El mismo análisis se realizó en el ojo contralateral que no recibió tratamiento alguno (grupo control sano). Las concentraciones fueron de 1:200 y 1:50 de anti K3/12 para el análisis por IHQ e IFI respectivamente y 1:15 Y 1:5 de anti K4 para el análisis por IHQ e IFI respectivamente

Se siguió la metodología según la técnica descrita previamente.

ESTUDIO GENÉTICO

Se tomaron muestras de córnea en el 4to, 7mo y 12vo mes del POP en 2 animales en cada estadio.

Se utilizó un trépano de 1,8mm de diámetro, una hoja de bisturí Nro. 15 y una pinza delicada para extraer de cada animal una muestra de córnea periférica. Cada muestra fue enviada al laboratorio en donde, luego del procesamiento, se aislaron las células epiteliales y se expandieron hasta lograr la semiconfluencia obteniendo aproximadamente $3 \cdot 10^3$ céls/cm², suficiente para la realización de estudios citogenéticos clásicos. El resto de las células se criopreservaron.

Para obtener metafases se expusieron las células a 4,5 horas de colchicina, desprendimiento de la "feeder layer", shock hipotónico en KCl 0,075 M y fijación con solución compuesta por metanol:ácido acético (3:1).

Las metafases fueron cariotipadas utilizando el bandejo G. Estas bandas G fueron obtenidas con el uso de tinción de Wright según el siguiente procedimiento: los preparados se dejaron "envejecer" por dos semanas a temperatura ambiente y en oscuridad; luego de un pre-

tratamiento por 20 segundos con 2xSSC a 65°C se lavaron en agua destilada y fueron teñidos con solución de Wright:Buffer Sorensen (1:2) por 2,5 minutos. Finalmente fueron lavados rápidamente con abundante agua de la canilla y dejados en oscuridad hasta ser estudiados por microscopía. Cada metafase fue documentada a 1000X con un fotomicroscopio Olympus. Por cada coneja fueron examinadas un mínimo de 40 metafases.

ESTUDIO PRE CLÍNICO DE TRASPLANTE DE NEOEPITELIO CORNEAL A PARTIR DE STEM CELLS AUTÓLOGAS MONTADAS SOBRE PLASMA POBRE EN PLAQUETAS AUTÓLOGO EN CONEJOS CON DSCL

GRUPOS DE ESTUDIO

Se utilizaron 24 conejos albinos neozelandeses con un peso promedio de 3000gr en los cuales se realizó el DSCL químico con 1M NaOH según la metodología previamente descrita.

El grupo tratado fue de 16 animales que recibieron un implante de neoepitelio. El grupo control se constituyó de 8 conejos que recibieron solo una membrana de PPP suturada la esclera.

El seguimiento clínico fue durante 6 meses.

Todos los procedimientos invasivos fueron realizados bajo anestesia general, regional y tópica con anestesia intramuscular de 1mg/kg de midazolam (Roche, Basel, Suiza) y 70 mg/kg de ketamina (Fada, Buenos Aires, Argentina), anestesia subtenoniana de 1ml de lidocaína al 4% (Laboratorio Chile, Santiago de Chile, Chile) S.A y anestesia tópica de proparacaína 0,5% (Alcon, Buenos Aires, Argentina) cada 5 minutos durante 15 minutos.

SOPORTE CELULAR

Según la técnica descrita previamente se obtuvo PPP de los 24 animales que fue utilizado como soporte celular.

BIOPSIA, CULTIVO Y EXPANSIÓN CELULAR

Se tomó una pequeña biopsia de 1,8mm de diámetro de células epiteliales del limbo esclero corneal. La misma fue obtenida del cuarto superior temporal del ojo sano contralateral. Todo el procedimiento continuó según lo descrito anteriormente

ENSAMBLADO DEL INJERTO

Como soporte celular se utilizó PPP autólogo (extraído de la hembra con DSCL). Estos se activo con Ca_2Cl que inhibe el efecto anticoagulante del ACD. Se siguió el procedimiento descrito previamente.

La deshidratación de los implantes se evitó con la aplicación de gotas de hidroxipropilmetilcelulosa cada 5 minutos.

MODELO ANIMAL DE LESIÓN

Según el modelo previamente descrito, se lesionaron con 1 M NaOH las corneas izquierdas de cada animal utilizado en el protocolo.

TRASPLANTE DEL NEOEPITELIO AUTÓLOGO Y MANEJO POST QUIRÚRGICO

Los 15 conejos del grupo tratado previamente lesionados químicamente recibieron las láminas de neopitelio homólogo sobre su estroma desnudo. Estas láminas fueron suturadas con 8 puntos no continuos de nylon 10-0 a la esclera. Las láminas cubrieron la total de la cornea y los márgenes limbares.

Los nudos fueron enterrados en el estroma receptor. Finalmente se realizó una tarsorrafia parcial de los dos tercios anteriores de la abertura palpebral con puntos en "X" de seda 5-0. Todo procedimiento quirúrgico se realizó bajo un microscopio quirúrgico ZEISS S5-Pro (Zeiss C, Overkochen, Alemania)

En animal fue enviado al bioterio y los puntos de la tarsorrafia fueron retirados a los 3 días del POP. El tratamiento médico se constituyó en colirios de ciprofloxacina 0,3% y dexametasona 0,1% (Bausch & Lomb, Buenos Aires, Argentina) 5 veces al día por 2 semanas y prednisona 0,1% (Allergan, TX. USA) 4 veces al día por 21 días.

El seguimiento clínico se realizó durante un año en forma periódica y mensual y los resultados clínicos fueron registrados con una cámara Nikon Coolpix 5700 Digital Camera (Nikon, Tokio, Japón). La evolución clínica se estadificó según la clasificación ILSI descrita por Bagley et al,³⁴ levemente modificada por nosotros.

FOTOCOAGULACIÓN CON LASER ARGÓN

Se realizó una sola sesión de 100 disparos de fotocoagulación con láser argón en 6 de 16 conejas del grupo tratado y en 8 de los 8 controles.

SACRIFICIO Y TOMA DE MATERIAL

Todos los animales del grupo tratado y del grupo control fueron sacrificados a los 180 días del POP.

ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

Un tercio de la cornea e iris fueron procesados mediante tinciones con H&E, PAS y Mason según las técnicas previamente descritas.

ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO

En todos los animales se utilizaron anticuerpos monoclonales contra las citoqueratinas K3/12 (Mab AE5, Chemicon, CA, USA) y K19 (Mab 1675, Chemicon, CA, USA) para identificar al presencia de estas queratinas en el epitelio corneal. El mismo análisis se realizó en el ojo contralateral que no recibió tratamiento alguno (grupo control sano). Las concentraciones fueron de 1:200 y 1:50 de anti K3/12 para el análisis por IHQ e IFI respectivamente y 1:15 Y 1:5 de anti K4 para el análisis por IHQ e IFI respectivamente

Se siguió la metodología según la técnica descrita previamente.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados con respecto al DSCL luego de recibir el tratamiento propuesto en este protocolo se realizó con:

1. R Development Core Team (2009). R: A language and environment for statistical computing (R foundation for Statistical Computing, Viena, Austria). Se utilizó el software R package v 3.1-90 para modelos de efectos mixtos lineales y no lineales.¹⁵⁵

156 157

Se consideraron dos tratamientos, por un lado el grupo tratado y por el otro el grupo placebo o control. Con el fin de tener un estudio balanceado se trabajó solo con los conejos observados hasta los 120 días. Los sacrificados o no observados entre los 90 y 120 días fueron excluidos del análisis. En el grupo de los tratados, las unidades experimentales (conejos) fueron 10. En el grupo de los no tratados, las unidades experimentales (conejos) fueron 7.

Se analizó:

a) ISQUEMIA LIMBAR

Lo que se observó en 9 tiempos fue el porcentaje de isquemia limbar (dividido en 5 categorías: no isquemia, <25%, 25 a 50%, 50 a 75% y >75%) afectado en cada animal, se debió considerar como valor observado el porcentaje medio de cada categoría, es decir 0.5 (sin isquemia), 12.5, 37.5, 60.5 y 80.5 respectivamente para cada una de las restantes categorías.

Esto fue realizado para poder aplicar un modelo con variable respuesta continua.

En este análisis se consideró el porcentaje afectado en el preoperatorio como una variable predictiva.

Se utilizó un modelo lineal con efectos mixtos (fijos y aleatorios) (Linear Mixed-Effects Models) dado que permite una estructura heterocedástica y errores correlacionados dentro del grupo.^{158 159}

Las variables utilizadas fueron:

1. Variable respuesta:
 - a. Porcentaje afectado (para cada conejo en 8 tiempos)
2. Variables predictivas: porcentaje
 - a. Porcentaje afectado en el preoperatorio (para cada conejo)
 - b. Tiempo (8 tiempos)
 - c. Tratamiento (2)
 - d. Conejo

Se consideró la variable conejo como un efecto aleatorio, los restantes como efectos fijos y se planteó un modelo con interacción entre Tiempo y Tratamiento.

Se asumió un modelo de heterocedasticidad y se modeló asumiendo igual variabilidad en cada tiempo. La correlación entre un mismo sujeto en el tiempo se modeló como un autoregresivo de orden 1. Las estructuras de correlación se utilizaron para modelar la dependencia entre observaciones, es decir datos observados secuencialmente a través del tiempo.

Los modelos autoregresivos expresan la observación actual como combinación lineal de observaciones previas más un término de ruido homocedástico que se asume independiente de las observaciones anteriores, si el número de observaciones anteriores a incluir en el modelo es p , se denomina orden del modelo autoregresivo y se denota $AR(p)$.

b) ESTROMA CORNEAL

Lo que se observó en 9 tiempos fueron los datos encontrados dentro de las 4 categorías ordenadas de cómo se encontraba el estroma corneal. Estas 4 categorías fueron las descritas en la tabla 2:

1. Detalles del iris claramente visible
2. Opacidad de la cornea que causa visión borrosa de los detalles del iris
3. Opacidad de la cornea que solo permite discernir la pupila

4. Opacidad de la cornea total: la pupila no es visible

Pudimos considerar entonces a la variable respuesta ordinal.

Se utilizó un modelo de Regresión logística de probabilidades proporcionales a medidas repetidas (Repeated Measures Proportional Odds Logistic Regression)

Las variables utilizadas fueron:

1. Variable respuesta :

- a. Grado de opacidad estromal (respuesta Ordinal)

2. Variables predictivas:

- a. Tiempo
- b. Tratamiento
- c. Conejo

Como función de enlace se tomo el logit y la correlación entre un mismo sujeto en el tiempo se modeló como un autoregresivo de orden 1.

BIOADHESIVOS

PLASMA RICO EN PLAQUETAS (PRP)

La investigación fue realizada en dos etapas. Primero, un estudio in vitro fue realizado con la idea de determinar el mejor método de obtener PRP a partir de sangre de conejos. En segunda instancia, se evaluó la efectividad del PRP utilizándolo como bioadhesivo en trasplantes laminares de cornea en conejos.

Se utilizaron 40 conejos Neozelandeses albinos adultos, con un peso promedio de 3000 gramos. Dieciocho fueron hembras y veintidós machos. Fueron mantenidos en jaulas individuales, bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y ciclo de luz de 12 horas. Se los alimentó con alimento balanceado y agua ad libitum.

ESTUDIO IN VITRO

GRUPO DE ESTUDIO

Se obtuvieron 73 muestras de sangre intracardiaca de 28 animales. Todo procedimiento fue realizado bajo estrictas normas asépticas. Los animales recibieron anestesia general intramuscular con 0,2mg/kg de midazolam (Roche, Basilea, Suiza) y 1.4mg/kg de ketamina (Fada, Buenos Aires, Argentina). La sangre fue aspirada con una aguja 21G colocada en una jeringa de 10ml que contenía previamente 1.3ml de ACD (Anticoagulant Citrate Dextrose), solución que utilizamos para evitar la coagulación de la muestra. Por otro lado se obtuvo 1ml adicional de sangre para realizar el conteo celular.

TÉCNICA UTILIZADA

Cada muestra de sangre fue centrifugada a 1300 rpm y 4°C durante 15 minutos con la posterior obtención de las tres capas celulares. La inferior que comprende los glóbulos rojos, la intermedia de glóbulos blancos y la superior que es el plasma. La capa de plasma de 6 ml fue nuevamente centrifugada a 2600 rpm durante 5 minutos y así se obtuvieron dos partes: la superior de 5,5 ml que comprendió el plasma pobre en plaquetas (PPP) y una inferior de 0,5 ml donde se encontró el plasma rico en plaquetas (PRP). El PPP fue aspirado con el fin de evitar la dilución del PRP y luego éste fue aspirado con otra pipeta y colocado en un tubo estéril.

A posteriori se activo el PRP con Ca_2Cl , compuesto que inhibe el efecto anticoagulante del ACD. Inmediatamente a esta activación, el PRP se transforma en una solución tipo gel con capacidades adhesivas (Figura 17).

La activación del PRP fue evaluada en muestras de 250ul colocadas en tubos Eppendorf con distintas concentraciones de Ca_2Cl . El primer análisis se realizó con concentraciones de Ca_2Cl al 5%, 10%, 25% y 50%, que fueron instiladas en dos muestras de PRP de cada uno de dos animales. Luego se realizó una comparación entre concentraciones de Ca_2Cl al 5 y 10% en 9 muestras obtenidas de 5 animales distintos. Finalmente, el test se realizó con soluciones de Ca_2Cl al 5% en 47 muestras de PRP de 21 animales. Las muestras fueron observadas durante 2 horas y se clasificaron como “no-activadas” si la coagulación no ocurría dentro de ese tiempo.

El recuento plaquetario fue realizado en la muestra de sangre de 1ml y en la muestra de PRP con una cámara de Neubauer utilizando el método directo y manual de Brecher y Cronkite.^{160 161}

ESTUDIO IN VIVO

GRUPO DE ESTUDIO

EL PRP y el PPP se preparó en 12 animales utilizando la misma técnica que en el estudio *in vivo*. Luego fue activado con Ca_2Cl al 5% y se lo utilizó como bioadhesivo en el implante laminar de cornea autólogo.

TÉCNICA UTILIZADA

La técnica quirúrgica constó de la colocación de iodopovidona al 10% y 5% para lograr la asepsia y antisepsia de piel y conjuntiva respectivamente. Luego se colocó una gota de ciprofloxacina al 0,3% (Alcon, San Pablo, Brasil). La queratectomía laminar se realizó con un trépano de 6mm de diámetro colocado sobre el ojo derecho de cada animal bajo un microscopio quirúrgico ZEISS S5-Pro (Zeiss C, Overckochen, Alemania). El flap corneal se obtuvo mediante la técnica de *peeling-off* descripta por Malbran ES.¹⁶²

Luego el flap se embebió en el PPP autólogo y se mantuvo a 4°C durante 3 minutos, tiempo en el cual se activó el PRP y una vez transformado en gel se lo colocó sobre la superficie desnuda del estroma receptor. A continuación el flap corneal fue colocado sobre el estroma con el PRP activo en la interfase. La adherencia del implante autólogo fue verificada a los 30 minutos mediante delicadas tracciones manuales realizadas con dos pinzas 12-0. Verificada ésta, se procedió a realizar una tarsorrafia parcial con tres puntos de suturas de seda 5-0 colocados en

los dos tercios internos de la fisura palpebral. Los animales recibieron oxígeno al 21% por una hora luego de ser despertados. El tratamiento postoperatorio constó de ciprofloxacina al 0,3% y dexametasona al 0,1% (Poen, Buenos Aires, Argentina) colocando una gota 4 veces por día durante 2 semanas. Las suturas de la tarsorrafia se retiraron a los dos días.

MANEJO POSTOPERATORIO

El seguimiento postoperatorio fue realizado diariamente prestando atención a la adhesividad corneal y a la reacción inflamatoria. Estas características fueron documentadas fotográficamente a los 2, 7, 30 y 90 días postoperatorios con una cámara digital Nikon Coolpix 5700 (Nikon, Tokio, Japón).

ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

El análisis histopatológico se realizó en las mismas fechas. Se utilizaron en todos los casos tinciones histológicas con H&E, PAS y Tricrómico de Masson.

QUERATOPLASTIA LAMINAR UTILIZANDO PRP COMO BIOADHESIVO VS. SUTURAS CONVENCIONALES

GRUPO DE ESTUDIO

Se utilizaron 30 conejos albinos neozelandeses con un peso promedio de 3000 gramos (2500 a 3500 gramos). El grupo tratado constó de 12 conejos en los que se utilizó el PRP como bioadhesivo de la queratoplastia laminar. Los grupos controles fueron dos. Uno de 12 conejos donde se utilizaron suturas convencionales de nylon 10-0 (Grupo Control con Sutura) y otro de 6 animales donde no se utilizó medio de sostén alguno (Grupo Control sin PRP y sin sutura)

PREPARACIÓN DEL PRP

Según metodología previamente descripta.

TÉCNICA QUIRÚRGICA

La técnica quirúrgica constó de la colocación de iodopovidona al 10% y 5% para lograr la asepsia y antisepsia de piel y conjuntiva respectivamente. Luego se colocó una gota de ciprofloxacina al 0,3% (Alcon, San Pablo, Brasil). La queratectomía laminar se realizó con un trépano de 6mm de diámetro colocado sobre el ojo derecho de cada animal bajo un microscopio quirúrgico ZEISS S5-Pro (Zeiss C, Overckochen, Alemania). El flap corneal se obtuvo mediante la técnica de *peeling-off* descripta por Malbran ES.

1. Grupo Tratado con PRP: Queratoplastia laminar utilizando PRP: En este grupo, el flap corneal obtenido luego de la queratoplastia laminar se embebió en el PPP autólogo y se mantuvo a 4°C durante 3 minutos, tiempo en el cual se activó el PRP y una vez transformado en gel se lo colocó sobre la superficie desnuda del estroma receptor. A continuación el flap corneal fue colocado sobre el estroma con el PRP activo en la interfase. La adherencia del implante autólogo fue verificada a los 30 minutos mediante delicadas tracciones manuales realizadas con dos pinzas 12-0.

2. Grupo Control con Suturas 10-0: Queratoplastia laminar utilizando suturas de nylon 10-0: Una vez que el botón corneal fue retirado del estroma, el tejido extraído fue embebido en solución fisiológica por un minuto y luego colocado nuevamente sobre el estroma receptor. Posteriormente fue suturado con 8 puntos interrumpidos de nylon 10-0. Los puntos fueron rotados y enterrados en el estroma receptor.

3. Grupo control Sin PRP, Sin Suturas: Queratoplastia laminar sin adhesivos o suturas:

Se realizó la queratectomía laminar, el botón corneal fue irrigado con solución fisiológica durante un minuto y luego colocado nuevamente sobre el estroma sin ningún medio de sostén.

MANEJO POSTOPERATORIO Y SEGUIMIENTO

En todos los casos se realizó una tarsorrafia parcial de 2/3 de la fisura palpebral con puntos interrumpidos de seda 5-0. Se colocó durante 21 días 1 gota cada 6hs de ciprofloxacina al 0,3% y dexametasona al 0,1% (Poen, Buenos Aires, Argentina).

La tarsorrafia fue removida al segundo día postoperatorio. El seguimiento clínico se realizó diariamente durante la primera semana y semanalmente a partir de la segunda semana hasta la fecha del sacrificio. Todo seguimiento fue realizado con el microscopio quirúrgico y con el animal bajo anestesia general. Se prestó especial atención a la adhesividad del flap, las posibles reacciones inflamatorias y la claridad corneal. La adhesividad del flap fue testada mediante la tracción manual suave del flap con un fórceps delicado. Todas estas características fueron fotográficamente documentadas en los días postoperatorios 2, 7, 30 y 90 utilizando una cámara digital Nikon Coolpix 5700 (Nikon, Tokio, Japón).

SACRIFICIO Y TOMA DE MATERIAL

Tres animales de cada grupo fueron sacrificados en los días POP 2, 7, 30 y 90.

ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

El análisis histopatológico se realizó en las mismas fechas. Se utilizaron en todos los casos tinciones histológicas con H&E, PAS y Tricrómico de Masson según la metodología descripta previamente.

ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO E INMUNOFLORESCENTE

Anticuerpos primarios contra la actina del músculo liso (Anti SMA) fueron usados para identificar la presencia de miofibroblastos en un tercio del estroma corneal de los animales tratados y del grupo control con suturas. Se utilizó una concentración de 1:500 y 1:100 de anti SMA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) para el análisis por IHQ e IFI respectivamente.

Este análisis se realizó en los días POP 7, 30 y 90. Dos corneas de conejos normales se utilizaron para tener un dato de comparación.

Se siguió la metodología según la técnica descripta previamente.

ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Un tercio de la cornea fue estudiado por esta metodología utilizando la técnica descrita previamente.

CONTEO DE CÉLULAS ESTROMALES SMA POSITIVAS

El conteo celular fue realizado según el método descrito por Andreoni et al.¹⁶³

El análisis, conteo y registro de las imágenes positivas y negativas se realizó utilizando el sistema KS400 (Kontron Elektronik/Zeiss, Zeiss C, Overckochen, Alemania) y una videocámara blanco y negra Hyper HAD Sony CCD IRIS montada sobre un microscopio Optiphot-2 Nikon. Se evaluaron 6 áreas etiquetadas, cada una de 47730 pixels², que fueron seleccionadas de forma randomizada en cada muestra corneal. Al menos 3 muestras de cada animal fueron evaluadas.

Las imágenes fueron digitalizadas en un recuadro rectangular de 640 x 480 pixeles utilizando un objetivo 10X en el modo fotográfico con la intensidad de luz estándar. Con intención de corregir algún posible defecto de la iluminación del sistema óptico, se realizaron imágenes de toma lenta con corrección del brillo de fondo. Luego de esto, una imagen positiva segmentada fue elegida. Definiendo la intensidad de grises, todos los pixeles con información gris mayor o menor al establecido fueron seteados a blanco y los restantes fueron seteados a negro. Estos elementos negros fueron contabilizados con el sistema Kontron y luego se calcularon las células SMA positivas de cada muestra evaluada.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico fue realizado mediante el Student-T-test. Se consideró una P significativa <0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

TRASPLANTE AUTÓLOGO DE STEM CELLS DE CÓRNEA EN CONEJOS CON DSCL

Una biopsia de limbo de 1,8 milímetros de diámetro fue suficiente para lograr la replicación de stem cells *in vitro*. Las láminas de neopitelio corneal estuvieron disponibles para ser implantadas luego de tres semanas de procesamiento. Las matrices de PPP demostraron tener una muy buena elasticidad y adecuada transparencia. Por el contrario, las láminas de gel comercial (FG) fueron opacas y no elásticas (Figura 20).

Durante la primer semana postoperatoria se obtuvo una total reepitelización de las pequeñas úlceras producto de la toma de muestras de limbo y no se hallaron efectos clínicos colaterales en los ojos biopsiados.

Todos los ojos con quemaduras alcalinas presentaron signos clínicos de LSCD en el momento de la cirugía (neovascularización corneal, irregularidades de superficie y opacidad corneal). La figura 23 muestra signos del progreso clínico de los conejos implantados, evaluados durante un año postoperatorio. La opacidad corneal resolvió en forma no lineal en el grupo de animales tratados, pero aún así todos los animales demostraron una clara mejoría en el tiempo (Tabla 3).

| CLASIFICACIÓN EVOLUTIVA DE LOS ANIMALES CON DSCL QUÍMICO Y TRATADOS CON IMPLANTES AUTÓLOGOS DE SC | | | | | |
|--|--|----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--|
| ANIMALES AFECTADOS / TOTAL ANIMALES, (%) | | | | | |
| | GRADO 0 | GRADO I | GRADO II | GRADO III | GRADO IV |
| ISQUEMIA LIMBAR | SIN ISQUEMIA | <25% | 25 - 50% | 50 - 75% | 75 - 100% |
| PREOPERATORIO | | | 1/14 (7,14%) | 2/14 (14,28%) | 11/14 (78,57%) |
| 30D POP | | | 6/14 (42,85%) | 6/14 (42,85%) | 2/14 (14,28%) |
| 60D POP | | 2/8 (25%) | 1/8 (12,5%) | 3/8 (37,50%) | 2/8 (25%) |
| 90D POP | | 2/5 (40%) | 2/5 (40%) | 1/5 (20%) | |
| 180D POP | 1/4 (25%) | 1/4 (25%) | 2/4 (50%) | | |
| 360D POP | 1/2 (50%) | 1/2 (50%) | | | |
| ESTROMA CORNEAL | DETALLES DEL IRIS CLARAMENTE VISIBLES | | BORRAMIENTO DEL IRIS | SOLO PUPILA VISIBLE | OPACIDAD TOTAL: PUPILA NO VISIBLE |
| PREOPERATORIO | | | 1/14 (7,14%) | 1/14 (7,14%) | 12/14 (85,71%) |
| 30D POP | | | 2/14 (14,28%) | 5/14 (35,71%) | 7/14 (50%) |
| 60D POP | | | 2/8 (25%) | 1/8 (12,50%) | 5/8 (62,50%) |
| 90D POP | | | 2/5 (40%) | 1/5 (20%) | 2/5 (40%) |
| 180D POP | | 3/4 (75%) | | 1/4 (25%) | |
| 360D POP | 1/2 (50%) | 1/2 (50%) | | | |
| PROFUNDIDAD CORNEAL DE LA LESIÓN | EPITELIO | | EPITELIO Y <1/3 ESTROMA | EPITELIO Y >1/3 ESTROMA | ENDOTELIO |
| PREOPERATORIO | | | | | 14/14 (100%) |

Tabla 3: Clasificación evolutiva de los animales con DSCL químico tratados con implantes autólogos de SC

Una clara reducción de los defectos epiteliales fue vista en la mayoría de los casos tratados, aún en aquellos con neovascularización corneal.

Los injertos corneales no presentaron signos de neovascularización durante el primer mes postoperatorio. A partir del segundo mes, sesiones de fotocoagulación con láser argón fueron necesarias en 9 animales de acuerdo a la aparición de los neovasos.

El estudio histológico reveló un epitelio de múltiples capas estratificado en todo momento. Se hallaron células de citoplasma claro en el tercio inferior del epitelio a partir de los 30 días de la cirugía y estas permanecieron vigentes hasta el año postoperatorio. No hubo signos de pannus vascular así como tampoco de células calciformes intraepiteliales en las corneas implantadas. En todos los animales se pudo detectar el daño corneal posterior de la quemadura alcalina a través de la replicación de la membrana de Descemet (Figura 22).

Los resultados de inmunohistoquímica mostraron expresión de citoqueratinas K3 y K12 en todo el epitelio central de la cornea. La expresión de citoqueratina 19 no fue hallada. Estos resultados son similares a los encontrados en corneas normales (Figura 24).

Cinco animales desarrollaron ectasia corneal y/o endoftalmitis a los 30 días de la quemadura alcalina y no fueron sometidos al tratamiento con implantes de neopitelio corneal a partir de stem cells autólogas. Estos animales fueron excluidos del estudio y reemplazados por nuevos conejos.

DISCUSIÓN

En nuestro estudio, las láminas de neopitelio corneal a partir de SC autólogas fueron capaces de regenerar satisfactoriamente la superficie ocular en la mayoría de los animales con DSCL. Esto fue documentado por la ausencia o reducción de los defectos epiteliales persistentes, el simbléfaron o la neovascularización corneal. Los casos que padecieron de neovasos corneales parciales luego de algunos meses de instaurado el tratamiento y tratados con fotocoagulación con láser argón respondieron siempre con regresión de los mismos, en distintos grados. La fotocoagulación fue bien tolerada por los implantes de SC. El fenotipo del epitelio corneal corroborado con anticuerpos contra citoqueratinas presentes en dicho epitelio fue concordante con los estudios previos.^{42 164 165 166 167}

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE SOPORTES CELULARES COMERCIALES VS. AUTÓLOGOS

Las láminas montadas sobre PPP comparadas con las montadas sobre Tissucol® mostraron mayor transparencia durante el cultivo y al momento de ser desmontadas para su utilización. Estas primeras mostraron una gran elasticidad y gran resistencia ante tracciones normales con dos pinzas enfrentadas y con fuerzas opuestas así como también soportaron la técnica de sutura corneal convencional utilizando 8 puntos de nylon 10-0.

La histología de las láminas cultivadas sobre distintos soportes no reveló diferencias significativas en la estratificación. Ambas láminas mostraron un epitelio estratificado en 4 a 7 capas. Las células inferiores poligonales evidenciaron un núcleo prominente. Las células de las capas intermedias presentaron morfología irregular y la capa superficial se constituyó de células planas con núcleos compactos de cromatina homogénea. No se observaron células mucosecretantes (Figuras 20 y 21).

En ambas láminas se observó un epitelio estratificado multilaminar compuesto por 4 a 7 capas de epitelio organizado en células cuboides y ovoideas sin mucosecretantes.

Todas las láminas fueron K3/12 positivas y sólo 2 de 20 (1 sobre PPP y 1 sobre Tissucol®) fueron K4 positivas.

DISCUSIÓN

Nosotros creemos que el uso de PPP, al ser una sustancia autóloga, sería una buena alternativa como soporte celular. De esta manera, logramos que las láminas de epitelio corneal pueden ser fácilmente manipuladas durante su replicación *in vitro* así como también durante la cirugía. Más aún, la transparencia del PPP permite a los especialistas en cultivo la fácil visualización de todo el proceso de estratificación, hecho difícil de conseguir con el uso de Tissucol®. Las reacciones inmunológicas son raramente observadas al utilizar sustancias autólogas. Esta característica representa una gran ventaja con respecto a los adhesivos comerciales o a la membrana amniótica disponible en el mercado.

El PPP es fácilmente manipulado, lo que facilita su instrumentación sobre la superficie ocular. No se hallaron dificultades con la técnica de sutura ya que estos implantes presentaban buena elasticidad y fuerza suficiente que toleraron sin inconvenientes los 8 puntos interrumpidos de nylon 10-0. El PPP es incluso una opción costo efectiva, y su obtención puede ser realizada con procedimientos estándar.

FOTOCOAGULACIÓN LASER DIRECTA EN NEOVASCULARIZACIÓN CORNEAL

Los neovasos comenzaron su regresión en todos los casos a partir de las 48hs de aplicado el láser. No fue necesaria la reaplicación de esta terapia sobre terreno ya tratado.

No se hallaron signos clínicos ni histológicos de daño corneal secundario a la fotocoagulación con láser argón.

DISCUSIÓN

El uso de fototerapia con argón laser surge como un tratamiento prometedor en la neovascularización corneal luego del implante de neoepitelio limbar, reduciendo, su aplicación, el riesgo siempre presente de falla del injerto por invasión de la neovascularización. Hubo una clara tendencia a la reducción de los neovasos durante el tiempo. Animales que han recibido varias sesiones de esta terapéutica mantuvieron una cornea clara, lo que sugiere que el laser aplicado sobre los vasos esclero conjuntivales no causaría efecto deletéreo sobre la cornea.

TRASPLANTE HOMÓLOGO DE SC DE CÓRNEA EN CONEJOS CON DSCL

GRUPO TRATADO

En todos los animales se implantó un epitelio estratificado de 4 capas en el momento de la cirugía. Los botones de PPP autólogo mostraron gran elasticidad y transparencia, facilitando el seguimiento de los cultivos durante su estratificación y la correcta visualización del estroma receptor y del globo ocular en si durante la cirugía. Las láminas de neopitelio corneal, así como los botones de fibrina toleraron sin inconvenientes los 8 puntos de sutura no continuos de nylon 10. La deshidratación del PPP pudo ser prevenida durante la cirugía. EL lado correcto de la lámina epitelial a implantar fue claramente identificado y no se experimentó ninguna rotación antero posterior de las mismas.

No hubo complicaciones durante el procedimiento quirúrgico, salvo una pequeña perforación corneal en uno de los animales que resolvió satisfactoriamente, logrando una cornea clara y un ojo sin complicaciones al final del protocolo.

Como era de esperar, signos mínimos de queratitis fueron vistos durante las dos primeras semanas. De las 15 conejas hembras tratadas, 5 fueron sacrificadas a los 90 días postoperatorios y 8 al año. Del resto de los animales, uno murió sin causa aparente al mes de ser implantado y el otro tuvo que ser sacrificado en el mismo tiempo por una queratitis infecciosa que progresó durante las primeras semanas y que no respondió al tratamiento antibiótico recibido, terminando en una severa infección corneal (absceso grado IV¹⁶⁸) y luego en una endoftalmitis resistente a los medicamentos establecidos.

Al año postoperatorio, solo un animal de 8 mostró signos clínicos de LSCD, específicamente neovasos en un solo huso horario (Figura 25 A). Un segundo animal presentó un leucoma estromal intermedio en un cuadrante corneal (Figura 25 D) y un tercero desarrolló neovascularización corneal en un cuadrante a partir del cuarto mes postoperatorio que comenzó su regresión sin tratamiento hasta su desaparición al año de sobrevida. Sólo quedaron los rastros clínicos de los neovasos (Figura 26).

El resto de los 5 animales evidenciaron una superficie corneal normal, sin defectos epiteliales (Figura 25 B-C-E-F-G). La claridad corneal evolucionó favorablemente en todos estos animales con el transcurso del tiempo. El margen pupilar y las criptas del iris pudieron ser

identificados en todos los conejos. Signos de rechazo corneal, como los descritos por Maumenee,¹⁶⁹ no fueron identificados.

Tanto a los 90 días como al año postoperatorios, el estudio histológico de las corneas implantadas reveló un epitelio estratificado en múltiples capas con células epiteloides con citoplasma claro en la porción más profunda del epitelio y una membrana basal en todos los animales. No se encontraron signos de pannus vascular o células mucinosas. En el tercio medio y superior del estroma, ya sea central o periférico, se observó una cicatriz no inflamatoria de colágeno (Figura 27).

Los resultados de inmunofluorescencia mostraron expresión positiva de citoqueratinas K3 y K12 en todo el espesor epitelial, no así con K19, que fue negativo en todo momento. Este hallazgo es similar a lo encontrado la cornea normal (Gráfico 1 y Figura 28).

Trasplante Homólogo de SC de Cornea IFI de K3/12 y K19 entre Tratado vs Control

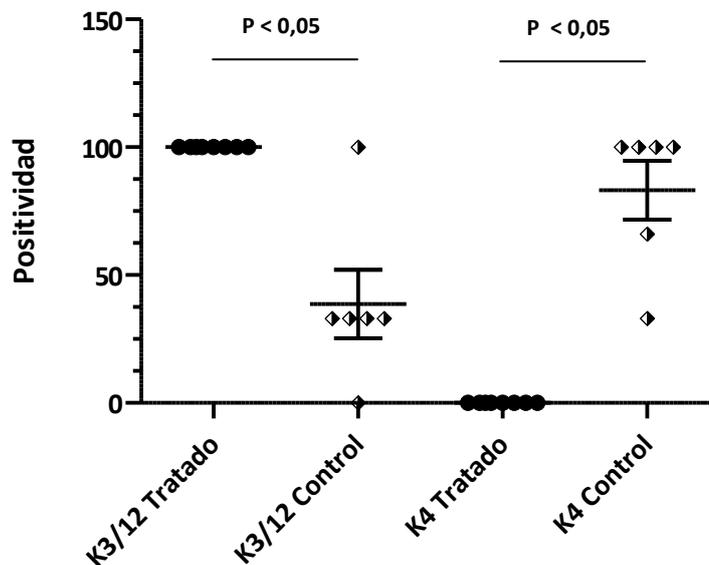


Gráfico 1: Estudio comparativo de IFI con anticuerpos anti K3/12 y anti K19 entre los grupos tratado y control del protocolo de trasplante homólogo de SC de córnea en conejos con DSCL

La expresión de queratinas en las láminas de epitelio cultivado mostró marca positiva para K19 en la base del epitelio y marca positiva para K3/12 en las capas superficiales (Tabla 4).

| INMUNOFLUORESCENCIA DE K3/12 Y K19 EN CORNEA CENTRAL Y PERIFÉRICA | | | | |
|---|----------------|-----------|-------|-----|
| TEJIDO\Ac | CORNEA | | LIMBO | |
| | K3/12 | K19 | K3/12 | K19 |
| CORNEA NORMAL | +++ | - | +++ | + |
| GRUPO TRATADO 90D POP | ++ | - | ++ | + |
| GRUPO TRATADO 1 AÑO POP | ++ | - | ++ | + |
| GRUPO CONTROL 90D POP | + | ++ | + | + |
| GRUPO CONTROL 1 AÑO POP | + | ++ | + | + |
| LAMINAS DE CULTIVO | + (suprabasal) | + (basal) | | |

Tabla 4: Inmunofluorescencia de los animales con DSCL mecánico a un año de haber recibido implantes de neopitelio vs grupo control. Inmunofluorescencia de las láminas de cultivo

GRUPO CONTROL C1 (NO LÁMINA DE EPITELIO, NO PPP. 90 DÍAS POSTOPERATORIOS)

Todos los animales mostraron signos de isquemia limbar y defectos epiteliales persistentes (DEP), definidos, estos últimos, como defectos del epitelio corneal que permanecen más de 2 semanas luego de la epitelización corneal. Estos animales sufrieron de irregularidades de la superficie ocular así como de úlceras estromales moderadas. Dos de estos conejos desarrollaron neovascularización a partir del día 75 POP. La visualización del margen pupilar fue prácticamente imposible, acompañándose en todos los casos de una imagen borrosa (Figura 25Figura 25).

El estudio histológico reveló un epitelio errático y regenerativo con mínima diferenciación celular en la superficie y una intensa proliferación fibrovascular. La membrana basal no fue identificada.

El análisis inmunohistoquímico mostró una elevada expresión de K19 y una débil marca de K3/12.

GRUPO CONTROL C2 (NO LÁMINA DE EPITELIO, BOTÓN DE PPP, UN AÑO POSTOPERATORIO)

Un animal murió sin causa aparente a los 240 días postoperatorios y otro tuvo que ser sacrificado a los 120 días debido a una infección severa de la superficie corneal que se transformó en un absceso grado IV.¹⁶⁸

Todos los animales desarrollaron isquemia limbar a los 90 días postoperatorios y mostraron DEP en una superficie corneal irregular, con múltiples úlceras estromales. Todo esto imposibilitó la correcta visualización del margen pupilar y al mismo tiempo la no distinción de las criptas del iris. Estos animales evidenciaron signos de DSCL con keratitis corneal, irregularidades del epitelio y vascularización del centro y periferia de la cornea. Al año postoperatorio, se observó una superficie ocular totalmente irregular (Figura 25)

El animal que falleció espontáneamente a los 240 días mostraba un pequeño leucoma inferior y defectos epiteliales en dos husos horarios (Figura 25 K). En el momento del sacrificio, el animal con el absceso corneal presentaba neovascularización de los 360 grados de la cornea y una gran opacidad central que obstruía la visualización de la pupila (Figura 25 Figura 25 J)

Las secciones histológicas revelaron un epitelio regenerativo a partir de la conjuntiva limbar sobre el estroma remanente y una cicatriz subepitelial con gran cantidad de células inflamatorias y neovascularización (Figura 27 E). El epitelio de estas corneas presentó mayor altura comparado con corneas normales o tratadas de este protocolo, con una diferenciación celular incompleta (Figura 27 F). Células intraepiteliales mucinosas de la conjuntiva fueron identificadas en un animal a los 120 días (Figura 27 G). Todos los animales presentaron un epitelio símil plano multiestratificado y una gran cicatriz estromal activa con miofibroblastos, depósitos de colágeno y células inflamatorias en la interfase con el resto del estroma corneal (Figura 27 H).

El análisis de IFI mostró una débil expresión de K3/12 y un patrón parcheado de K19 (Figura 28).

ESTUDIO GENÉTICO

Cromosomas donantes (XY) fueron detectados en una de cada dos conejas implantadas y biopsiadas a los 4, 7 y 12 meses postoperatorios (Figura 36).

DISCUSIÓN

Nuestros resultados demuestran que los implantes de epitelio limbar obtenido por bioingeniería a partir de SC donantes, montado sobre PPP autólogo como soporte celular podría ser una alternativa en el tratamiento del DSCL bilateral. Los implantes epiteliales favorecieron la reepitelización y sobrevivieron durante un extenso período de tiempo sin el uso de inmunosupresores sistémicos. Los resultados beneficiosos a los 3 meses continuaron confirmándose al año del POP.

PREPARACIÓN DEL PRP Y PPP

ESTUDIO IN VITRO

Todos los animales sobrevivieron a la extracción de sangre. Las muestras sanguíneas no contenían coágulos. El proceso de preparación del PRP duró 40 minutos +/- 2.

El recuento de plaquetas en el PRP fue mayor que en el hemograma de la muestra de sangre. En el PRP, la concentración de plaquetas promedio fue de 807.564 plaquetas/mm³ (rango 622.000 – 1.350.000, SD 211.490) a partir de un recuento en sangre venosa de 320.133 plaquetas/mm³ (rango 280.000 - 408.000, SD 42.323). El Factor de Enriquecimiento Plaquetario¹⁷⁰ fue de 152% (Tabla 5).

| RECuento DE PLAQUETAS EN SANGRE vs. PLASMA RICO EN PLAQUETAS EN CONEJOS | | | | |
|---|---------|--------------------|---------|------|
| MUESTRA \ PARÁMETROS | MEDIANA | RANGO | SD | FE |
| RECuento DE PLAQUETAS EN SANGRE (PLAQUETAS/MM ³) | 320.133 | 280.000 – 408.000 | 42.323 | - |
| RECuento DE PLAQUETAS EN PRP (PLAQUETAS/MM ³) | 807.564 | 622.000 -1.350.000 | 211.490 | 152% |

Tabla 5: Recuento de Plaquetas en Sangre vs. Plasma Rico en Plaquetas en Conejos. SD (standard desviation), FE (factor de enriquecimiento plaquetario).

En la fase 1, el PRP activado con concentraciones de Ca₂Cl de 25% y 50% no coagulo en las primeras 12 horas, mientras que en la fase 2 el PRP activado con dosis concentradas de Ca₂Cl de 10% coaguló en 26 minutos. En la fase 3, el tiempo de coagulación promedio de 47 muestras de PRP tratadas con concentraciones de Ca₂Cl de 5% fue de 19 minutos (rango 7 – 39 minutos, SD 7,4) (Tabla 6).

| PARÁMETROS EVALUADOS EN LA PREPARACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL PRP EN CONEJOS | | | | | | | |
|---|----------|-------|-----|-----|----------|-------|----------|
| PARÁMETROS \ FASES | 1ER FASE | | | | 2DO FASE | | 3ER FASE |
| CONCENTRACIÓN DE Ca_2Cl (%) | 5% | 10% | 25% | 50% | 5% | 10% | 5% |
| NÚMERO DE ANIMALES | 2 | 2 | 2 | 2 | 5 | 5 | 21 |
| NÚMERO DE MUESTRAS DE PRP | 2 | 2 | 2 | 2 | 9 | 9 | 47 |
| COAGULACIÓN DEL PRP | Si | Si | No | No | Si | Si | Si |
| TIEMPO DE COAGULACIÓN (MINUTOS) | | | | | | | |
| ↪ MEDIANA | 23 | 27 | - | - | 17 | 26 | 19 |
| ↪ RANGO | 18-25 | 25-31 | - | - | 10-20 | 20-50 | 7-39 |
| ↪ SD | - | - | - | - | 3.9 | 10.2 | 7.4 |

Tabla 6: Parámetros evaluados en la preparación *In vitro* del Plasma Rico en Plaquetas en conejos durante las 3 fases del estudio. SD (Standard Desviation).

ESTUDIO IN VIVO

Los animales que fueron sometidos a una queratoplastia laminar y PRP como bioadhesivo mostraron una adherencia del flap corneal dentro de los primeros 20 minutos. Todos los conejos sometidos a este procedimiento tuvieron el flap debidamente adherido y mostraron una adecuada claridad corneal a partir de los primeros 30 días postoperatorios (Figura 29).

Durante el proceso quirúrgico, no se evidenciaron complicaciones en el flap como desplazamientos o rotaciones del mismo sobre el lecho receptor.

En el postoperatorio, no hubo signos clínicos ni histopatológicos de reacción inflamatoria. El estudio histológico reveló una interfase flap-estroma normal en los 90 días postoperatorios, así como también un epitelio de características normales (Figura 30).

El flap mantuvo signos clínicos saludables de normalidad durante todo el periodo POP, sin hallazgos de queratitis difusa, edema corneal o arrugas del tejido implantado.

El grupo control en el cual no se utilizó ningún bioadhesivo mostró un flap corneal desprendido en todos los casos luego de remover la tarsorrafia al día 3 postoperatorio.

DISCUSIÓN

Desarrollamos una nueva metodología en la obtención del PRP y PPP en conejos. Demostrado en un estudio controlado y estandarizado.

QUERATOPLASTIA LAMINAR UTILIZANDO PRP COMO BIOADHESIVO VS. SUTURAS CONVENCIONALES

En las primeras 6 horas del postoperatorio, el lecho quirúrgico adquirió un halo opalescente por la cicatrización de la fibrina, seguido de un botón corneal implantado blancuzco, debido al glue y al edema corneal (Figura 31).

La opacidad fue aclarando con el paso de los días pero estuvo presente hasta el primer mes postoperatorio, momento en el cual las corneas se encontraron transparentes y permanecieron así hasta el final del protocolo (Figura 32).

Los animales del grupo P y S mostraron un botón corneal firmemente adherido desde las primeras horas del postoperatorio hasta que fueron sacrificados. Ambos grupos tuvieron edema corneal. El aspecto blanquecido de la cornea no se evidenció en el grupo S (Figura 32). Los animales del grupo N mostraron un desprendimiento total del flap a partir del segundo día postoperatorio, momento en que fue retirada la tarsorrafia.

El análisis histológico (Figura 33) no evidenció signos de inflamación en el grupo P. El epitelio se encontró levemente adelgazado en el día 2. Su morfología comenzó a normalizarse desde el día 7 en adelante. Restos de PRP fueron encontrados solo en la primera semana del postoperatorio (Figura 33 B). Infiltrados celulares con células inflamatorias se encontraron alrededor de las suturas intraestromales. Una gran cicatriz errática con ausencia de epitelio corneal se manifestó en el grupo control No P No S. La microscopía electrónica mostró características normales del flap, con un lecho estromal e interfase libre de células o debris en el grupo P. No así el grupo S que mostró una desorganización laminar con presencia de leucocitos alrededor de los puntos de sutura (Figura 34).

El número de miofibroblastos estromales (células SMA positivas) fue similar entre los grupos P (1117 cells/FdaArea/Pixel²) y S (1242 cells/FdaArea/Pixel²) una semana después de la cirugía. A los 90 días postoperatorios se evidenció un número significativamente mayor de células SMA en el grupo S (2502 cells/FdaArea/Pixel²). Mientras que el grupo P mostró un valor a los 90 días de células SMA similar lo encontrado en una córnea sana (75, 75 y 81,75 cells/FdaArea/Pixel²) (Gráfico 2 y Figuras 32 y 39)

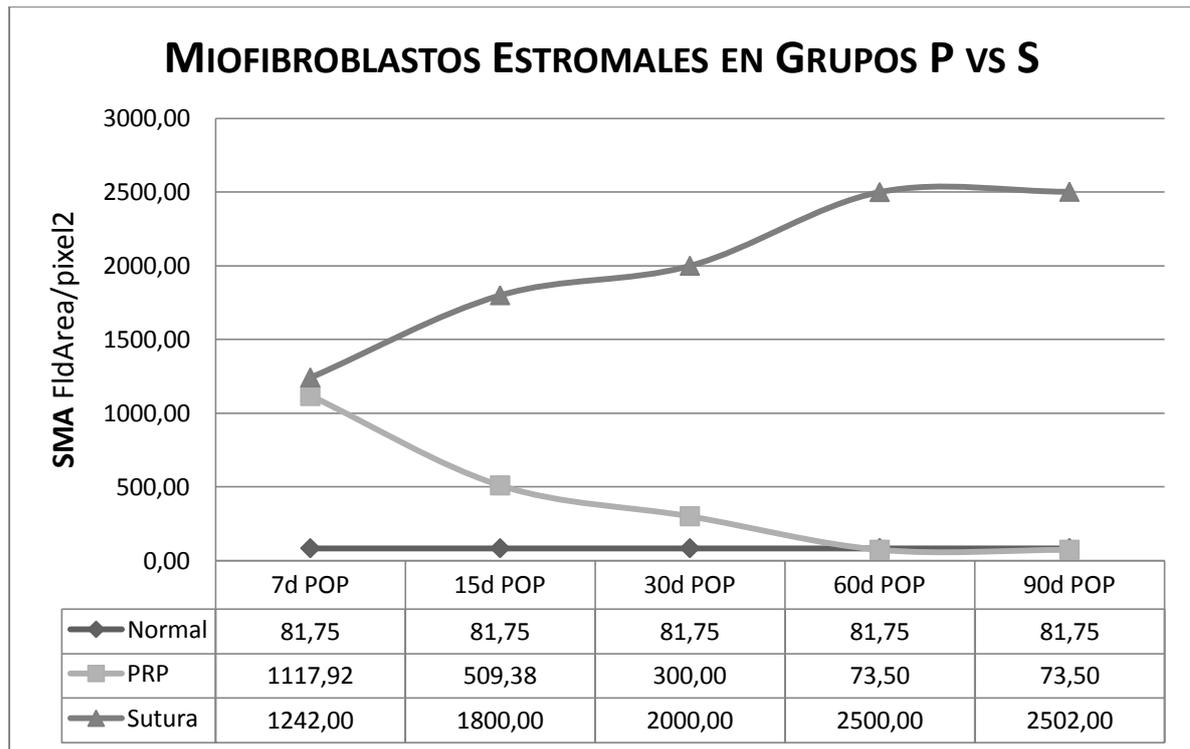


Gráfico 2: Miofibroblastos (células SMA positivas) entre los grupos con PRP y con Suturas, comparados con una cornea normal

DISCUSIÓN

El PRP fue un instrumento eficaz en la adhesión del implante laminar en conejos en los cuales se realizó una queratoplastia laminar con autoinjerto.

ESTUDIO PRE CLÍNICO DE TRASPLANTE DE NEOEPITELIO CORNEAL A PARTIR DE STEM CELLS AUTÓLOGAS MONTADAS SOBRE PLASMA POBRE EN PLAQUETAS AUTÓLOGO EN CONEJOS CON DSCL

En el grupo tratado la isquemia limbar declinó significativamente en 14 de los 16 animales. La misma comenzó a disminuir a partir de los 30 días POP y se mantuvo hasta la fecha del sacrificio del animal. Dos de estos animales sufrieron queratitis que progresó a un absceso corneal grado IV. El grupo control mantuvo o empeoró sus signos de LSCD (Figura 37, Tabla 7, Gráfico 3 y Gráfico 4).

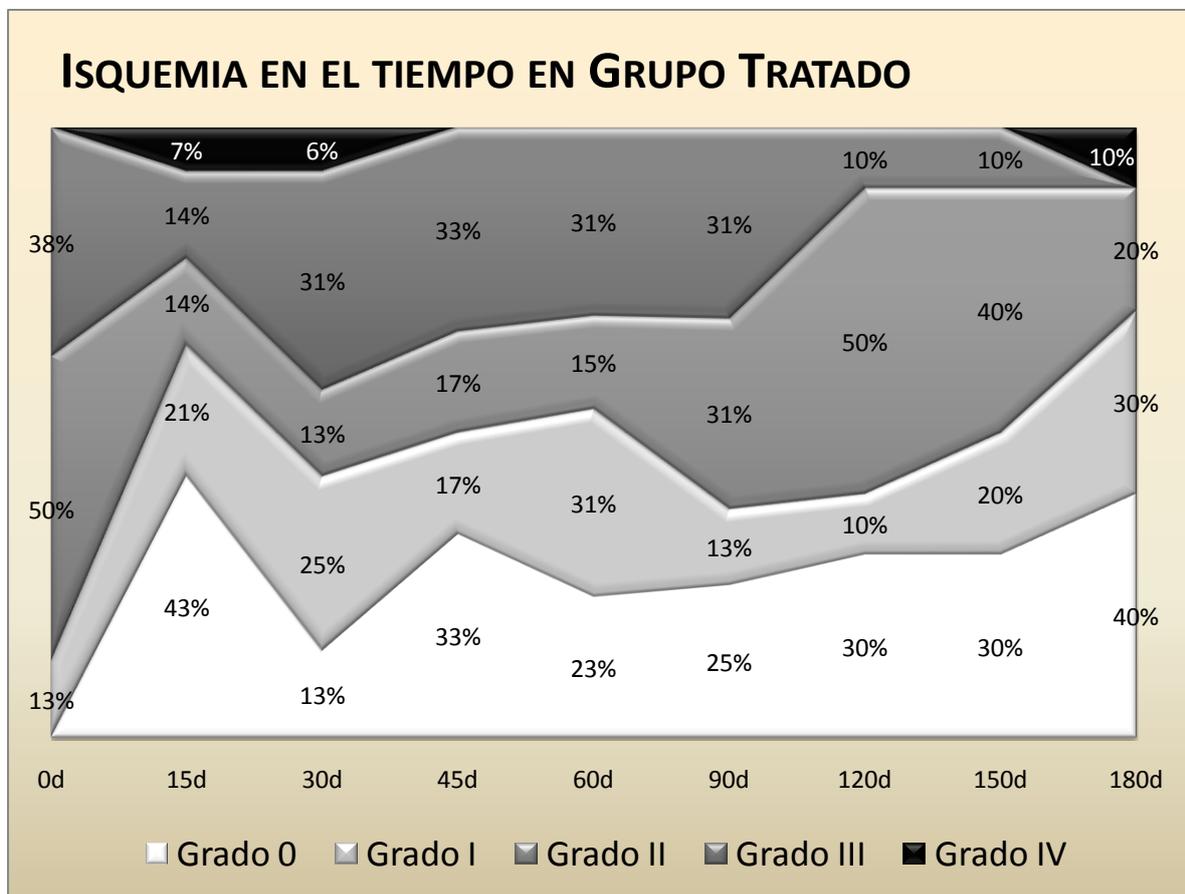


Gráfico 3: Isquemia limbar representada por áreas durante los 6 meses del POP del grupo tratado con neopitelio corneal autólogo cultivado sobre PPP

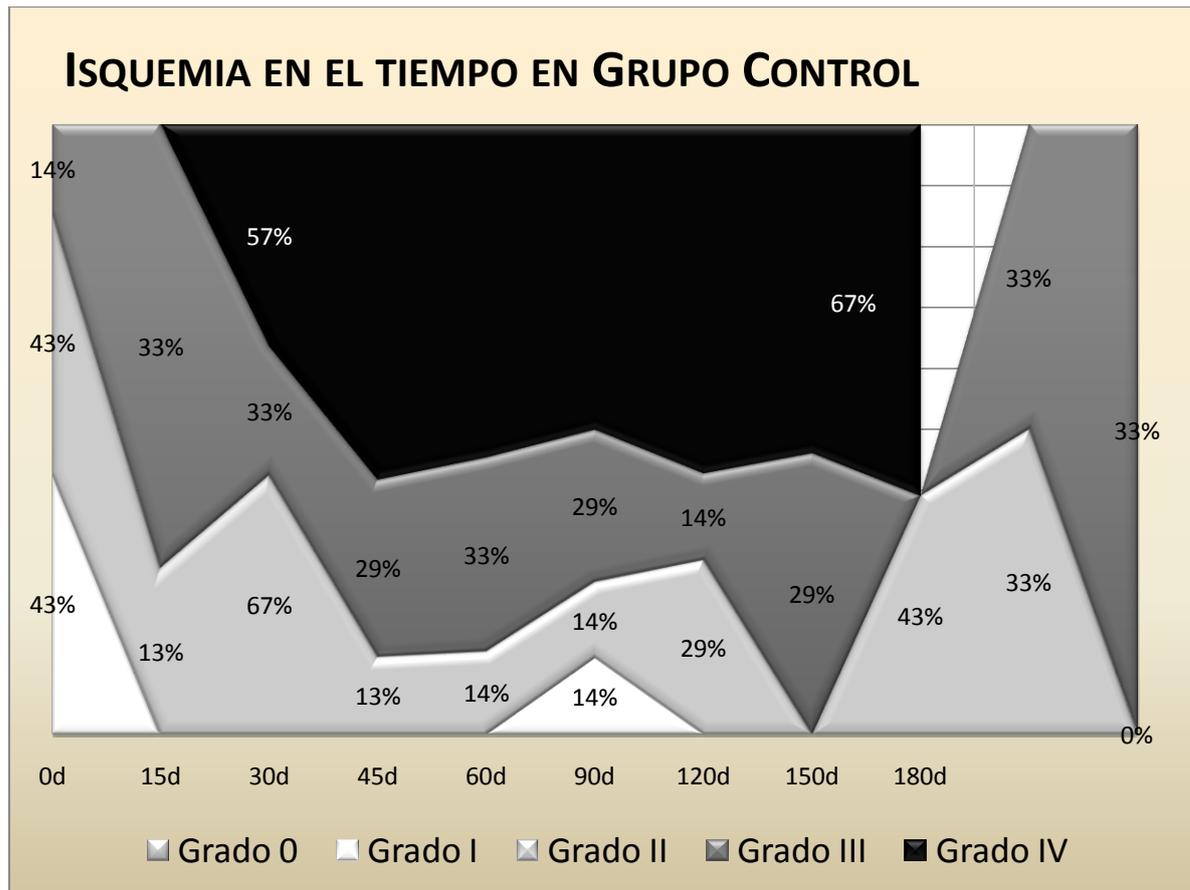


Gráfico 4: Isquemia limbar representada por áreas durante los 6 meses del POP del grupo control con láminas solo de PPP.

Con respecto a la opacidad corneal, ésta evolucionó favorablemente en todos los animales tratados, pudiéndose observar todos los detalles del iris. No así en el grupo control que se mantuvo igual o empeoró (Figura 37 y Tabla 7).

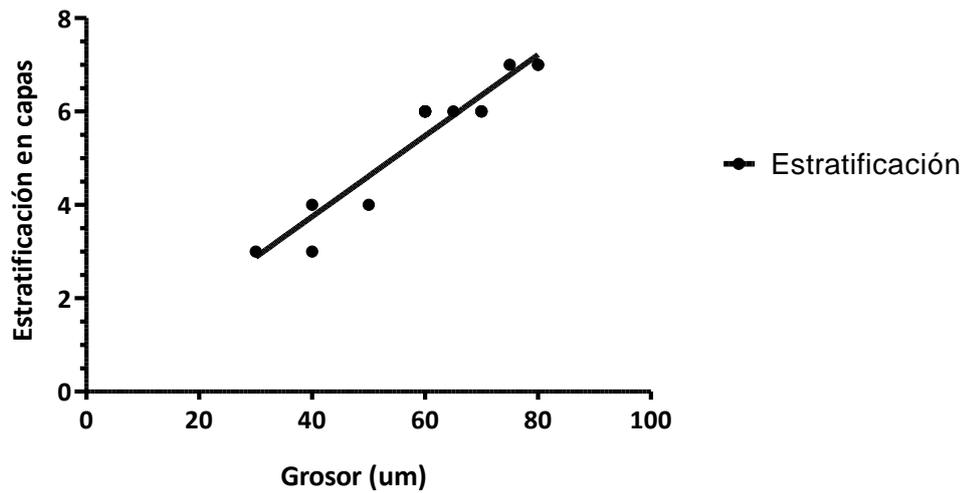
| GRADOS DE EVOLUCIÓN CLÍNICA EN GRUPO TRATADO VS. CONTROL | | | | | | | | | | | |
|---|--|--------|----------------|-----------------------------|-----------------|----------------------------|------------------|-----------------------|------------------|--------------|--------------|
| ANIMALES GRUPO TRATADO (%) VS ANIMALES GRUPO CONTROL (%) | | | | | | | | | | | |
| | GRADO 0 | | GRADO I | | GRADO II | | GRADO III | | GRADO IV | | TOTAL |
| ISQUEMIA LIMBAR | SIN ISQUEMIA | | <25% | | 25 - 50% | | 50 - 75% | | 75 - 100% | | |
| PREOPERATORIO | 0 | 0,00% | 2 | 12,50% | 8 | 50,00% | 6 | 37,50% | 0 | 0,00% | 16 |
| | 0 | 0,00% | 3 | 42,86% | 3 | 42,86% | 1 | 14,29% | 0 | 0,00% | 7 |
| 30D POP | 2 | 12,50% | 4 | 25,00% | 4 | 25,00% | 5 | 31,25% | 1 | 6,25% | 16 |
| | 0 | 0,00% | 0 | | 1 | 14,29% | 2 | 28,57% | 4 | 57,14% | 7 |
| 45D POP | 4 | 25,00% | 5 | 31,25% | 3 | 18,75% | 4 | 25,00% | 0 | 0,00% | 16 |
| | 0 | 0,00% | 0 | 0,00% | 1 | 14,29% | 2 | 28,57% | 4 | 57,14% | 7 |
| 90D POP | 4 | 25,00% | 2 | 12,50% | 5 | 31,25% | 5 | 31,25% | 0 | 0,00% | 16 |
| | 0 | 0,00% | 1 | 14,29% | 0 | 0,00% | 2 | 28,57% | 4 | 57,14% | 7 |
| 120D POP | 3 | 30,00% | 1 | 10,00% | 5 | 50,00% | 1 | 10,00% | 0 | 0,00% | 10 |
| | 0 | 0,00% | 0 | 0,00% | 3 | 50,00% | 0 | 0,00% | 3 | 50,00% | 6 |
| 180D POP | 4 | 40,00% | 3 | 30,00% | 2 | 20,00% | 0 | 0,00% | 1 | 10,00% | 10 |
| | 0 | 0,00% | 0 | 0,00% | 0 | 0,00% | 2 | 33,33% | 4 | 66,67% | 6 |
| ESTROMA CORNEAL | DETALLES DEL IRIS CLARAMENTE VISIBLES | | | BORRAMIENTO DEL IRIS | | SOLO PUPILA VISIBLE | | OPACIDAD TOTAL | | TOTAL | |
| PREOPERATORIO | 1 6,25% | | | 2 12,50% | | 6 37,50% | | 7 43,75% | | | 16 |
| | 3 42,86% | | | 2 28,57% | | 1 14,29% | | 1 14,29% | | 7 | |
| 30D POP | 1 6,25% | | | 4 25,00% | | 6 37,50% | | 5 31,25% | | 16 | |
| | 0 0,00% | | | 0 0,00% | | 3 42,86% | | 4 57,14% | | 7 | |
| 45D POP | 2 12,50% | | | 6 37,50% | | 6 37,50% | | 2 12,50% | | 16 | |
| | 0 0,00% | | | 0 0,00% | | 3 42,86% | | 4 57,14% | | 7 | |
| 90D POP | 2 12,50% | | | 6 37,50% | | 6 37,50% | | 2 12,50% | | 16 | |
| | 0 0,00% | | | 1 14,29% | | 2 28,57% | | 4 57,14% | | 7 | |
| 120D POP | 1 10,00% | | | 4 40,00% | | 4 40,00% | | 1 10,00% | | 10 | |
| | 0 0,00% | | | 2 33,33% | | 1 16,67% | | 3 50,00% | | 6 | |
| 180D POP | 3 30,00% | | | 3 30,00% | | 4 40,00% | | 0 0,00% | | 10 | |
| | 0 0,00% | | | 0 0,00% | | 2 33,33% | | 4 66,67% | | 6 | |

Tabla 7: Evolución clínica de los animales del estudio pre-clínico durante los 6 meses del POP. Se realizó la clasificación por grados según Bagley et al levemente modificado por nosotros.³⁴

Una lámina de epitelio corneal estratificado y continuo con su membrana basal presente se pudo observar en todas las corneas implantadas. El grosor del epitelio (mediana 60µ, rango 40 a 80µm) tuvo una relación lineal con la estratificación celular (mediana 6 capas, rango 3 a 8) (Gráfico 5). Células de citoplasma claro tipo epiteliales se observaron en la porción más profunda del epitelio. No se hallaron signos de neovascularización o células mucinosas intraepiteliales en 15 de los 16 animales tratados. El grupo control demostró signos de LSCD con un epitelio adelgazado, pobremente estratificado y regenerativo, con células calciformes en su interior. Se

evidenció delaminación estromal, neovascularización, disqueratosis y una marcada proliferación fibrovascular.

Estudio Preclínico de Trasplante de Neopitelio corneal sobre PPP a partir de SC autólogas Relación entre Grosor y Estratificación del epitelio implantado



| | |
|----------------------------------|--------------------|
| Best-fit values | |
| Slope | 0.08662 ± 0.007999 |
| Y-intercept when X=0.0 | 0.2832 ± 0.4957 |
| X-intercept when Y=0.0 | -3.270 |
| 1/slope | 11.54 |
| 95% Confidence Intervals | |
| Slope | 0.06975 to 0.1035 |
| Y-intercept when X=0.0 | -0.7626 to 1.329 |
| X-intercept when Y=0.0 | -18.97 to 7.400 |
| Goodness of Fit | |
| R square | 0.8734 |
| Sy.x | 0.4626 |
| Is slope significantly non-zero? | |
| F | 117.3 |
| DFn, DFd | 1.000, 17.00 |
| P value | < 0.0001 |
| Deviation from zero? | |
| Significant | |
| Data | |
| Number of X values | 19 |
| Maximum number of Y replicates | 1 |
| Total number of values | 19 |
| Number of missing values | 0 |

Gráfico 5: Relación entre el grosor y la estratificación del epitelio implantado del grupo tratado del estudio pre clínico de trasplante de neopitelio corneal a partir de SC autólogas montadas sobre PPP autólogo en conejos con DSCL

No hubo evidencia clínica ni histopatológica de rechazo del injerto. No se observaron daños causados por la fotocoagulación con laser argón.

La expresión de citoqueratinas 4, 19 y 3/12 en las corneas de los 16 animales tratados fue similar a lo hallado en corneas normales (C 4 negativa, C 19 negativa y C 3/12 positiva). El grupo control mostró una leve marca positiva para citoqueratinas 3/12 y una fuerte expresión de citoqueratina 4 (Figura 38 y Gráfico 6).

**Estudio Preclínico de Trasplante de Neopitelio corneal sobre PPP a partir de SC autóloga
IHQ de K3/12 y K4 en Tratados vs Control**

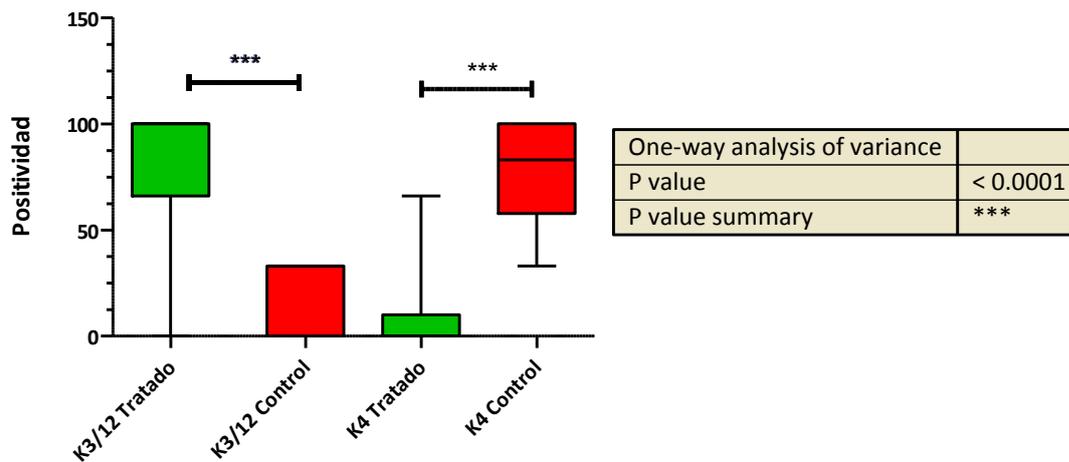


Gráfico 6 Análisis comparativo de IHQ con anticuerpos anti K3/12 y anti K14 entre los grupos tratado y control del estudio pre clínico de trasplante de neopitelio corneal a partir de SC autólogas montadas sobre PPP autólogo en conejos con DSCL

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

ISQUEMIA LIMBAR

Se asumió un modelo de heterocedasticidad y se modeló asumiendo igual variabilidad en cada tiempo, sin embargo a partir del gráfico no pareciera cumplirse este supuesto.

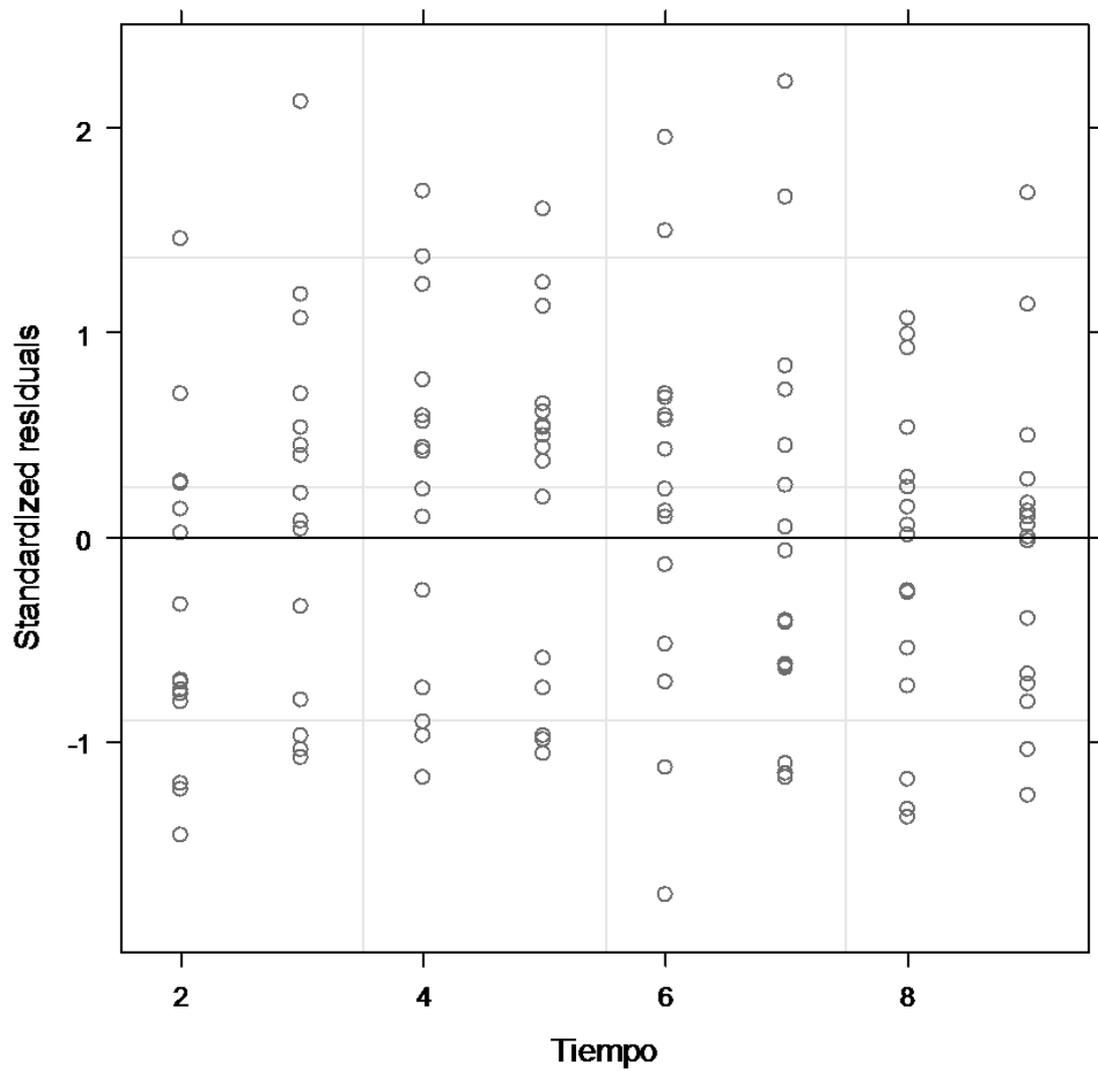


Gráfico 7 Análisis estadístico de los resultados con respecto al DSCL luego de recibir el tratamiento propuesto en el grupo tratado y no tratado del estudio pre clínico de trasplante de neopitelio corneal a partir de SC autólogas montadas sobre PPP autólogo en conejos con DSCL

Los resultados obtenidos son los observados en la Tabla 8.

| MODELO LINEAL CON EFECTOS MIXTOS FIJOS Y ALEATORIOS | | | | |
|---|-------|-------|----------|---------|
| VARIABLES \ VALORES | NUMDF | DENDF | F-VALUE | P-VALUE |
| INTERCEPT | 1 | 117 | 58.24540 | <.0001 |
| BASE | 1 | 14 | 1.41596 | 0.2539 |
| TRATAMIENTO | 1 | 14 | 19.20543 | 0.0006 |
| TIEMPO | 1 | 117 | 2.93100 | 0.0895 |
| TRATAMIENTO:TIEMPO | 1 | 117 | 0.42662 | 0.5149 |

Tabla 8 Modelo lineal con efectos mixtos fijos y aleatorios. Variables utilizadas: Variable respuesta: porcentaje afectado (para cada conejo en 8 tiempos). Variables predictivas: Porcentaje afectado en el preoperatorio (para cada conejo), Tiempo (8 tiempos), Tratamiento (2), Conejo

Los valores obtenidos indicarían que con un p-valor ≤ 0.0006 hay diferencia entre tratados y no tratados.

El % afectado en el preoperatorio, el tiempo y la interacción tiempo tratamiento no resultaron significativas.

ESTROMA CORNEAL

El estadístico del test de scores (score test statistics) para el modelo propuesto resultó no significativo con un valor de 4.532 con 6 grados de libertad y un p-valor 0.605 (4.532 on 6 d.f; p-value 0.605).

Los valores obtenidos para los parámetros ajustados, positivo para el tiempo (z-value= 4.977) indicaría que los scores decrecen con el tiempo y el valor negativo para la interacción tiempo-tratamiento (z-value= -2.687) indicaría que esto ocurre en mayor medida en el grupo tratado respecto del grupo control.

DISCUSIÓN

Implantes de neopitelio corneal obtenido a partir de SC autólogas sobre PPP autólogo mostraron efectividad estadísticamente significativa en el tratamiento del LSCD en conejos durante 6 meses

El trasplante de epitelio corneal autólogo podría ser probado en un ensayo clínico en la Argentina.

CONCLUSIONES

TRASPLANTE AUTÓLOGO DE STEM CELLS DE CÓRNEA EN CONEJOS CON DSCL

El implante de láminas de neopitelio corneal expandido *ex vivo* a partir de SC del limbo fue una terapéutica eficaz en el tratamiento del DSCL. La mayoría de los ojos no evidenciaron signos de neovascularización en al menos 6 husos horarios de la cornea. La opacificación de la córnea fue asociada a fibrosis estromal o a la replicación de la membrana de Descemet, ambas situaciones secundarias al modelo de lesión alcalina y no a la falla terapéutica. Sin embargo, todos los casos presentaron una superficie corneal normal. El grado de lesión pre operatorio suele implicar en personas humanas una agudeza visual compatible con la denominada ceguera legal.³⁵ Sin duda, en una situación clínica las lesiones podrían involucrar no solo el globo ocular, sino también la conjuntiva, los músculos extraoculares, las bolsas grasas periféricas y los párpados en toda su estructura, por lo que el pronóstico dependerá del grado de lesión inicial, que puede ser extremadamente variable. En nuestro modelo, produjimos una opacidad corneal total, inflamación conjuntival crónica y simbléfaron que sugieren la posible anormalidad de la integridad del film lagrimal y la susceptibilidad aumentada a las infecciones oculares. Estas situaciones no fueron observadas luego del tratamiento.

Luego del implante, los ojos de los conejos mostraron un buen progreso clínico y un grado de injuria disminuido. Parecería ser razonable pensar que estos casos se beneficiarían en gran medida de un injerto penetrante de cornea en un segundo tiempo.

La biopsia de limbo corneal es un procedimiento seguro y libre de complicaciones.^{43 44 171} El epitelio limbar que contiene las SC se encuentra en gran cercanía con la conjuntiva, un tejido ricamente vascularizado, por lo que medidas de extrema precaución fueron tomadas con el fin de evitar la contaminación de los cultivos de SC con eritrocitos provenientes de la conjuntiva o de células propias de esta mucosa.¹⁷² Fuimos capaces de llevar a cabo esta precaución en forma satisfactoria en nuestro estudio.

El uso de fototerapia con laser argón surge como un tratamiento prometedor en la neovascularización corneal luego del implante de neopitelio limbar, reduciendo su aplicación el riesgo siempre de falla del injerto por invasión corneal de la neovascularización. Hubo una clara tendencia a la reducción de los neovasos durante el tiempo. Animales que recibieron varias

sesiones de esta terapéutica mantuvieron una cornea clara, lo que sugiere que el laser aplicado sobre los vasos esclero conjuntivales no causaría efecto deletéreo sobre la cornea.

Los resultados aquí expuestos facilitarían su desarrollo y aplicación de esta nueva terapéutica en pacientes.

TRASPLANTE HOMÓLOGO DE STEM CELLS DE CÓRNEA EN CONEJOS CON DSCL

Según nuestro conocimiento, este trabajo es el primer reporte del uso de plasma autólogo y calcio como soporte de laminas epiteliales homólogas. Esta metodología provee no solo una gran ventaja sobre lo comercialmente disponible hasta el momento, sino que también brinda una matriz más segura con respecto a la posibilidad de transmitir enfermedades o provocar inmunogenicidad. Las células epiteliales pudieron crecer de forma satisfactoria sobre los coágulos de PPP.

Las enfermedades o destrucción del limbo esclero corneal conlleva el ingreso de células derivadas de la conjuntiva, incluyendo las células caliciformes y los vasos sanguíneos. Estos derivados conjuntivales, al invadir un territorio avascular afectan en gran medida las propiedades ópticas de la córnea provocando el déficit visual e incluso la ceguera.¹⁷³ El privilegio inmunológico del ojo es conocido como el mecanismo por el cual la mayoría de los injertos ortópticos sobre éste son crónicamente aceptados.¹⁷⁴ Se cree que este privilegio inmunológico es adquirido y activamente mantenido por fuerzas de regulación inmunológica del globo ocular. Estas fuerzas incluyen la naturaleza avascular de la cornea y la presencia local en células epiteliales y endoteliales de la cornea de factores inhibitorios.¹⁷⁵ Ya que nosotros implantamos células homólogas de macho sobre un estroma y limbo denudados en hembras, se esperaba observar al menos mínimos signos de rechazo. Pero estos no fueron observados ni comprobados en ninguno de los animales implantados. El epitelio corneal fue encontrado como normal tanto clínica como inmunohistoquímicamente, evidenciando una reepitelización no patológica. No hubo signos de reacción inmunológica durante todo el seguimiento del POP luego del implante homologo, así como tampoco rechazo epitelial. Esta condición desfavorable observada en los injertos de cornea, tanto la línea epitelial o línea de Khodadoust y la epitelopatía corneal punteada difusa sumada a inflamación conjuntival difusa son levemente frecuentes en la queratoplastia laminar.¹⁷⁶

Una posible hipótesis para poder explicar la ausencia de este desafortunado desenlace es que el rechazo del injerto ocurra de manera crónica, dando tiempo a que el injerto recibido en estos animales actúe regenerando parte de la población de stem cells. Estas estimaciones son acordes a las observadas por Daya et al, quienes investigaron el desenlace de aloinjertos expandidos *ex vivo* en el tratamiento de DSCL en 10 pacientes. Ellos analizaron la sobrevivencia de las células donantes en 7 pacientes utilizando la técnica de PCR y pudieron comprobar la persistencia de las mismas en solo 2 pacientes durante los 9 primeros meses POP, no más allá de

esta fecha.¹⁷⁷ La metodología utilizada por nosotros para detectar el DNA donante tiene limitaciones inherentes a la sensibilidad pero no a la especificidad, significa que la presencia del cromosoma Y indudablemente indica que las células donantes están presentes en la cornea receptora XX, como así también significa que no se puede determinar conclusión alguna ante la ausencia del cromosoma Y. Más aún, el porcentaje de las metafases XY determinado en cada muestra depende de la capacidad de proliferación de las células en cultivo y del procedimiento de aislamiento y que este porcentaje no tiene relación con el porcentaje de células XY presentes en el epitelio. Paralelamente, un resultado negativo no prueba la ausencia de células donantes en la biopsia. Nosotros consideramos de gran importancia el hecho de encontrar células donantes que estén formando parte del epitelio de las corneas tratadas durante los 12 meses del postoperatorio, especialmente cuando la biopsia fue obtenida de la periferia de la cornea donde la posibilidad de obtener células autólogas es aun mayor que en el centro. Esta consideración es debido a que esas células donantes expandidas *in vitro* tuvieron que mantener un estado prolongado de indiferenciación para mantenerse viables en la periferia del tejido durante tanto tiempo, un estado indiferenciado de por lo menos 12 meses. Demostrando la persistencia y aceptación de un injerto con genotipo XY sobre un lecho receptor XX avala en forma intensa el éxito de la estrategia terapéutica. Más aun, estos injertos alogénicos podrían ser potenciales vehículos para ser utilizadas en terapia génica en algunas distrofias epiteliales de la cornea con origen genético como lo es la distrofia de Meesmann.¹⁷⁸

La neovascularización corneal lleva a una pérdida de la visión y habitualmente es una consecuencia devastadora y difícil de manejar. Los neovasos recientemente formados elevan el riesgo del subsecuente rechazo del implante corneal luego de la cirugía.¹⁷⁹ Terapias medicas o quirúrgicas usadas para reducir estos neovasos incluyen corticoesteroides, agentes anti inflamatorios no esteroideos, fotocoagulación con laser, diatermia focal y recientemente el uso del drogas antiangiogénicas como el bevacizumab.^{180 181} Muchas de estas terapéuticas no solo demostraron limitado éxito sino que también se asociaron a devastadores efectos secundarios. Como es visto en nuestros pacientes, una vez que el rechazo del injerto se impone, se debe establecer un nuevo tratamiento del individuo con una segunda queratoplastia e injerto de limbo con el fin de recuperar la superficie ocular. En nuestro estudio, la neovascularización corneal con resolución espontánea solo sucedió en el grupo tratado. Obtenido este resultado favorable,, nosotros remarcamos la utilidad de los implantes de neoepitelio corneal homólogo en el mantenimiento de la integridad y salud de la cornea.

En general, un desarrollo favorable - definido como cornea clara – pudo ser detectado a los 30 días del POP en todos los casos. En el grupo tratado la transparencia permaneció sin

cambios durante todo el seguimiento de un año. Células claras no mucosecretantes fueron halladas en la base del epitelio corneal de los animales implantados, de la misma forma que se ven en las corneas humanas implantadas. Probablemente esto sea resultado de la constante reepitelización y estas células representen en cierta forma a las células de amplificación transitoria. Por el contrario, en los grupos control, la neovascularización, las irregularidades de la superficie y la opacidad corneal comenzaron a ser visibles a partir de las 3 semanas del POP y se mantuvieron presentes hasta el final del protocolo. Basándonos en estos resultados, nosotros creemos que la persistencia del tejido implantado y la restauración del limbo receptor actuarían en conjunto evitando la invasión corneal por la conjuntiva y la consecuente neovascularización de este tejido avascular como es la cornea.

Las queratinas 19 y 3/12 fueron elegidas meramente para comparar la expresión en los epitelios de los grupos tratados, control y corneas sanas. Hasta el presente no hay datos consistentes que se relacionen con el éxito clínico de un ojo tratado y un patrón de expresión de queratinas determinado. En la caracterización de las SC de cornea es necesario identificar la presencia de características morfológicas de las células y varios marcadores en combinación con la ausencia de marcadores de diferenciación celular específicos. De todas formas, un modo certero para identificar las SC del limbo es aún incierto.¹⁸²

Los resultados arriba presentados y obtenidos en el análisis por inmunofluorescencia sugieren que el neopitelio cultivado a partir de SC del limbo sería una estrategia útil para el tratamiento del DSCL, capaz de devolver a la superficie ocular un microambiente saludable y asegurar un fenotipo epitelial sano.

En conclusión, el aloinjerto de epitelio corneal fue capaz de recuperar y mantener la normalidad de la superficie ocular sin signos de rechazo inmunológico. La técnica por nosotros reportada parecería ser un procedimiento prometedor en el tratamiento del DSCL bilateral y constituye así un paso importante en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para nuestros pacientes. El acceso a corneas de banco es dificultoso y tiene un costo muchas veces imposible de afrontar por lo que pacientes con DSCL bilateral podrían beneficiarse al recibir implantes de neopitelio corneal a partir de SC de limbo homólogo cultivado sobre PPP como soporte celular.

PREPARACIÓN DEL PLASMA RICO Y POBRE EN PLAQUETAS

Desarrollamos una nueva metodología en la obtención del PRP en conejos que fue utilizado satisfactoriamente en el trasplante de cornea no perforante. Un estudio comparativo de la distinta metodología en la preparación del PRP se muestra en la Tabla 9

| COMPARACIÓN DE MÉTODOS UTILIZADOS EN LA PREPARACIÓN DEL PRP | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---------|----|----|----------------|----|------|----------------------|-----------|------|-----|------------------------|-------|-----|-------------------------|---------------------|
| AUTORES / PARÁMETROS | CONEJOS | | | MUESTRA SANGRE | | AC | CENTRIFUGACIÓN (RPM) | | H TO | PRP | CONTEO PLAQUETAS X MIL | | FE | TIPO DE ACTIVACIÓN | TEST DE ADHESIVIDAD |
| | T | H | M | S | ML | TIPO | 1RA | 2DA | % | ML | V | PRP | % | | |
| EFOGLU ET AL | 23 | 13 | 10 | V | 11 | EDTA | 3000 /10' | 4000 /5' | NE | NE | 555 | 3.134 | 465 | No Hecho | No Hecho |
| BUTTERFIE LD ET AL | 12 | 0 | 12 | A | 21 | ACD | 2100 /20' | 3500 /10' | NE | 1 | 468 | 2.061 | 340 | Ca ₂ Cl + TB | |
| HOKUGO ET AL | 15 | NE | NE | NE | 10 | ACD | 2400 /10' | 3600 /10' | NE | 0,8 | 200 | 1.200 | 500 | Fib + TB | |
| OHYA ET AL | 18 | 18 | 0 | NE | 30 | NS | 2500 /5' | 5000 /5' | NE | 3 | 227 | 864 | 281 | Ca ₂ Cl + TB | |
| JUNG ET AL | 16 | NE | NE | NE | 9 | ACD | 2100 /20' | 2800 /20' | NE | 0,5 | NE | NE | NE | Ca ₂ Cl + TB | |
| LUENGO ET AL | 40 | 18 | 22 | C | 10 | ACD | 1300 /15' | 2600 /5' | 41 | 1 | 320 | 807 | 152 | Ca ₂ Cl | Hecho |

Tabla 9: Comparación de métodos utilizados para la preparación de PRP en conejos entre distintos autores. AC (anticoagulante), Hto (hematocrito), PRP (plasma rico en plaquetas), FE (factor de enriquecimiento plaquetario), T (total), H (hembras), M (machos), S (sangre), NE (no expresado), V (vena), A (arteria), C (corazón), Fib (fibrinógeno), TB (trombina bovina).

Los problemas de coagulación sanguínea son aparentemente más frecuentes en los conejos hembras que en los machos.¹³⁶ Esta observación podría influenciar en la obtención del PRP en los conejos. De todas maneras, estas diferencias no parecen ser relevantes en los seres humanos.¹⁸³

Es de notar que la muestra de sangre obtenida en nuestro protocolo tuvo que ser tomada intracardiamente ya que no fuimos capaces de evitar la coagulación de la misma utilizando distintos puntos de venopuntura, como lo son la vena auricular o femoral. Esto por la dificultad de extraer más de 10 ml de sangre de una vena periférica. Es importante conseguir el

balance entre la sobrevida del animal y la cantidad de sangre a extraer, ya que estos animales presentan una volemia acorde a su peso, menor a la de un neonato.

Existe una gran variación en la intensidad y duración de la centrifugación utilizada en distintos estudios. El recuento de plaquetas ideal también difiere entre los investigadores. La aparatología y el software jugarían un papel importante, ya que las plaquetas de los conejos son menores en tamaño comparadas a la de los humanos.¹¹⁹ Los conejos requieren de un software específico que se adapte a sus características. Es por esto que nosotros preferimos realizar el conteo plaquetario por observación directa. Nosotros creemos, que haciendo el conteo manual, llegaríamos a un conteo de plaquetas más acertado que utilizando el software convencional para nuestros pacientes. A pesar de que algunos científicos han acordado que la mejor concentración para lograr un PRP útilmente adhesivo es de 1 millón de plaquetas/dl, nosotros hemos testeado la adhesividad del mismo y esta fue eficaz en tejidos blandos utilizando un PRP que tenga al menos un Factor de Enriquecimiento Plaquetario de 152%.

Otros adhesivos tisulares también se han utilizado en queratoplastia laminar en conejos y en pacientes^{184 185} como así también nuevos pegamentos sintéticos como el biodendrímico¹⁸⁶ o el adhesivo activado por luz (Light Activated Adhesive).¹⁸⁷ La mayoría de ellos tienen grandes similitudes en su funcionalidad aunque difieran en su origen o sus componentes. La mayor diferencia del PRP con respecto a estos productos comerciales es que éstos no son autólogos.⁹⁴ El PRP, por definición, siempre es autólogo y hoy se lo considera como tal, a pesar de que publicaciones del pasado han activado el PRP con trombina bovina.^{138 188 189 190} En nuestra investigación, una sustancia química como el Ca_2Cl al 5% fue efectiva en la activación del PRP, es decir, en su coagulación. Esto evita el uso de componentes sanguíneos homólogos, capaces de producir reacciones inmunológicas y, consecuentemente, producir un resultado negativo que podría ser falsamente adjudicado al PRP.

La concentración de Ca_2Cl también debe ser la indicada, ya que mayores o menores valores a los descriptos logran que esta muestra no se active y convertirse en una muestra a descartar.

Distintas variables deben ser consideradas y monitorizadas en la preparación del PRP. Especial atención se debe dar tanto en el instrumental utilizado para la extracción de sangre, como en la maquinaria aplicada en la centrifugación y obtención del PRP. El proceso de separación de las plaquetas de los glóbulos rojos y blancos debe ser realizado bajo extremas medidas de esterilidad y cuidando que la centrifuga esté correctamente calibrada, ya que de otra forma el PRP obtenido sería con plaquetas dañadas y éstas no serán capaces de liberar las

citoquinas con las cuales logra su efectividad y que diferencia a este bioadhesivo de los otros. La falla del PRP descrita en estudios previos podría ser resultado de que los autores no se hayan adherido a estas recomendaciones.¹³⁷

El PRP, un gran adhesivo tisular, tiene distintas aplicaciones en medicina.¹¹⁸ Fue incluso utilizado como transportador de moléculas farmacológicas, como agentes antiangiogénicos o factores de crecimiento enriquecidos.^{191 192} Parte de la terapia génica se podría beneficiar del PRP en futuras investigaciones, ya que por ejemplo la presencia de vectores adenovirales en el PRP activado no afecta sus propiedades.¹⁹³ Es incluso importante mencionar el uso reciente del PRP como bioadhesivo en cirugías de queratoplastia laminar a partir de un neopitelio corneal cultivado de SC limbares, como previamente lo hemos demostrado.¹⁹⁴

En nuestro estudio experimental en conejos, el PRP es un adhesivo capaz de adherir la lámina corneal en una queratoplastia laminar. El flap corneal con un grosor aproximadamente de un tercio del grosor corneal, se mantuvo adherido durante 3 meses luego de la cirugía.

Si bien nuestro estudio sobre PRP señala algunas dificultades que aún deben ser superadas, la metodología descrita podría servir como guía en la preparación de PRP en conejos y de este modo facilitar el desarrollo de investigaciones sobre trasplante experimental en conejos en líneas de investigación.

QUERATOPLASTIA LAMINAR UTILIZANDO PLASMA RICO EN PLAQUETAS COMO BIOADHESIVO VS. SUTURAS

Los hallazgos clínicos e histológicos muestran la correcta adhesividad del flap corneal en todos los animales tratados. El PRP fue debidamente tolerado por el tejido corneal. No hubo signos de toxicidad. La cicatrización de la herida corneal evolucionó satisfactoriamente en el grupo que se utilizó PRP como adhesivo y en el grupo con suturas se evidenció la evolución normal esperada. La claridad corneal y la falta de inflamación fueron una característica de todos los animales estudiados a 90 días del POP.

El PRP es una sustancia autóloga con un gran número de plaquetas y todos sus componentes de liberación concentradas en un pequeño volumen de plasma que contribuyen a la adhesividad tisular y su cicatrización.¹¹⁵ Más aún, al ser el PRP una sustancia propia de cada individuo, éste es fácilmente asimilado por el sistema inmunológico sin causar su rechazo.

Es importante reconocer cómo ocurre la degradación del PRP en el tejido corneal. Una opacidad manifiesta, resultado de la agregación plaquetaria y la coagulación de sus componentes, estuvo presente durante los dos primeros días del postoperatorio. A partir del tercer día la opacidad comenzó a disminuir llegando a desaparecer a la semana. Esta tendencia continuó y una cornea clara cristal fue documentada en las observaciones posteriores. Los hallazgos histológicos se correlacionaron con la apariencia clínica. Luego de los primeros 30 días, la interfase estroma-corneal fue hallada libre de plaquetas, como lo hemos documentada por microscopía electrónica.

El proceso de apoptosis de los miofibroblastos es considerado un factor clave par lograr la correcta cicatrización de la herida.¹⁹⁵ Este proceso juega también un rol clave destacado en el desarrollo de la transparencia corneal.¹⁹⁶ En nuestro estudio el hecho de que el conteo de miofibroblastos a los 3 meses del POP sea similar al hallado en corneas normales, no así el número mayor encontrado en la corneas con suturas, sugieren que el PRP no interfiere con el proceso de apoptosis celular normal en una cicatrización tisular. Estudios de mayor profundidad serán requeridos para confirmar esta observación.

Los tejidos alogénicos implantados en la cornea causarían reacciones inmunológicas.¹⁹⁷ Realizando el implante del botón corneal propio del conejo adherido con su propio PRP descartamos la posibilidad de que exista el rechazo del huésped vs implante. Reacción que influenciaría en los resultados de la interacción del PRP con el tejido corneal.

Algunos reportes sostienen que el PRP podría prevenir infecciones de la herida quirúrgica debida a la presencia de plaquetas y algunos glóbulos blancos, así como también a facilitar una mayor rapidez del proceso de cicatrización.^{107 198} Esto ayudaría a evitar posibles infecciones en la queratoplastia laminar. Algunos de los elementos presentes en el PRP fueron reportados como pro angiogénicos, sin embargo no hubo signos de neovascularización en los implantes con PRP.¹¹⁵

La fuerza de la adhesividad del PRP fue reportada como satisfactoria en investigaciones quirúrgicas no oftalmológicas.^{118 119 124 126 127} En nuestro estudio, los resultados satisfactorios tanto clínicos como histológicos e inmunohistoquímicos constituyen signos de una correcta adhesividad del PRP utilizado en la queratoplastia laminar en conejos. Sin embargo, en nuestro estudio no utilizamos un modelo cuantitativo con medidas objetivas. La fuerza del implante fue subjetivamente cuantificada. De todas maneras, estamos de acuerdo en la importancia de medir el poder adhesivo del PRP de manera objetiva. Esta tarea queda pendiente para nuestras futuras investigaciones.

En la actualidad, los flaps del LASIK (laser-assisted in situ keratomileusis) son liberados sobre el estroma corneal sin la necesidad de suturarlos. Estos se adhieren luego de algunas horas. En nuestro estudio, los flaps son de una profundidad considerablemente mayor ya que se realizan con un tercio del estroma corneal en comparación con un quinto del mismo obtenido en los flaps del LASIK. Esto justificaría el hecho de que los flaps corneales se desprendieron en todos los conejos que no recibieron bioadhesivos o suturas. Sin embargo, la mayor diferencia entre los flaps del LASIK y los realizados por nosotros es el hecho de que los primeros poseen una bisagra del mismo tejido, que no existe en los flaps libres. Más aún, podría haber una diferencia en el comportamiento de la cicatrización entre los humanos y los conejos que juegue un rol en los resultados obtenidos.

En síntesis, el PRP es una sustancia autóloga, económica, fácilmente maniobrable con propiedades adhesivas y pro cicatrizantes que es muy bien tolerado por la cornea de los animales en estudio, como previamente fue concluido en el capítulo anterior o en la bibliografía publicada.¹³⁴ El PRP podría ser incluso útil en la cirugía de pterigion y en cirugías recientes de mayor complejidad como lo son las queratoplastias con el laser Femtosegundo. Nuevos estudios están siendo llevados a cabo en nuestro laboratorio para determinar estas nuevas aplicaciones.

ESTUDIO PRE CLÍNICO DE TRASPLANTE DE EPITELIO CORNEAL A PARTIR DE STEM CELLS AUTÓLOGAS MONTADAS SOBRE PLASMA POBRE EN PLAQUETAS EN CONEJOS CON DSCL

El modelo de análisis estadístico utilizado es específico para poder realizar un análisis lineal con efectos mixtos, tanto fijos y aleatorios como los observados en nuestro protocolo. El modelo estadístico fue publicado recientemente en una revista científica de su especialidad. Su elección para ser utilizado en nuestro estudio consideramos que es efectiva teniendo en cuenta la existencia de dos grupos de animales (tratados y controles), con distintos grados de evolución, de porcentaje de isquemia limbar, con diferentes resultados clínicos e histopatológicos, y que, siguiendo el diseño del protocolo, fueron sacrificados en plazos de tiempos diferentes. Su aplicación sirvió para demostrar la eficacia terapéutica de la técnica utilizada.

Sumado a lo mencionado anteriormente, creemos haber podido demostrar que los resultados favorables solo dependen del trasplante realizado y no del tiempo transcurrido o del grado de la lesión inicial. Consideramos el implante de SC autólogas cultivadas sobre PPP como una opción efectiva a tener en cuenta en el manejo del DSCL secundario a una lesión por álcalis.

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Leibowitz HM, Waring GO. Corneal disorders: clinical diagnosis and management. WB Saunders, 2nd Edition, Philadelphia 1998; 9.
- ² Maurice DM. The cornea and sclera. Vegetative physiology and biochemistry. Academic Press, New York, 1984;1.
- ³ Ubels JL, MacRae SM. Vitamin A is present as retinol in the tears of humans and rabbits. *Curr Eye Res* 1984;3:815.
- ⁴ Kaufman HE, Barron BA, McDonald MB. The cornea. Churchill Livingstone, New York 1988;3.
- ⁵ Duane TD, Jaeger EA. Cornea and sclera. Foundations of clinical ophthalmology, vol 2. Hagerstown, Harper and Row 1982;1-26.
- ⁶ Lavker RM, Dong G, Chen SZ. Relative proliferative rates of limbal and corneal epithelia: implications of corneal epithelial migration, circadian rhythm, and suprabasally located DNA-synthesizing keratinocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:1864.
- ⁷ Sunder Raj N, Geiss MJI, Fantes F. Healing of excimer laser ablated monkey corneas: an immunohistochemical evaluation. *Arch Ophthalmol* 1990;108:1604.
- ⁸ Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell JE. Histology of the human eye. WB Saunders, Philadelphia 1971;1-687.
- ⁹ Townsend WM. The limbal palisades of Vogt. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1991;89:721-56.
- ¹⁰ Dua HS. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv Ophtalmol* 2000;44:415-25.
- ¹¹ Pellegrini G, Golisano O, Paterna P, et al. Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *J Cell Biol* 1999;145:769-82.
- ¹² Wolosin JM. Cell markers and the side population phenotype in ocular surface epithelial stem cell characterization and isolation. *Ocul Surf* 2006;4:10-23.
- ¹³ Sun TT, Lavker RM. Corneal epithelial stem cells: past, present, and future. *J Investig Dermatol Sym Proc* 2004; 9:202-7.
- ¹⁴ Potten CS. Cell replacement in epidermis (keratopoiesis) via discrete units of proliferation. *Int Rev Cytol* 1981;69:271-318.
- ¹⁵ Lavker RM. Epidermal stem cells: properties, markers and location. *Proc Nat Acad Sci USA* 2000;97;13473-5.
- ¹⁶ Ang LP, Tan DT. Ocular surface stem cells and disease: current concepts and clinical applications. *Ann Acad Med Singapore* 2004;33:576-80.
- ¹⁷ Reinhard T, Spelsberg H, Henke L, et al. Long-term results of allogeneic penetrating limbo-keratoplasty in total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 2004;111:775-82.
- ¹⁸ Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 2000;343:86-93.
- ¹⁹ Ramaesh K, Dhillon B. Ex vivo expansion of corneal limbal epithelial/stem cells for corneal surface reconstruction. *Eur J Ophthalmol* 2003; 13:515-24.
- ²⁰ Fernandes M, Sangwan VS, Rao SK, et al. Limbal stem cell transplantation. *Indian J Ophthalmol* 2004; 52:5-22.
- ²¹ Schwab I, Reyes M, Isseroff R. Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease. *Cornea* 2000;19:421-6.

-
- ²² Inatomi T, Nakamura T, Kojoyo M, et al. Ocular surface reconstruction with combination of cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation and penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 2006;142:757-64.
- ²³ Dua HS, Azuara-Blanco A. Autologous limbal transplantation in patients with unilateral corneal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol* 2000;84:273-8.
- ²⁴ Dua HS, Joseph A, Shanmuganathan VA, Jones RE. Stem cell differentiation and the effects of deficiency. *Eye* 2003;17:877-85.
- ²⁵ Kenyon KR, Bukusoglu G, Yankanchas MA. Characterization of a potential marker of corneal epithelial stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:143.
- ²⁶ Tsai RJ, Li LM, Chen JK: Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 2000;343:86–93.
- ²⁷ Tsubota K. Corneal epithelial stem-cell transplantation. *Lancet* 1997;349:1556.
- ²⁸ Brodovsky SC, McCarty CA, Snibson G. Management of alkali burns: an 11-year retrospective review. *Ophthalmology* 2000;107:1829-35.
- ²⁹ Dua HS, King AJ, Joseph A. A new classification of ocular surface burns. *Br J Ophthalmol* 2001;85:1379-83.
- ³⁰ Garg P, Krishna PV, Stratis AK, Gopinathan U. The value of corneal transplantation in reducing blindness. *Eye* 2005;19:1106-14.
- ³¹ Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Prevention of corneal ulceration in the developing world. *Int Ophthalmol Clin* 2002;42:71-7.
- ³² Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Health Organ* 2001;79:214-21.
- ³³ Lee P, Wang CC, Adamis AP. Ocular neovascularization: an epidemiologic review. *Surv Ophthalmol* 1998;43:245-69.
- ³⁴ Bagley DM, Casterton PL, Dressler WE, et al. Proposed new classification scheme for chemical injury to the human eye. *Regul Toxicol Pharmacol* 2006;45:206-13.
- ³⁵ Schwab IR, Reyes M, Isseroff RR. Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease. *Cornea* 2000;19:421-46.
- ³⁶ Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 2000;343:86-93.
- ³⁷ Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, et al. *Ophthalmology* 2001;108:1569-74.
- ³⁸ Rama P, Bonini S, Lambiase A. Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation* 2001;72:1478-85.
- ³⁹ Higa K, Shimmura S, Kato N. Proliferation and differentiation of transplantable rabbit epithelial sheets engineered with or without an amniotic membrane carrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:597-604.
- ⁴⁰ Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, et al. Transplantation of autologous serum-derived cultivated corneal epithelial equivalents for the treatment of severe ocular surface disease. *Ophthalmology* 2006;113:1765-72.
- ⁴¹ Luengo Gimeno F, Gatto S, Ferro J, et al. Preparation of platelet-rich plasma as a tissue adhesive for experimental transplantation in rabbits. *Thromb J* 2006;4:18.
- ⁴² Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, et al. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2001;108:1569-74.

-
- ⁴³ Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, et al. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 1997;349:990-3.
- ⁴⁴ Nakamura T, Endo K, Cooper LJ, et al. The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:106-16.
- ⁴⁵ Talbot M, Carrier P, Giasson CJ, et al. Autologous transplantation of rabbit limbal epithelia cultured on fibrin gels for ocular surface reconstruction. *Mol Vis* 2006;12:65-75.
- ⁴⁶ Shortt A, Secker G, Notara M et al. Transplantation of ex Vivo cultured limbal epithelial stem cells: A Review of Techniques and Clinical Results. *Surv Ophthalmol* 2007;52:483-502.
- ⁴⁷ Cooper, LJ, Fullwood NJ, Koizumi N, et al. An investigation of removed cultivated epithelial transplants in patients after allocultivated corneal epithelial transplantation. *Cornea* 2004;23:235-42.
- ⁴⁸ Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, et al. Successful primary culture and autologous transplantation of corneal limbal epithelial cells from minimal biopsy for unilateral severe ocular surface disease. *Acta Ophthalmol Scand* 2004;82:468-71.
- ⁴⁹ Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, et al. Cultivated corneal epithelial transplantation for ocular surface reconstruction in acute phase of Stevens-Johnson syndrome. *Arch Ophthalmol* 2001;119:298-300.
- ⁵⁰ Nakamura T, Koizumi N, Tsuzuki M, et al. Successful regrafting of cultivated corneal epithelium using amniotic membrane as a carrier in severe ocular surface disease. *Cornea* 2003;22:70-1.
- ⁵¹ Sangwan VS, Matalia HP, Vemuganti GK et al. 2006. Clinical outcome of autologous cultivated limbal epithelial transplantation. *Indian J. Ophthalmol.* 54:29-34.
- ⁵² Kawakita T, Kawashima M, Satake Y, et al.. Achievements and future problems with component surgery of the cornea. *Cornea* 2007;26:S59-64.
- ⁵³ Rama P, Bonini S, Lambiase A, et al. Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation* 2001;72:1478-85.
- ⁵⁴ Shimazaki J, Aiba M, Goto E, et al. Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2002;109:1285-90.
- ⁵⁵ Gomes JA, dos Santos MS, Cunha MC, et al. Amniotic membrane transplantation for partial and total limbal stem cell deficiency secondary to chemical burn. *Ophthalmology* 2003;110:466-473.
- ⁵⁶ Chang JH, Gabison EE, Kato T, Azar DT. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol* 2001;12:242-9.
- ⁵⁷ Luengo Gimeno F, Lavigne V, Gatto S, et al. Advances in corneal stem-cell transplantation in rabbits with severe ocular alkali burns. *J Cataract Refract Surg* 2007;33:1958-65.
- ⁵⁸ Higa K, Shimmura S, Kato N, et al. Proliferation and differentiation of transplantable rabbit epithelial sheets engineered with or without an amniotic membrane carrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:597-604.
- ⁵⁹ Pellegrini G, De Luca M, Arsenijevic Y. Towards therapeutic application of ocular stem cells. *Semin Cell Dev Biol* 2007;18:805-18.
- ⁶⁰ Limb GA, Daniels JT. Ocular regeneration by stem cells: present status and future prospects. *Br Med Bull* 2008;85:47-61.

-
- ⁶¹ Kruse FE, Chen JJ, Tsai RJ, Tseng SC. Conjunctival transdifferentiation is due to the incomplete removal of limbal basal epithelium. *Invest Ophthalmol* 1990;31:1903-13
- ⁶² Puangsricharern V, Tseng SC. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 1995;102:1476-85.
- ⁶³ Brodovsky SC, McCarty CA, Loughnan M, et al. Management of alkali burns. An 11-year retrospective review. *Ophthalmology* 2000;107:1829-35.
- ⁶⁴ Sun TT, Lavkerw RM. Corneal epithelial stem cells: past, present and future. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2004;9:202-7.
- ⁶⁵ Vemuganti GK, Kashyap S, Sangwan VS, et al. Ex-vivo potential of cadaveric and fresh limbal tissues to regenerate cultured epithelium. *Indian J Ophthalmol* 2004;52:113-20.
- ⁶⁶ James SE, Rowe A, Ilari L, et al. The potential for eye bank limbal rings to generate cultured corneal epithelial allografts. *Cornea* 2001;20:488-94.
- ⁶⁷ Schwab IR, Reyes M, Isseroff RR. Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease. *Cornea* 2000;19:421-6.
- ⁶⁸ Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 2000;343:86-93.
- ⁶⁹ Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T et al. *Ophthalmology* 2001;108:1569-74.
- ⁷⁰ Rama P, Bonini S, Lambiase A. Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation* 2001;72:1478-85
- ⁷¹ Higa K, Shimmura S, Kato N. Proliferation and differentiation of transplantable rabbit epithelial sheets engineered with or without an amniotic membrane carrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:597-604.
- ⁷² Cursiefen C, Chen L, Dana MR. Corneal lymphangiogenesis: evidence, mechanisms and implications for transplant immunology. *Cornea* 2003;22:273-1
- ⁷³ Streilein JW. *Immune responses and the eye*. Karger, New York 1999;17.
- ⁷⁴ Cursiefen C, Seitz B, Dana MR. Angiogenesis and lymphangiogenesis in the cornea: pathogenesis, clinic and treatment. *Ophthalmologie* 2003;100:292-9.
- ⁷⁵ Pillai CT, Dua HS, Hossain P. Fine needle diathermy occlusion of corneal vessels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2148-53
- ⁷⁶ Kim SW, Ha BJ, Kim EK, Tchah H, Kim TI. The effect of topical bevacizumab on corneal neovascularization. *Ophthalmology*. 2008;115:33-8.
- ⁷⁷ Krasnick NM, Spigelman AV. Comparison of yellow dye, continuous wave Nd:YAG, and argon green laser on experimentally induced corneal neovascularization. *J Refract Surg* 1995;11:45-9.
- ⁷⁸ Lim KJ, Wee WR, Lee JH. Treatment of corneal neovascularization with argon laser. *Korean J Ophthalmol* 1993;7:25-7.
- ⁷⁹ Mosesson MW. Fibrin polymerization and its regulatory role in hemostasis. *Jbab Clin Med* 1990;116:8-17.
- ⁸⁰ Vinazzer H. Fibrin sealing: physiologic and biochemical background. *Facial Plast Surg* 1985;2:291-5.
- ⁸¹ Silver FH, Wang MC, Pins GD. Preparation and use of fibrin glue in surgery. *Biomaterials* 1995;16:891-903.
- ⁸² Staindl O, Galvan G, Macher M. The influence of fibrin stabilization and fibrinolysis on fibrin-adhesive system. *Arch OtorbinoJaryngol* 1981;233:105-16.

- ⁸³ Collen A, Koolwijk P, Kroon M, van Hinsbergh VW. Influence of fibrin structure on the formation and maintenance of capillarylike tubules by human microvascular endothelial cells. *Angiogenesis* 1998;2:153-65.
- ⁸⁴ Saltz R, Sierra D, Feldman D, Saltz MB, Dimick A, Vasconez LO. Experimental and clinical applications of fibrin glue. *Plast Reconstr Surg* 1991;88:1005-15, discussion 1016-7.
- ⁸⁵ Matras H. Die Wirkungen vershiedener fibrinpreparate auf kontinuierat-strennungen der rattenhaut. *Osterr Z Stomatol* 1970;67:338-59.
- ⁸⁶ Gibble JW, Ness PM. Fibrin glue: the perfect operative sealant? *Transfusion* 1990;30:741-7.
- ⁸⁷ Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101:37-44.
- ⁸⁸ Sierra DH. Fibrin sealant adhesive system: a review of the chemistry, material properties and clinical applications. *J Biomater Appl* 1993; 7: 309-52.
- ⁸⁹ Clark RA. Fibrin and wound healing. *Ann N Y Acad Sci* 2001;936:355-67.
- ⁹⁰ Jorgensen PH, Jensen KH, Andreassen TT. Mechanical strength of rat skin incisional wounds treated with fibrin sealant. *J Surg Res* 1987;42:237-41.
- ⁹¹ Jabs AD Jr, Wider TM, DeBellis J, Hugo NE. The effect of fibrin glue on skin grafts in infected sites. *Plast Reconstr Surg* 1992;69:268-71.
- ⁹² Tayapongsak P, O'Brien DA, Monteiro CB, Arceo-Diaz LY. Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *J Oral Maxillofac Surg* 1994;52:161-5, discussion 166.
- ⁹³ Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:638-46.
- ⁹⁴ Marx RE. Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support Its Use. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:489-96.
- ⁹⁵ Liu Y, Kalen A, Risto O, Wahlstrom O. Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate in vitro is pH dependent. *Wound Repair Regen* 2002;10:336-40.
- ⁹⁶ Dijkstra-Tiekstra MJ, Van der Schoot CE, Pietersz RN, Reesink HW. White blood cell fragments in platelet concentrates prepared by the platelet-rich plasma or buffy-coat methods. *Vox Sang* 2005;88:275-7.
- ⁹⁷ Radosevich M, Goubran HI, Burnouf T. Fibrin sealant: scientific rationale, production methods, properties, and current clinical use. *Vox Sang* 1997;72:133-43.
- ⁹⁸ Matras H: Fibrin seal: the state of the art. *J Oral Maxillofac Surg* 1985;43:605-11.
- ⁹⁹ Dvorak HF, Harvey VS, Estrella P, Brown LF, McDonagh J, Dvorak AM: Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Vox Sang* 1987;57:673-86.
- ¹⁰⁰ Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:638-46.
- ¹⁰¹ Soffer E, Ouhayoun JP, Anagnostou F. Fibrin sealants and platelet preparations in bone and periodontal healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;95:521-8.
- ¹⁰² Dohan D, Donsimoni JM, Navarro G, Gaultier F. Platelet concentrates. Part 1:Technologies. *Implantodontie* 2003;12:5-16.

-
- ¹⁰³ Dohan D, Donsimoni JM, Navarro G, Gaultier F. Platelet concentrates. Part 2: Associated biology. *Implantodontie* 2003;12:17-25.
- ¹⁰⁴ Gaultier F, Navarro G, Donsimoni JM, Dohan D. Platelet concentrates. Part 3: Clinical applications. *Implantodontie* 2004;13:3-11.
- ¹⁰⁵ Simonpieri A, Choukroun J, Girard MO, Ouaknine T, Dohan D. Immediate post-extraction implantation: interest of the PRF. *Implantodontie* 2004;13:177-89.
- ¹⁰⁶ Giannobile WV. Periodontal tissue engineering by growth factors. *Bone* 1996;19:23S-37S.
- ¹⁰⁷ Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2004;114:1502-8.
- ¹⁰⁸ Schilephake H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002;31:469-84.
- ¹⁰⁹ Giannobile WV, Hernandez RA, Finkelman RD, Ryan S, Kiritsy CP, D'Andrea M, Lynch SE. Comparative effects of platelet derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-I, individually and in combination, on periodontal regeneration in *Macaca fascicularis*. *J Periodontal Res* 1996;31:301-12.
- ¹¹⁰ Rosenkranz S, Kazlauskas A. Evidence for distinct signaling properties and biological responses induced by the PDGF receptor alpha and beta subtypes. *Growth Factors* 1999;16:201-16.
- ¹¹¹ Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D, Sangiorgi L, Cenacchi A, Del Vento AM, et al. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials* 2003;24:3095-100.
- ¹¹² Yu J, Ustach C, Kim HR. Platelet-derived growth factor signaling and human cancer. *J Biochem Mol Biol* 2003;36:49-59.
- ¹¹³ Winkler R, Pasleau F, Boussif N, Hodzic D. The IGF system: summary and recent data. *Rev Med Liege* 2000;55:725-39.
- ¹¹⁴ Butt AJ, Firth SM, Baxter RC. The IGF axis and programmed cell death. *Immunol Cell Biol* 1999;77:256-62.
- ¹¹⁵ El-Sharkawy H, Kantarci A, Deady J, Hasturk H, Liu H, Alshahat M, Van Dyke TE. Platelet-rich plasma: growth factors and pro- and anti-inflammatory properties. *J Periodontol* 2007;78:661-9.
- ¹¹⁶ Hartwig D, Harloff S, Liu L, Schlenke P, Wedel T, Geerling G. Epitheliotropic capacity of a growth factor preparation produced from platelet concentrates on corneal epithelial cells: a potential agent for the treatment of ocular surface defects? *Transfusion* 2004;44:1724-31.
- ¹¹⁷ Clark RA. Fibrin and wound healing. *Ann N Y Acad Sci* 2001;936:355-67.
- ¹¹⁸ Carlson NE, Roach RB Jr. Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. *J Am Dent Assoc* 2002;133:1383-6.
- ¹¹⁹ Grageda E. Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol. *Implant Dent* 2004;13:301-9.
- ¹²⁰ Okuda K, Tai H, Tanabe K, Suzuki H, Sato T, Kawase T, Saito Y, Wolff LF, Yoshiex H. Platelet-rich plasma combined with a porous hydroxyapatite graft for the treatment of intrabony periodontal defects in humans: a comparative controlled clinical study. *J Periodontol* 2005;76:890-8.
- ¹²¹ Oyama T, Nishimoto S, Tsugawa T, Shimizu F. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:555-8.

-
- ¹²² Sammartino G, Tia M, Marenzi G, di Lauro AE, D'Agostino E, Claudio PP. Use of autologous platelet-rich plasma (PRP) in periodontal defect treatment after extraction of impacted mandibular third molars. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;63:766-70.
- ¹²³ Grageda E. Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol. *Implant Dent* 2004;13:301-9.
- ¹²⁴ Man D, Plosker H, Winland-Brown JE. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg* 2001;107:229-37.
- ¹²⁵ Stuart JD, Kenney JG, Lettieri J, Spotnitz W, Baker J. Application of single-donor fibrin glue to burns. *J Burn Care Rehabil* 1988;9:619-22.
- ¹²⁶ Silberstein LE, Williams LJ, Hughlett MA, Magee DA, Weisman R. An autologous fibrinogen-based adhesive for use in otologic surgery. *Transfusion* 1988;28:319-21.
- ¹²⁷ Christenson JT, Kalangos A. Autologous fibrin glue reinforced by platelets in surgery of ascending aorta. *Thorac Cardiovasc Surg* 2004;52:225-9.
- ¹²⁸ Duchesne B, Tahi H, Galand A. Use of human fibrin glue and amniotic membrane transplant in corneal perforation. *Cornea* 2001;20:230-2.
- ¹²⁹ Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Nagasaka T. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clin Oral Implants Res* 2004;15:589-97.
- ¹³⁰ Choi BH, Zhu SJ, Kim BY, Huh JY, Lee SH, Jung JH. Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005;34:420-4.
- ¹³¹ Pierce GF, Mustoe TA, Altrock BW, Deuel TF, Thomason A. Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *J Cell Biochem* 1991;45:319-26.
- ¹³² Simon D, Maneul S, Geetha V, Naik BR. Potential for osseous regeneration of platelet-rich plasma - a comparative study in mandibular third molar sockets. *Indian J Dent Res* 2004;15:133-6.
- ¹³³ Alio JL, Colecha JR, Pastor S, Rodriguez A, Artola A. Symptomatic dry eye treatment with autologous platelet-rich plasma. *Ophthalmic Res* 2007 19;39:124-9.
- ¹³⁴ Alio JL, Abad M, Artola A, Rodriguez-Prats JL, Pastor S, Ruiz-Colecha J. Use of autologous platelet-rich plasma in the treatment of dormant corneal ulcers. *Ophthalmology* 2007;114:1286-93.
- ¹³⁵ Yazawa M, Ogata H, Nakajima T, Mori T, Watanabe N, Handa M. Basic studies on the clinical applications of platelet-rich plasma. *Cell Transplant* 2003;12:509-18.
- ¹³⁶ Efeoglu C, Akcay YD, Erturk S. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:1403-7.
- ¹³⁷ Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* 2004;34:665-71.
- ¹³⁸ Butterfield KJ, Bennett J, Gronowicz G, Adams D. Effect of platelet-rich plasma with autogenous bone graft for maxillary sinus augmentation in a rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;63:370-6.
- ¹³⁹ Terry MA. The evolution of lamellar grafting techniques over twenty-five years. *Cornea* 2000;19:611-6.
- ¹⁴⁰ Christo CG, van Rooij J, Geerards AJM. Suture-related complications following keratoplasty: a 5-year retrospective study. *Cornea* 2001;20:816-9.

-
- ¹⁴¹ Webster RG Jr, Slansky HH, Refojo MF, Boruchoff SA, Dohlman CH. The use of adhesive for the closure of corneal perforations. *Arch Ophthalmol* 1968;80:705-9.
- ¹⁴² Sharma A, Kaur R, Kumar S, Gupta P, Pandav S, Patnaik B, Gupta A. Fibrin glue versus N-Butyl-2-cyanoacrylate in corneal perforations. *Ophthalmology* 2003;110:291-8.
- ¹⁴³ Eiferman RA, Snyder JW. Antibacterial effect of cyanoacrylate glue. *Arch Ophthalmol* 1983;101:958-60.
- ¹⁴⁴ Spierer A, Barequet I, Rosner M. Reattachment of extraocular muscles using fibrin glue in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;38:543-6.
- ¹⁴⁵ Koranyi G, Seregard S, Kopp ED. Cut and paste: a no suture, small incision approach to pterygium surgery. *Br J Ophthalmol* 2004;88:911-4.
- ¹⁴⁶ O'Sullivan F, Dalton R, Rostron CK. Fibrin glue: an alternative method of wound closure in glaucoma surgery. *J Glaucoma* 1996;5:367-70.
- ¹⁴⁷ Lee KH, Kim MS, Hahn TW, Kim JH. Comparison of histological findings in wound healing of rabbit scleral homografts with fibrin glue (Tisseel[®]) and suture material. *J Refract Surg* 1995;11:397-401.
- ¹⁴⁸ Kim JC, Bassage SD, Kempinski MH, et al. Evaluation of tissue adhesives in closure of scleral tunnel incisions. *J Cataract Refract Surg* 1995;21:320-5.
- ¹⁴⁹ Goins KM, Khadem J, Majmudar PA, Ernest JT. Photodynamic biologic tissue glue to enhance corneal wound healing after radial keratotomy. *J Cataract Refract Surg* 1997;23:1331-8.
- ¹⁵⁰ Kaufman HE, Insler MS, Ibrahim-Elzembely HA, Kaufman SC. Human fibrin tissue adhesive for sutureless lamellar keratoplasty and scleral patch adhesion. *Ophthalmology* 2003;110:2168-72.
- ¹⁵¹ <http://www.arvo.org/eweb/dynamicpage.aspx?site=arvo2&webcode=AnimalsResearch> 2008, October 16th.
- ¹⁵² Hayat MA. *Basic Techniques for Transmission Electron Microscopy*. Academic Press Inc., London, 1986.
- ¹⁵³ Coons, AH. Fluorescent antibody methods. In *General Cytochemical Methods*, Danielli JF, ed. New York: Academic Press, 1958;399-422.
- ¹⁵⁴ Polack FM. Lamellar keratoplasty, Malbran's peeling off Technique. *Arch Ophthalmol* 1971;86:293-5.
- ¹⁵⁵ Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D. R core team: linear and nonlinear effects models. *R Package* 2008;3:1-90
- ¹⁵⁶ Parsons NR, Costa ML, Achten J, Stallard N. Repeated measures proportional odds logistic regression analysis of ordinal score data in the statistical software package R. *Computational Statistics & Data Analysis* 2009;53:632-41.
- ¹⁵⁷ Costa ML, MacMillan K, Halliday D, Chester R, Shepstone L, Robinson AHN, Donell ST. Randomised controlled trials of immediate weightbearing mobilisation for rupture of the tendon Achillis. *Journal of Bone and Joint Surgery* 2006;88,69-77.
- ¹⁵⁸ Diggle PJ, Heagerty P, Liang KY, Zeger SL. *Analysis of Longitudinal Data*, Oxford 2004.
- ¹⁵⁹ Pinheiro, JC, Bates DM. *Mixed-Effects Models in S and S-PLUS*. Springer 2000.
- ¹⁶⁰ Brecher G, Cronkite EP. Morphology and enumeration of human blood platelets. *J. Appl Physiol* 1950;3:365-77.
- ¹⁶¹ Brecher, G. et al. The reproducibility and consistency of the platelet count. *Am J Clin Pathol* 1953;23:15-26.

- ¹⁶² Polack FM. Lamellar keratoplasty, Malbran's peeling off Technique. *Arch Ophthalmol* 1971;86:293-5.
- ¹⁶³ Andreoni G, Angeretti N, Lucca E, Forloni G. Densitometric quantification of neuronal viability by computerized image analysis. *Exp Neurol* 1997;148:281-7.
- ¹⁶⁴ Kurpakus MA, Stock EL, Jones JCR. The role of the basement membrana in differential expression of keratin proteins in epithelial cells. *Devl Biol* 1992;150:243-255.
- ¹⁶⁵ Chen WY, Mui MM, Kao WW, et al. Conjunctival epithelial cells do not transdifferentiate in organotypic cultures: expression of K12 keratin is restricted to corneal epithelium. *Curr Eye Res* 1994;13:765-78.
- ¹⁶⁶ Zhu G, Ishizaki M, Haseba T, et al. Expression of K12 keratin in alkali-burned rabbit corneas. *Curr Eye Res* 1992;11:875-87.
- ¹⁶⁷ Kiritoshi A, SundarRaj N, Thoft RA. Differentiation in cultured limbal epithelium as defined by keratin expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991;32:3073-7.
- ¹⁶⁸ Harrison LD. Grading corneal ulcers. *Ann Ophthalmol* 1975;7:537-539,541-2.
- ¹⁶⁹ Maumenee AE. Clinical aspects of the corneal homograft reaction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1962;1:244-52.
- ¹⁷⁰ Efeoglu C, Akcay YD, Erturk S. A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:1403-7.
- ¹⁷¹ Talbot M, Carrier P, Giasson CJ, et al. Autologous transplantation of rabbit limbal epithelia cultured on fibrin gels for ocular surface reconstruction. *Mol Vis* 2006;12:65-75.
- ¹⁷² Kruse FE, Tseng SC. Serum differentially modulates the clonal growth and differentiation of cultured limbal and corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:2976-89.
- ¹⁷³ Dua HS, Joseph A, Shanmuganathan VA, et al. Stem cell differentiation and the effects of deficiency. *Eye* 2003;8:877-85.
- ¹⁷⁴ Niederkorn JY. The immune privilege of corneal allografts. *Transplantation*. 1999;67:1503-08.
- ¹⁷⁵ Li QJ, Ashraf FM, Rana TS, et al. Long-term survival of allogeneic donor cell-derived corneal epithelium in limbal deficient rabbits. *Curr Eye Res* 2001; 23:336-45.
- ¹⁷⁶ Stark WJ, Taylor HR, Bias WB, et al. Histocompatibility (HLA) antigens and keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 1978;86:595-604.
- ¹⁷⁷ Daya SM, Watson A, Sharpe JR, et al. Outcomes and DNA analysis of ex vivo expanded stem cell allograft for ocular surface reconstruction. *Ophthalmology* 2005;112:470-7.
- ¹⁷⁸ de la Fuente M, Seijo B, Alonso MJ. Bioadhesive hyaluronan-chitosan nanoparticles can transport genes across the ocular mucosa and transfect ocular tissue. *Gene Ther* 2008;15:668-76.
- ¹⁷⁹ Volker-Dieben HJ, D'Amato J, Kok-van Alphen CC. Hierarchy of prognostic factors for corneal allograft survival. *Aust. N. Z. J. Ophthalmol* 1987;15:11-8.
- ¹⁸⁰ Chang JH, Gabison EE, Kato T, et al. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol* 2001;12:242-9.
- ¹⁸¹ Kim SW, Ha BJ, Kim EK et al. The Effect of Topical Bevacizumab on Corneal Neovascularization. *Ophthalmology* 2008;115:33-8.
- ¹⁸² Takács L, Tóth E, Berta A, Vereb G. Stem cells of the adult cornea: from cytometric markers to therapeutic applications. *Cytometry A* 2009;75:130-9.

-
- ¹⁸³ Weibrich G, Kleis WK, Kunz-Kostomanolakis M, Loos AH, Wagner W. Correlation of platelet concentration in platelet-rich plasma to the extraction method, age, sex, and platelet count of the donor. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2001;16:693-9
- ¹⁸⁴ Rosenthal AR, Harbury C, Egbert PR, Rubenstein E. Use of a platelet-fibrinogen-thrombin mixture as a corneal adhesive: experiments with sutureless lamellar keratoplasty in the rabbit. *Inv Ophthalmology* 1975;14:872-5.
- ¹⁸⁵ Kaufman HE, Inslar MS, Ibrahim-Elzembely HA, Kaufman SC. Human fibrin tissue adhesive for sutureless lamellar keratoplasty and scleral patch adhesion. *Ophthalmology* 2003;110:2168-72.
- ¹⁸⁶ Velazquez A.J; Carnahan MA; Kristinsson J; Stinnett S. New Dendritic Adhesives for Sutureless Ophthalmic Surgical Procedures. *Arch Ophthalmol* 2004;122: 867-70.
- ¹⁸⁷ Bloom JN, Duffy MT, Davis JB, McNally-Heintzelman KM. A light-activated surgical adhesive technique for sutureless ophthalmic surgery. *Archives of Ophthalmology* 2003;121:1591-5.
- ¹⁸⁸ Hokugo A, Ozeki M, Kawakami O, Sugimoto K, Mushimoto K, Morita S, Tabata Y. Augmented bone regeneration activity of platelet-rich plasma by biodegradable gelatin hydrogel. *Tissue Eng* 2005;11:1224-33.
- ¹⁸⁹ Ohya M, Yamada Y, Ozawa R, Ito K, Takahashi M, Ueda M. Sinus floor elevation applied tissue-engineered bone. Comparative study between mesenchymal stem cells/platelet-rich plasma (PRP) and autogenous bone with PRP complexes in rabbits. *Clin Oral Implants Res* 2005;16:622-9.
- ¹⁹⁰ Jung RE, Schmoekel HG, Zwahlen R, Kokovic V, Hammerle CH, Weber FE. Platelet-rich plasma and fibrin as delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clin Oral Implants Res* 2005;16:676-82.
- ¹⁹¹ Slater M, Patava J, Kingham K. Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. *J Orthop Res* 1995;13:655-63
- ¹⁹² Landesberg R, Roy M, Gickman RS. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg* 2000;58:297-300.
- ¹⁹³ Eggerman TL, Mondoro TH, Lozier JN, Vostal JG. Adenoviral vectors do not induce, inhibit, or potentiate human platelet aggregation. *Hum Gene Ther* 2002;13:125-8.
- ¹⁹⁴ Gallo JE, Gimeno FL, Roldan F, Croxatto JO, Genovese J. The use of autologous platelet gel (platelet-rich-plasma) in corneal limbal epithelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44: E-Abstract 1354.
- ¹⁹⁵ Wilson SE. Analysis of the keratocyte apoptosis, keratocyte proliferation, and myofibroblast transformation responses after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2002;100:411-33.
- ¹⁹⁶ Wilson SE, Netto M, Ambrosio R Jr. Corneal cells: chatty in development, homeostasis, wound healing, and disease. *Am J Ophthalmol* 2003;136:530-6.
- ¹⁹⁷ Stark WJ, Taylor HR, Bias WB, Maumenee AE. Histocompatibility (HLA) antigens and keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 1978;86:595-604.
- ¹⁹⁸ Trowbridge CC, Stammers AH, Woods E, Yen BR, Klayman M, Gilbert C. Use of platelet gel and its effects on infection in cardiac surgery. *J Extra Corpor Technol* 2005;37:381-6.