



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

Grado en Óptica y Optometría

MEMORIA TRABAJO FIN DE GRADO TITULADO

**“Últimos avances en medicina regenerativa
de la superficie ocular”**

Presentado por Cristina Rojo Ibáñez

Tutelado por: Laura García Posadas

Tipo de TFG: Revisión Investigación

En Valladolid, a 24 de mayo de 2022

ÍNDICE

RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Superficie ocular	4
1.2. Alteraciones de la superficie ocular	4
1.3. Medicina regenerativa	5
2. JUSTIFICACIÓN	7
3. OBJETIVOS	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS	8
5. RESULTADOS	9
5.1. Medicina regenerativa de la superficie ocular. Reconstrucción de la superficie ocular	9
5.2. Células madre	9
5.2.1. Células madre límbicas	10
5.2.2. Células mesenquimales	11
5.2.3. Otras células	11
5.3. Sustratos empleados en medicina regenerativa de la superficie ocular	12
5.3.1. Membrana amniótica	12
5.3.2. Fibrina	13
5.3.3. Colágeno	13
5.3.4. Fibroína de la seda	13
5.3.5. Bioadhesivo	14
5.4. Factores de crecimiento	14
5.5. Trasplantes de la superficie ocular	15
5.5.1. Trasplante conjuntival	15
5.5.2. Queratoepitelioplastia	15
5.5.3. Trasplante limbal	15
5.5.4. Trasplante de epitelio limbar cultivado	16
5.5.5. Trasplante epitelial de la mucosa oral cultivada	17
5.6. Nanotecnología en la regeneración corneal	17
5.7. Técnica de transporte en medicina regenerativa	18
5.8. Direcciones futuras	18
6. CONCLUSIONES	20
7. BIBLIOGRAFÍA	21

 POWER EN EL POWER POINT TAL CUAL

 LA PARTE QUE PONGO PORQUE QUIERO LEERLO

RESUMEN

La superficie ocular es una estructura anatómica y funcional expuesta al medio ambiente que se encarga de mantener el sistema visual sano. Se trata de una unidad compleja por lo que el tratamiento puede ser difícil cuando el daño es grave. Algunas patologías de superficie ocular tienen (o tenían hasta hace poco) un mal pronóstico debido a la falta de eficacia de los procedimientos clínicos. La medicina regenerativa de la superficie ocular busca ser la alternativa a los métodos más clásicos que resultaban insuficientes con el fin de mejorar los tratamientos médicos.

Para llevar a cabo estos procedimientos de medicina regenerativa se emplea fundamentalmente la ingeniería tisular, y para su desarrollo es necesaria la investigación de las células madre (principalmente células madre limbares y células madre mesenquimales), los sustratos sobre los que cultivarlas (membrana amniótica, fibrina, colágeno...), y los factores de crecimiento. Estos componentes se elegirán atendiendo a diferentes factores como la disponibilidad de los mismos o las características del tejido que se busca reparar.

En este trabajo se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica sobre este tema, resumiendo los principales avances de la medicina regenerativa de la superficie ocular.

ABSTRACT

The ocular surface is an anatomical and functional unit that is continuously exposed to the environment. It is responsible for keeping a healthy visual system. Due to its complexity, when the ocular surface is seriously injured, the treatment can become a difficult challenge. Regenerative medicine seeks to be the alternative to classic methods that were not sufficient to treat severe ocular surface disorders.

To carry out regenerative medicine procedure, tissue engineering is generally used. And to develop and engineered tissue it is necessary to investigate in stem cells (mainly limbic and mesenchymal stem cells), the substrates in which cells are cultured (collagen, fibrin, amniotic membrane ...), and growth factors. All these components will be chosen according to different factors such as their availability or the characteristics of the tissue that is sought to be repaired.

In this work, a literature review on this topic has been carried out, summarizing the main advances in regenerative medicine of the ocular surface.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Medicina regenerativa

La medicina regenerativa es la disciplina que busca reparar y regenerar órganos que funcionan de manera anormal creando alternativas biológicas que reemplacen o mejoren tejidos u órganos que están perjudicados o que ya no son capaces de realizar su función.⁸ La medicina regenerativa busca la traslación clínica de la ingeniería de tejidos. A menudo, ambos términos son intercambiables.

Langer y Vacanti instauraron el campo de la “ingeniería de tejidos”, un campo multidisciplinar que se nutre de los principios de la ingeniería y de las ciencias biológicas para desarrollar unos sustitutos biológicos que permitan restaurar, mantener y mejorar la función tisular. Esta tecnología se ha utilizado en varios tejidos y órganos del cuerpo humano, incluidos el corazón, la piel, el hígado y la córnea.⁴

Con esta tecnología se esperan resultados prometedores en múltiples campos de la medicina, entre los que se encuentra la medicina regenerativa de la superficie ocular, tema que se abordará en mayor profundidad a lo largo de este trabajo.⁹

1.2. Superficie ocular

El término de superficie ocular hace referencia a una estructura anatómica y funcional que está constantemente en contacto con el medio que nos rodea.¹ Se trata de una unidad indispensable para mantener un buen sistema visual, ya que se encarga de cumplir con diferentes funciones como la antibacteriana, la nutritiva, la óptica (se encarga de permitir la correcta entrada de luz al interior del ojo) y la mecánica (protege a todas las estructuras internas).^{2,3}

La superficie ocular está formada por cuatro estructuras que son: córnea, conjuntiva, limbo y película lagrimal.³

La córnea es una estructura transparente, ya que debe permitir la entrada de luz, que está formada por 5 capas diferenciadas: la capa más externa de la córnea es el epitelio, seguida de la capa de Bowman, el estroma, la membrana de Descemet y el endotelio, que es la capa más profunda.⁵ Dichas capas deben desempeñar correctamente sus funciones, siendo el epitelio el que impide la entrada de agentes extraños, el estroma (formado por láminas de colágeno ordenadas de manera regular) el que mantiene la transparencia y resistencia, y el endotelio (formado por una única capa de células) el que separa la córnea de la cámara anterior.^{4,6}

La conjuntiva es la membrana mucosa que recubre los párpados y la esclera, y es la encargada de mantener la homeostasis de la superficie ocular con la ayuda de la película lagrimal. Está formada por un epitelio que descansa

sobre un estroma. Dicho epitelio tiene una estructura estratificada compuesta por células epiteliales y caliciformes. Estas últimas, que se encuentran en todas las regiones de la conjuntiva aunque en distinta densidad, están especializadas en la secreción de mucina. Aunque en la superficie ocular hay más células secretoras de mucinas, sí son las únicas que producen la mucina MUC5AC.²

Al área de transición entre la córnea y la esclera se le denomina limbo.² Está compuesto por un anillo con un ancho de 1-2 mm que rodea completamente la córnea. Se diferencia de la córnea por la existencia de células de Langerhans y melanocitos, y de la conjuntiva por la ausencia de células caliciformes. En el limbo se encuentran las empalizadas de Vogt, una estructura microscópica que forma el nicho de células madre limbares, una subpoblación de células indiferenciadas que poseen un papel principal en la regeneración de la superficie ocular. Se trata de una estructura con grandes implicaciones en la patología ocular, ya que su daño puede derivar en ceguera corneal producida por el Síndrome de insuficiencia límbica.⁷

La película lagrimal es un líquido complejo compuesto por agua, sales, glucosa, proteínas, lípidos y mucinas. Dichos componentes se distribuyen de diferente manera en la película lagrimal formando dos capas principalmente. La capa más próxima a la córnea es la capa muco-acuosa, formada por mucina secretada por las células caliciformes de la conjuntiva principalmente y encargada de aumentar la viscosidad de la lágrima para mantener su estabilidad sobre la superficie ocular. Dicha capa está compuesta por un 98% de agua aproximadamente que contiene mucinas estabilizadoras y proteínas antimicrobianas cuya densidad disminuye progresivamente conforme nos acercamos a la capa lipídica. La capa más superficial es la capa lipídica está formada por lípidos que han sido secretados por las glándulas de Meibomio y se encarga de crear una barrera entre el aire y la propia lágrima para evitar la rápida evaporación de esta.²

Un término más actual y también muy empleado es el de **unidad funcional lagrimal**, que incluye a la superficie ocular junto con las glándulas lagrimales, los párpados, y los nervios sensoriales y motores. Su principal función es proteger la película lagrimal y mantener su función normal preservando una superficie óptica lisa. Todas las estructuras que la forman están ricamente inervadas por el V par craneal o nervio trigémino. La unidad funcional lagrimal constituye una unidad anatómica, histológica y fisiopatológica, de manera que la afectación de cualquiera de sus componentes puede dañar al resto.³²

1.3 Alteraciones de la superficie ocular

La gran complejidad de la superficie ocular hace que algunas de las enfermedades graves que afectan al segmento anterior del ojo (quemaduras térmicas y químicas, penfigoide cicatricial ocular, síndrome de Stevens-Johnson...) se conviertan en grandes desafíos clínicos. Se trata de problemas que se consideran emergencias oftálmicas, puesto que comprometen la salud de la superficie ocular y disminuyen la visión.⁸

Algunas de las alteraciones más graves son las que afectan al limbo, ya que estas patologías conducen al síndrome de insuficiencia límbica. El síndrome de insuficiencia límbica es la pérdida de las células madre limbo-corneales y/o de su nicho. Hay varias afecciones que conducen al síndrome de insuficiencia límbica, como por ejemplo la aplasia congénita de las células madre (aniridia por ejemplo), enfermedades producidas por causas extrínsecas (lesiones químicas o térmicas, radiación UV, agresiones, intervenciones quirúrgicas repetidas, infección microbiana extensa o uso de LC) y enfermedades originadas por causas intrínsecas (como el síndrome de Stevens-Johnson).⁵

La destrucción del epitelio limbar produce la cicatrización anormal del epitelio de la córnea, dando lugar a signos clínicos tales como conjuntivalización corneal (que produce una tinción anómala de fluoresceína), la irregularidad de la superficie de la córnea (calcificación, ulceración, fusión, y perforación de la cornea), el defecto del epitelio de manera recurrente o persistente, y las cicatrices subepiteliales.^{5,7}

El diagnóstico de insuficiencia límbica se realiza examinando los signos clínicos, y es determinante para saber cuál es el tratamiento a seguir. En estos pacientes, la queratoplastia lamelar y la queratoplastia penetrante proporcionan un reemplazo temporal del epitelio corneal pero no reconstituyen la función limbar, por lo que no suponen una solución a largo plazo.⁷

Hay varios sistemas que se utilizan para clasificar estas lesiones de la superficie ocular atendiendo al nivel de gravedad cuyo fin es predecir el diagnóstico y el resultado clínico. Algunos se basan en la gravedad de la lesión, clasificándola como leve, leve-moderada, moderada-grave, grave o muy grave. Otros sistemas, se apoyan para hacer la clasificación en la cantidad de tejido límbico que se encuentra afectado o en el compromiso de la conjuntiva bulbar. Pero en lo que todos los sistemas coinciden es en la necesidad de identificar la cantidad de tejido limbal que se ve comprometido, ya que varios estudios han demostrado que la posición relativa de tejido límbico superviviente es un factor de pronóstico importante.¹⁰

En muchos casos, se verán afectadas tanto la córnea como la conjuntiva y, por tanto, la película lagrimal. Debido a esto, se deben buscar rutas para reconstruir la superficie ocular al completo y de manera conjunta. El tratamiento tradicional para el daño grave de la córnea es el trasplante de esta, pero no se consigue reparar la conjuntiva si esta se encuentra dañada y por tanto tampoco se consigue una lágrima de buena calidad.^{2,8}

2. JUSTIFICACIÓN

Una superficie ocular sana es fundamental en el mantenimiento de la función visual. Muchas patologías que afectan a la superficie ocular y que tienen un difícil tratamiento pueden conducir a la ceguera. En los últimos años, diversos descubrimientos científicos como la identificación de células madre epiteliales corneales, la implantación de nuevos métodos en el cultivo epitelial y el mayor conocimiento de matrices extracelulares y factores de crecimiento, han legitimado un nuevo enfoque para el tratamiento de problemas de la superficie ocular mediante la medicina regenerativa.

Además, se ha demostrado que los métodos terapéuticos convencionales no son lo suficientemente satisfactorios, y las consecuencias a largo plazo de algunas patologías oculares son catastróficas. Por esta razón se necesitan técnicas eficaces para la reconstrucción de la superficie ocular.⁸

En los últimos años se han producido grandes avances científicos y clínicos sobre la reconstrucción de la superficie ocular. Por ello, y dada la importancia en el tratamiento de enfermedades oculares, se ha decidido hacer una revisión bibliográfica sobre este tema con el fin de recopilar y analizar en este TFG la información principal publicada en los últimos años sobre medicina regenerativa de la superficie ocular.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este TFG es realizar una investigación bibliográfica para revisar y recopilar la información publicada en la literatura científica sobre la medicina regenerativa de la superficie ocular.

Los objetivos específicos son:

- Analizar los mecanismos usados para regenerar la superficie ocular dañada.
- Conocer los distintos componentes empleados en ingeniería de tejidos destinados a la reparación de la superficie ocular.
 - Conocer la tecnología utilizada en los trasplantes de distintos tipos celulares a la superficie ocular.
- Analizar las ventajas e inconvenientes de la medicina regenerativa.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología escogida para este trabajo es una revisión bibliográfica.

Se han consultado diferentes fuentes para poder seleccionar los artículos científicos relacionados con los últimos avances en medicina regenerativa de la superficie ocular.

La búsqueda bibliográfica se realizó con las publicaciones de los últimos 20 años (desde 2002 hasta 2022). Las bases de datos utilizadas fueron Pubmed, Google Académico y Elsevier.

Las principales palabras clave empleadas para llevar a cabo las distintas búsquedas en las diferentes bases de datos han sido: “*ocular surface*”, “*regenerative medicine*”, “*ocular surface and regenerative medicine*”, “*limbal stem cells*”, “*Growth factor*”, “*Biomaterials*”, “*Stem cell therapy*”, “*Kerathoepitelioplasty*”, “*amniotic membrane*” y “*mesenchymal stem cells*”.

Criterios de inclusión/exclusión

En este trabajo de revisión bibliográfica, se han marcado una serie de criterios de inclusión y exclusión de los artículos:

Criterios de inclusión:

- Artículos originales o de revisión tanto en español como en inglés
- Artículos gratuitos o accesibles a través de la plataforma de la UVA

Criterios de exclusión:

- Artículos no disponibles a texto completo
- Artículos que no cumplan los criterios de inclusión ya descritos
- Artículos que no hagan referencia al sistema visual.

Teniendo en cuenta estos criterios, finalmente se incluyeron 32 artículos.

5. RESULTADOS

5.1 Medicina regenerativa de la superficie ocular. Reconstrucción de la superficie ocular

La ingeniería de tejidos o medicina regenerativa es una rama de la bioingeniería que combina el uso de células, los métodos de ingeniería de materiales, la bioquímica y la fisicoquímica para mejorar o reemplazar las funciones biológicas. La medicina regenerativa de la superficie ocular busca aportar nuevas terapias que sirvan para tratar enfermedades del segmento anterior del globo ocular utilizando como principal base la ingeniería de tejidos. Dicha regeneración depende principalmente del uso de células madre, ya que estas aportan un beneficio sustancial a los pacientes que sufren una amplia gama de enfermedades.^{8, 12, 19}

Si bien el trasplante de células madre más empleado en la regeneración de la superficie ocular es el de células madre epiteliales limbares, también hay que destacar el uso de células madre mesenquimales y células madre del estroma corneal limbal.¹⁹

En la reconstrucción de la superficie ocular mediante la ingeniería tisular hay que tener en cuenta tres factores importantes: la fuente celular (las células madre), el sustrato biocompatible (en el que se cultivan y trasplantan las células) y los factores de crecimiento empleados.⁸

5.2 Células madre

Las células madre son una pequeña subpoblación del total de células indiferenciadas capaces de proliferar, automantenerse, dar lugar a células diferenciadas (tienen la capacidad de diferenciarse, como mínimo, en un tipo celular especializado) y regenerar los tejidos tras un daño. Las células diferenciadas se caracterizan por tener un ciclo de vida corto, pero consiguen regenerarse gracias a la proliferación de células madre.

Se trata de células pobremente diferenciadas que poseen un citoplasma muy primitivo. Tienen una gran capacidad de renovarse sin fallos, una larga esperanza de vida, un ciclo celular largo y son capaces de realizar tanto divisiones simétricas como asimétricas. Estas células se mantienen quiescentes hasta que su proliferación es activada mediante la cicatrización o con su puesta en cultivo.⁷

Una forma de clasificar a las células madre es atendiendo a su potencial de diferenciación.

- Células madre totipotentes: son capaces de crear un individuo completo, ya que pueden dar lugar a todas las células del organismo.
- Células madre multipotentes: pueden dar lugar a diferentes tipos de células, pero todas ellas proceden de la misma capa embrionaria que la célula original.

- Células madre unipotentes: solo pueden diferenciarse en un tipo de célula del tejido origen.

Las células madre empleadas en medicina regenerativa de la superficie ocular son fundamentalmente de dos tipos: células madre limbares y células madre mesenquimales.

5.2.1 Células madre limbares

Debido a su importancia en la conservación del epitelio corneal, las células madre limbares o LSC (*limbal stem cells*) son la base en las que se sustenta la medicina regenerativa de la superficie ocular.^{4, 5}

Las LSC, como el resto de células madre, pueden renovarse de manera indefinida, mientras que las células progenitoras directas de estas células madre tienen un potencial proliferativo limitado, aunque son capaces de dividirse con mayor rapidez que las LSC.¹⁴

Las LSC tienen una larga vida útil y están inactivas en condiciones homeostáticas. Residen en la capa basal del limbo esclerocorneal, donde se encargan de generar células de amplificación transitoria que posteriormente migran a la córnea central.⁴ Además, son las encargadas de la regeneración del epitelio corneal.

La hipótesis más aceptada sobre la reparación y regeneración del epitelio corneal se basa en la hipótesis X-Y-Z descrita por Thoft y Friend.¹⁴

Como podemos ver en la Figura 1, las LSC se dividen y dan lugar a células amplificadoras transitorias (Figura 1A). Estas, migran centrípetamente a través del epitelio basal (Figura 1B) y se dividen de nuevo al llegar a la córnea central (Figura 1C). Las células ya diferenciadas se movilizan en dirección al exterior hasta llegar a las capas más superiores de la córnea (Figura 1D), donde finalmente se desprenden de la superficie corneal (Figura 1E). El número de células epiteliales de la córnea se puede determinar utilizando la ecuación $X+Y=Z$; donde X es la proliferación de las células epiteliales basales, la Y la contribución a la masa celular provocada por el movimiento centrípeto de las células periféricas y la Z la pérdida de las células epiteliales superficiales.¹²

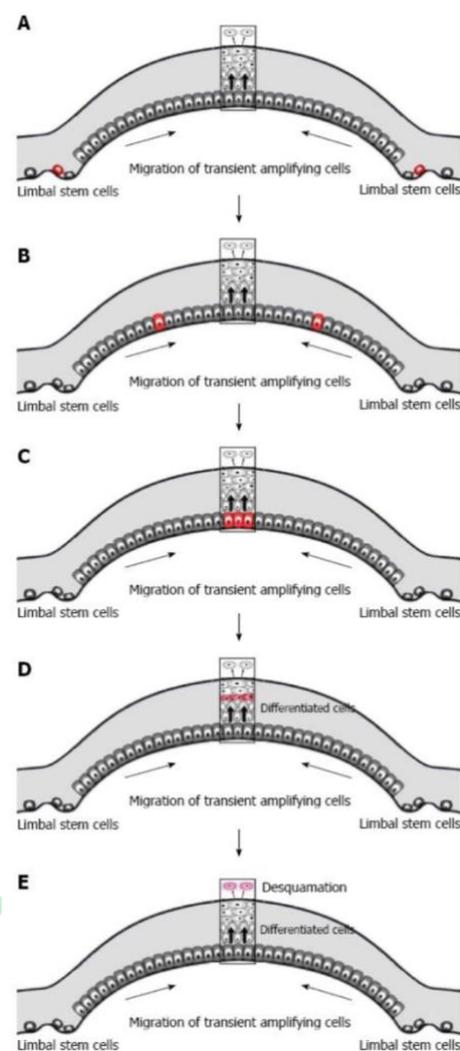


Figura 1: Teoría XYZ planteada por Thoft y Friend.¹³

5.2.2 Células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales son células madre multipotentes con una gran capacidad de diferenciación e inmunosupresión. Se encuentran en la mayoría de los tejidos del cuerpo y al diferenciarse pueden dar lugar a distintos tejidos, entre ellos tejido óseo, muscular, cartilaginoso y adiposo.

En el caso de la superficie ocular, las células madre mesenquimales se encargan de dar apoyo a las células madre limbicas, y de secretar citoquinas antiinflamatorias y factores de crecimiento. Además, se ha demostrado su capacidad de diferenciarse en células epiteliales corneales, queratocitos y células endoteliales.²⁶

Se ha experimentado con la administración de células madre mesenquimales para la regeneración de la superficie ocular y los resultados en animales con patología oftálmica han sido prometedores.^{6, 24}

En el caso de los humanos, recientemente se ha llevado a cabo un ensayo piloto cuya finalidad es comprobar si el trasplante alogénico de células madre mesenquimales es tan seguro y eficiente como el trasplante epitelial limbal cultivado alogénico. Los resultados demostraron que sí era un trasplante seguro y eficaz, consiguiendo un éxito superior al 70% y sin aparición de efectos adversos. Este estudio se convierte en un buen indicador para continuar con ensayos clínicos sobre este tipo de trasplante.²⁷

5.2.3 Otras células

Aunque las células madre limbares y mesenquimales son las más empleadas en regeneración de la superficie ocular, son muchas las células madre que pueden ser utilizadas tanto de origen ocular como del resto del organismo (Figura 2). En cuanto a células de origen no ocular, destacan las células madre derivadas de la mucosa oral, las cuales se utilizan en el trasplante de mucosa oral cultivada del que hablaremos más adelante.

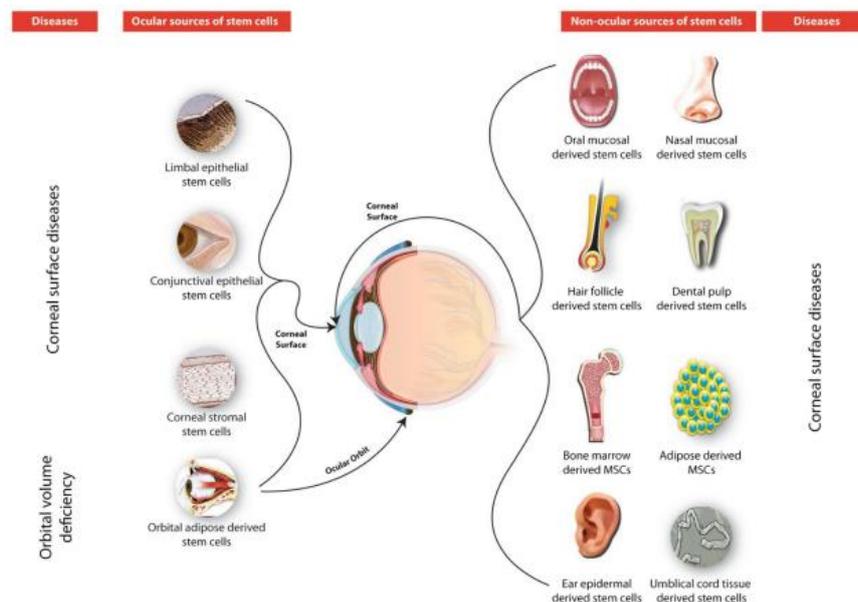


Figura 2. Fuentes de células madre oculares y no oculares²⁹.

Otras células utilizadas en la regeneración de la superficie ocular que podemos destacar son las células madre embrionarias, que son células madre pluripotentes capaces de producir cualquiera de los tejidos que conforman a un individuo. Se pueden cultivar a partir de células presentes en los embriones de tan solo unos días de edad.

Centrándonos en su aplicación en el sistema visual, se ha demostrado recientemente que estas células tienen la capacidad de diferenciarse en queratocitos *in vitro*.²⁵

Por último, también se utilizan células en la medicina regenerativa que no son células madre, como pueden ser los melanocitos. Los melanocitos son células ya diferenciadas responsables de la pigmentación y encargadas de proteger al resto de células contra las radiaciones UV mediante la producción de melanina. En la superficie ocular, los melanocitos están presentes en el limbo esclerocorneal, formando parte del nicho de las células madre y salvaguardando a estas células de las radiaciones UV. En cuanto a la regeneración de la superficie ocular, se ha demostrado que los melanocitos proporcionan un apoyo eficaz a las células madre epiteliales del limbo *in vitro*, sirviendo de soporte para las células epiteliales corneales.^{7, 24}

5.3 Sustratos empleados en medicina regenerativa de la superficie ocular

El éxito de la regeneración ocular depende en gran medida de los sustratos biocompatibles subyacentes. Un sustrato adecuado debe ser altamente biocompatible, no inmunogénico y no inflamatorio. Además, deberá promover la adhesión y proliferación celular. En el caso de que se emplee para la córnea, es esencial que además mantenga tanto la transparencia como la estabilidad mecánica.

Los sustratos celulares más útiles en la regeneración de la superficie ocular son los andamios biológicos (principalmente la membrana amniótica), los andamios biosintéticos (como la fibrina o el colágeno) y los andamios sintéticos.⁸

5.3.1 Membrana amniótica

La membrana amniótica (MA) humana es un tejido avascular semitransparente que forma la capa más interna del saco fetal. Es semitransparente y tiene entre 0.02 y 0.05 mm de grosor. Está compuesta por una monocapa de células epiteliales, una membrana basal gruesa y un estroma avascular adyacente.¹⁶

En cuanto a la regeneración de la superficie ocular, la MA ha sido utilizada en el segmento anterior durante los últimos años y se ha demostrado su gran utilidad en la reconstrucción conjuntival en casos graves de daños a la superficie ocular, ya que esta presenta características propias:

- Presencia de factores de crecimiento y citoquinas que inducen la epitelización y cicatrización de heridas. Es decir, produce la migración y

adhesión de las células epiteliales haciendo que el proceso de curación sea más corto.

- **Propiedades inflamatorias que se asemejan a las de la membrana basal del epitelio corneal.**^{2, 7, 8}

La MA puede actuar como sustrato para ayudar a la repoblación de las células epiteliales corneales, ya sea en la parte superior de la MA cuando se incorpora a esta en el tejido estromal, o debajo de la MA cuando esta actúa como vendaje.²

De esta manera, la MA produce una mejoría clínica del dolor y la fotofobia, y facilita la epitelización colaborando en la restauración de la superficie corneal normal. Por ello, ha llegado a ser vista como el sustrato más apropiado para su uso en la regeneración de la superficie. Esto ha sido puesto a prueba y los resultados han sido alentadores, aunque todavía no hay pautas claras de uso, lo que está produciendo diversas preocupaciones que han derivado en el desarrollo de sustratos alternativos.^{7, 8}

5.3.2 Fibrina

La fibrina es un sustrato derivado del suero que aporta características como resistencia, flexibilidad, elasticidad y resistencia a la acción de cizallamiento de los párpados durante el parpadeo. Con este sustrato se han logrado grandes resultados clínicos, ya que la lámina epitelial cultivada se puede trasplantar directamente a la superficie corneal y cuando el proceso concluye, la fibrina se absorbe completamente.¹⁷

El inconveniente que tiene el uso de fibrina es que hay ciertos problemas logísticos y de seguridad que no se consiguen solucionar, como el riesgo a la transmisión de enfermedades después de las operaciones.^{8, 17}

5.3.3 Colágeno

El colágeno es una proteína que forma unas fibras de colágeno flexibles y resistentes a la tracción. En la superficie ocular, el colágeno es el componente principal del estroma y forma la membrana basal del epitelio corneal.⁵

Para poder utilizar el colágeno como sustrato, se debe modificar su matriz para mejorar las propiedades mecánicas de este, además de la transparencia. Debido a ello, se utiliza colágeno comprimido junto con una tecnología que consigue una estructura en 3D del colágeno modificado.² Los resultados son prometedores, ya que consigue que las células epiteliales limáticas formen una capa bien estructurada cuando están en el plato de cultivo.^{2, 5}

5.3.4 Fibroína de la seda

La seda es una fibra natural producida por varios grupos de artrópodos entre los que destaca el gusano de seda (*Bombyx mori*). Se trata de una fibra que puede llegar a medir hasta 1.500 metros y está compuesta de dos proteínas. Una de estas proteínas es la fibroína de seda, compuesta

mayoritariamente por aminoácidos de glicina, serina y alanina, lo que colabora en la unión celular.

Sin embargo, la fibroína está recubierta por sericina (la otra proteína componente de la seda), una sustancia que actúa como un pegamento. Por esta razón, en el procesamiento de la fibroína el primer paso es eliminar esa sericina, dejando así un material fibroso fácil de disolver y procesar.^{2, 28}

La gran versatilidad de la fibroína la convierte en sustancia apta para cualquier tipo de aplicación en ingeniería tisular, pero su desarrollo es muy reciente. En cuanto a su aplicación en la superficie ocular, la fibroína se ha utilizado como refuerzo cuando se usa como sustrato el colágeno.²

5.3.5 Bioadhesivos

Los métodos estándar utilizados en los trasplantes corneales y limbares implican la sutura. Esto puede dar lugar a diversas complicaciones que van desde la creación de abscesos en la sutura, a la necrosis tisular, pasando por la formación de granulomas.

Ante esta serie de inconvenientes, se ha desarrollado una técnica de trasplantes que no requieren sutura gracias al uso de un bioadhesivo.

Lo que inicialmente se desarrolló es el uso de una MA seca recubierta de pegamento de fibrina⁸. Estos son dos sustratos de los que ya hemos hablado que presentan muy buenas cualidades para su uso sobre la superficie ocular.

5.4 Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son un conjunto de proteínas que se encargan de canalizar la llegada de las células a su destino y permitir la formación de tejidos, por lo que tienen un papel fundamental en la medicina regenerativa.¹⁵ Los métodos tradicionales de cultivo se basan en el uso de medios que contienen suero y capas de alimentación.¹⁷

Las células alimentadoras 3T3 (derivadas del ratón) han sido hasta el momento las más utilizadas para el cultivo de células madre epiteliales corneales, pero su uso puede producir la transmisión de zoonosis o de patógenos desconocidos. Debido a esto, se han estudiado nuevas células alimentadoras candidatas que están derivadas del ser humano, como el epitelio amniótico o las células madre mesenquimales.⁸

En cuanto al suero, el más utilizado en los sistemas de cultivo es el suero bovino fetal, el cual produce una gran preocupación clínica ya que la encefalopatía espongiiforme bovina (generalmente conocido como la enfermedad de las vacas locas) no se puede detectar mediante ensayos. Por esta razón y como alternativa segura, nace el uso de un suero autólogo (suero obtenido del propio paciente), con el que hay que tener en cuenta las

variaciones dependientes de los donantes (enfermedad, edad, sexo...) a la hora de usarlo.⁸

Por otro lado, el uso de sueros y sistemas de alimentación produce una mezcla compleja de hormonas, factores peptídicos componentes indefinidos que pueden representar una amenaza en el trasplante clínico.¹⁷

5.5 Trasplantes de la superficie ocular

En los últimos años se han desarrollado diferentes procedimientos quirúrgicos para reconstruir la superficie ocular cuando está gravemente dañada. Estos procedimientos buscan solventar no solo los daños de la córnea, si no de la unidad funcional lagrimal en su totalidad.

5.5.1 Trasplante conjuntival

Para reemplazar el tejido conjuntival dañado se pueden usar tanto autoinjertos como aloinjertos con el fin de restaurar la integridad de la superficie ocular. Dichos injertos contienen células epiteliales conjuntivales, células caliciformes, la membrana basal y la matriz intersticial, y tienen como función restaurar la arquitectura normal del tejido y su función.³¹

Al ser más complejo el epitelio conjuntival que el corneal, hay que tener más consideraciones en cuenta, sobre todo a la hora de elegir sustrato ya que este debe apoyar tanto el crecimiento de las células epiteliales como la secreción de mucinas.²

Aunque siempre es más recomendable que se realicen autoinjertos, el trasplante de tejido conjuntival alogénico es una opción viable para pacientes con los dos ojos afectados. No obstante, hay que tener en cuenta que los injertos alogénicos producen más efectos adversos (infecciones virales, bacterianas y fúngicas, riesgo de rechazo...) además del problema que produce la falta de donantes.³¹

5.5.2 Queratoepitelioplastia

La queratoepitelioplastia es un trasplante cuyo fin es la reparación de defectos epiteliales corneales persistentes. En él, se realiza una queratectomía superficial total (eliminación de todo el epitelio corneal) sobre el ojo dañado y se colocan en el limbo esclerocorneal pequeños trozos de córnea donante con el epitelio adherido. Esto producirá la expansión del epitelio desde donde se ha hecho el implante hasta el centro corneal.

Con el paso de los años, la queratoepitelioplastia ha demostrado que es muy eficaz en el tratamiento de las úlceras corneales periféricas ya que los pacientes han conservado una función visual útil sin recurrencia de problemas de curación epitelial.^{8, 23}

5.5.3 Trasplante limbal

En cuanto a trasplantes limbares, podemos hablar de dos tipos dependiendo del origen del injerto: trasplante limbar autólogo y trasplante

limbar de aloinjerto. El procedimiento que se sigue tanto en el trasplante limbar autólogo como en el de aloinjerto consiste en trasplantar dos trozos limbocorneales grandes (de 6-7 mm de arco del limbo) cuando el daño de la superficie no esté en su fase aguda para evitar el fracaso causado por la inflamación.⁷

El trasplante limbar autólogo es un trasplante de las LSC del ojo sano del paciente al ojo que presenta el daño. Este procedimiento tiene una serie de inconvenientes ya que requiere un gran injerto limbar del ojo sano (lo que nos puede causar un daño en este) y además no es una cirugía aplicable en pacientes con ambos ojos afectados, ya que el trasplante se hace del ojo sano al ojo dañado del mismo paciente.⁴

Otra opción cuando ambos ojos se encuentran dañados es el trasplante limbal de aloinjerto en el que se trasplanta las células de un individuo a otro. Sin embargo, esta cirugía puede producir complicaciones postoperatorias como el rechazo o la queratitis tanto bacteriana como fúngica. Además, la escasez de donantes hace aún más complejo este tipo de cirugías.⁴

5.5.4 Trasplante de epitelio limbar cultivado

El trasplante de epitelio limbar cultivado nace como solución al trasplante limbar del que ya hemos hablado. Este último, requiere de una gran cantidad de tejido del limbo del ojo sano del paciente, por lo que puede producir un problema en ese ojo. Debido a esto y con el fin de mejorar los resultados quirúrgicos, Pellegrini desarrolló el trasplante de epitelio limbar cultivado.⁴

Se trata de la terapia adecuada para pacientes con lesiones de la superficie ocular unilaterales graves. En él se hace una pequeña biopsia (mucho menor que en el trasplante limbar) en el ojo contralateral sano, y las células así obtenidas son expandidas y cultivadas *in vitro* para después realizar el trasplante. Además, se utiliza membrana amniótica substratos sobre el que cultivar las células y pegamento de fibrina para fijar la MA a la superficie ocular.^{4, 20}

En una evaluación clínica a largo plazo, se demostró que las células madre autólogas cultivadas representaban una fuente adecuada a largo plazo para trasplantes de la superficie ocular, llegando a tener buenos resultados incluso 10 años después del trasplante.⁸

Aunque esta técnica se considera muy buena, tiene una serie de inconvenientes. Una de las desventajas es que se somete al paciente a dos cirugías: una en la que se extrae el tejido y otra en el que se implanta después de ser cultivado. Otro inconveniente y el principal es que el paciente debe tener un solo ojo afectado para poder realizarse este trasplante, por lo que todos los afectados bilateralmente (que son la mayoría) quedan excluidos de este tipo de técnica. Debido a esto, se requiere la realización de trasplantes alogénicos de célula epiteliales limbares cultivadas a partir de tejido obtenido de donantes cadáveres. Estos trasplantes requieren la inmunosupresión del paciente al que se le realiza el trasplante, con los efectos secundarios que esto implica.²⁰

5.5.5 Trasplante epitelial de la mucosa oral cultivada

Como en muchas ocasiones las patologías graves de la superficie ocular son bilaterales, si se quiere hacer un trasplante de células madre limbares hay que recurrir a trasplantes limbares o trasplantes epiteliales limbares cultivados procedentes de otros individuos, lo que requiere una terapia inmunosupresora postoperatoria intensiva y prolongada para evitar el rechazo, lo que deriva en numerosos efectos adversos.¹¹

Debido a ello se han buscado otras fuentes de células que puedan ser obtenidas del propio paciente. Con este fin se ha desarrollado una técnica basada en la utilización del epitelio mucoso autólogo de origen superficial no ocular (mucosa oral, nasal, esofaga, traqueal y vaginal), la cual puede usarse tanto en las patologías que afecten a solo un ojo como a las que afecten a ambos.^{8, 11, 22}

Dado que el epitelio corneal es de tipo escamoso estratificado, las células epiteliales de la mucosa oral son una buena alternativa al tener una morfología similar²¹. El proceso comienza con la biopsia oral para la extracción del tejido. Dicho epitelio es lavado con antibiótico y posteriormente cortado en trozos pequeños para poder colocarlos sobre la membrana amniótica desepitelizada que posteriormente se cultiva mediante la utilización de un plato sensible a la temperatura. Después del cultivo, se trasplanta el epitelio oral cultivado en membrana amniótica a la superficie corneal del ojo dañado. Para comprobar la calidad del trasplante se tiñe con fluoresceína la lámina epitelial de la mucosa oral cultivada y después se cubre la superficie ocular con una lente de contacto terapéutica.^{4, 21}

La supervivencia de estas células no está muy clara, ya que llega un punto en el que no se puede diferenciar las células propias del tejido y las trasplantadas.

En los pacientes sometidos a este tipo de trasplante en un inicio no se han detectado efectos adversos graves. En el caso de haberlos, sería posible identificar y eliminar las células trasplantadas si es detectado precozmente, con lo que en principio los efectos adversos remitirían.⁴ Por otro lado, se ha observado que el trasplante de las células de la mucosa oral produce más vascularización que el trasplante de células madre epiteliales limbares a largo plazo.^{21, 22}

Debido a los buenos resultados, en la actualidad se estudia el uso de células de la mucosa oral cultivada en otros tejidos del cuerpo humano.⁴

5.6 Nanotecnología en la regeneración corneal

La nanotecnología regenerativa se ocupa de la reparación o sustitución de tejidos y órganos mediante el uso de materiales en la escala de tamaño de estructuras y moléculas intracelulares. Esta tecnología implica sistemas y construcciones en el rango aproximado de los 100 nm.

Los principales objetivos de la nanotecnología son monitorear, controlar y curar enfermedades a nivel molecular. Además, proporciona nuevos sistemas a la hora de administrar medicamentos de manera eficiente, de manera que actualmente se puede tratar con fármacos a un solo nivel celular.

En el caso de la medicina regenerativa de la superficie ocular, la nanotecnología se podría usar como paso previo al proceso de ingeniería tisular para la administración de medicamentos, ya que para poder proceder con el trasplante es más recomendable que la patología no se encuentre en su fase aguda. Al ser una vía de administración que puede ser mucho más eficiente que la vía tópica, el efecto de los medicamentos será más rápido y eficaz.⁵

5.7 Técnica de transporte en medicina regenerativa

Uno de los retos a los que nos enfrentamos con la medicina regenerativa es el transporte de las células cultivadas, ya que estas se “fabrican” en un centro de procesamiento celular en el que las condiciones son las ideales para el cultivo. Los centros de procesamiento celular requieren una alta inversión de dinero, por lo que lo habitual es que un centro trabaje para varios hospitales con el fin de ahorrar costes. Esto hace necesario el desarrollo de técnicas de transporte celular para poder tener puentes entre muchos hospitales y así permitir la propagación y estandarización de la medicina reenerativa.⁴

Uno de los sistemas utilizados para el transporte de cultivos hasta el momento ha sido el contenedor homotérmico portátil. Se trata de un contenedor que mantiene la temperatura y con el que se pueden realizar trayectos menores de 8 horas de duración.³⁰

El tipo de transporte de cultivos más utilizado es el transporte aéreo, ya que permite realizar trayectos de larga distancia en el menor tiempo posible. El inconveniente es que los contenedores homotérmicos no se pueden utilizar en este tipo de viajes y por ello está en desarrollo un contenedor de transporte celular que permita el transporte de cultivos por diferentes métodos manteniendo una temperatura y presión estable, además de evitar la contaminación.^{4, 30}

5.8 Direcciones futuras

La aplicación de la medicina regenerativa para tratar la patología corneal ha tenido un progreso extraordinario en los últimos 30 años.²⁴

Hay muchas investigaciones recientes en el campo de la medicina regenerativa de la superficie ocular mediante el uso de células madre, pero hay escasos productos médicos de ingeniería tisular aprobados. Además, aunque las investigaciones son prometedoras, no se ha creado un proceso estandarizado para llevar a cabo la terapia. Por esta razón, uno de los

principales puntos que se quiere abordar en un futuro próximo, es la estandarización de estos procesos. Solo una estrecha cooperación entre los científicos preclínicos y clínicos, las agencias reguladoras internacionales, las fuentes financieras gubernamentales y no gubernamentales, y la industria farmacéutica puede conseguir logros significativos que pueden llegar de manera efectiva a los pacientes afectados por patologías de la superficie ocular.^{4, 24}

En resumen, la principal dirección que se quiere tomar es la investigación en profundidad de las modalidades quirúrgicas propuestas a lo largo del trabajo, y el conocimiento del comportamiento de las células madre (los marcadores específicos por ejemplo), la matriz extracelular circundante y los factores de crecimiento beneficiosos. Todo esto proporcionará una base para un mayor desarrollo de tratamientos en los casos graves de daño de la superficie ocular.⁸

6. CONCLUSIONES

La medicina regenerativa es un campo relativamente reciente que puede traer grandes éxitos en casos graves de lesiones de la superficie ocular. Antes del desarrollo de esta ingeniería tisular, los medios frente a determinados daños de la superficie ocular eran escasos y no proporcionaban unos resultados realmente satisfactorios. Los últimos avances, han conseguido resultados más alentadores a corto y medio plazo, siendo la mejor opción para restaurar la función visual de algunos pacientes.

Los avances realizados en los últimos años en medicina regenerativa de la superficie ocular permiten tratar pacientes afectados tanto monocular como binocularmente, y pacientes tanto con daño parcial como con daño total, consiguiendo así una solución para los casos más graves y complejos. Además, gracias a la ingeniería de tejidos la escasez de donantes no es un problema tan grave, ya que la mayoría de métodos no requiere de un donante, sólo del propio paciente aunque este tenga dañados los dos ojos totalmente.

No obstante, a pesar de todas las ventajas mencionadas, el desarrollo de la medicina regenerativa en los últimos años presenta también algunos inconvenientes, como son la falta de procesos estandarizados para llevar a cabo estos trasplantes y los problemas de acceso a estos métodos dependiendo del lugar de origen de los pacientes y su nivel adquisitivo. Aunque se está trabajando en resolver estos problemas, es necesaria una mayor inversión en este campo para hacer llegar a los pacientes los últimos avances que puedan suponer una curación a sus problemas oculares.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Mejía LF, Amador-Patarroyo M; Anatomía y fisiología de la superficie ocular; En: Anaya JM, Sarmiento-Monrroy JC, García-Carrasco M; Síndrome de Sjögren. Segunda edición; Bogotá: Editorial Universidad del Rosario; 2017: Segunda Edición, Pág. 63-77.
2. Williams R, Lacey R, Kennedy S, Doherty K, Levis H. Biomaterials for regenerative medicine approaches for the anterior segment of the eye. *Adv Healthc Mater* [Internet]. 2018;7(10):1701328. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/adhm.201701328>.
3. Stern ME, Gao J, Siemasko KF, Beuerman RW, Pflugfelder SC. The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye. *Exp Eye Res* [Internet]. 2004;78(3):409–16. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014483503002586>.
4. Oie Y, Nishida K. Regenerative medicine for the cornea. *Biomed Res Int* [Internet]. 2013;2013:428247. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/428247>.
5. Hsu C-C, Peng C-H, Hung K-H, Lee Y-Y, Lin T-C, Jang S-F, et al. Stem cell therapy for corneal regeneration medicine and contemporary nanomedicine for corneal disorders. *Cell Transplant* [Internet]. 2015;24(10):1915–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.3727/096368914X685744>.
6. Oie Y, Nishida K. Corneal regenerative medicine. *Regen Ther* [Internet]. 2016;5:40–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reth.2016.06.002>.
7. Fernández A, Moreno J, Prósper F, García M, Echeveste J. Regeneración de la superficie ocular: stem cells/células madre y técnicas reconstructivas. *An Sist Sanit Navar* [Internet]. 2008 [cited 2022 May 2];31(1):53–69. Available from: https://scielo.isciii.es/scielo.php?%20script=sci_arttext&pid=S1137-66272008000100005&lng=es.
8. Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Koizumi N, Kinoshita S. Ocular surface reconstruction using stem cell and tissue engineering. *Prog Retin Eye Res* [Internet]. 2016;51:187–207. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.07.003>
9. Edgar L, Pu T, Porter B, Aziz JM, La Pointe C, Asthana A, et al. Regenerative medicine, organ bioengineering and transplantation. *Br J Surg* [Internet]. 2020 [cited 2022 May 2];107(7):793–800. Available from: <https://academic.oup.com/bjs/article/107/7/793/6094029?login=false>.
10. Baradaran-Rafii A, Eslani M, Haq Z, Shirzadeh E, Huvard MJ, Djalilian AR. Current and upcoming therapies for ocular surface chemical injuries. *Ocul Surf* [Internet]. 2017;15(1):48–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtos.2016.09.002>.
11. Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, Sotozono C, Kinoshita S. Current concepts and challenges in ocular surface reconstruction using cultivated mucosal epithelial transplantation. *Cornea* [Internet]. 2005;24(8):S32–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/01.icc.0000178739.37083.2c>.
12. Trunson A, McDonald C. Stem cell therapies in clinical trials: Progress and challenges. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2015;17(1):11–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2015.06.007>.
13. Yoon JJ, Ismail S, Sherwin T. Limbal stem cells: Central concepts of corneal epithelial homeostasis. *World J Stem Cells* [Internet]. 2014 [cited 2022 May 2];6(4):391–403. Available from: <https://www.wjnet.com/1948-0210/full/v6/i4/391.htm>.
14. Bonnet C, Roberts JS, Deng SX. Limbal stem cell diseases. *Exp Eye Res* [Internet]. 2021;205(108437):108437. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014483521000026>.
15. Caballero Aguilar LM, Silva SM, Moulton SE. Growth factor delivery: Defining the next generation platforms for tissue engineering. *J Control Release* [Internet]. 2019;306:40–58. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365919302846>.
16. Jirsova K, Jones GLA. Amniotic membrane in ophthalmology: properties, preparation, storage and indications for grafting-a review. *Cell Tissue Bank* [Internet]. 2017;18(2):193–204. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10561-017-9618-5>.

17. Selvam S, Thomas PB, Yiu SC. Tissue engineering: Current and future approaches to ocular surface reconstruction. *Ocul Surf* [Internet]. 2006;4(3):120–36. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1542012412700393>.
18. Camacho C, Rojas E. Platelet-rich fibrin membrane for pterygium surgery: Literature review and feasibility assessment. *Cureus* [Internet]. 2021 [cited 2022 May 2];13(9):e17884. Available from: <https://www.cureus.com/articles/69881-platelet-rich-fibrin-membrane-for-ptyerygium-surgery-literature-review-and-feasibility-assessment>.
19. Jester JV. Frontiers of ocular surface regenerative medicine. *Ocul Surf* [Internet]. 2016;14(2):81. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1542012416000124>.
20. O'Callaghan AR, Daniels JT. Concise review: limbal epithelial stem cell therapy: controversies and challenges. *Stem Cells* [Internet]. 2011 [cited 2022 May 2];29(12):1923–32. Available from: <https://academic.oup.com/stemcells/article/29/12/1923/6419982?login=false>.
21. Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Amemiya T, Kanamura N, Kinoshita S. Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol* [Internet]. 2004 [cited 2022 May 2];88(10):1280–4. Available from: <https://bjo.bmj.com/content/88/10/1280>.
22. Madhira SL, Vemuganti G, Bhaduri A, Gaddipati S, Sangwan VS, Ghanekar Y. Culture and characterization of oral mucosal epithelial cells on human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Mol Vis*. 2008;14:189–96.
23. Thoft RA. Keratoepithelioplasty. *Am J Ophthalmol* [Internet]. 1984 [citado el 2 de mayo de 2022];97(1):1–6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6364814/>.
24. Calonge, M., Nieto-Miguel, T., de la Mata, A., Galindo, S., Herreras, J. M., & López-Paniagua, M. (2021). Goals and challenges of stem cell-based therapy for corneal blindness due to limbal deficiency. *Pharmaceutics*, 13(9), 1483. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091483>.
25. ur-Rahman, A., & Anjum, S. (2015). *Frontiers in stem cell and regenerative medicine research* (Atta-ur-Rahman & S. Anjum, Eds.). BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS.
26. Yazdanpanah, G., Jabbehdari, S., & Djalilian, A. R. (2019). Emerging approaches for ocular surface regeneration. *Current Ophthalmology Reports*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s40135-019-00193-1>.
27. Calonge, M., Pérez, I., Galindo, S., Nieto-Miguel, T., López-Paniagua, M., Fernández, I., Alberca, M., García-Sancho, J., Sánchez, A., & Herreras, J. M. (2019). A proof-of-concept clinical trial using mesenchymal stem cells for the treatment of corneal epithelial stem cell deficiency. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 206, 18–40. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.11.003>.
28. Kundu B, Rajkhowa R, Kundu SC, Wang X. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(4):457–70.
29. Dhamodaran, K., Subramani, M., Ponnalagu, M., Shetty, R., & Das, D. (2014). Ocular stem cells: a status update! *Stem Cell Research & Therapy*, 5(2), 56. <https://doi.org/10.1186/scrt445>.
30. Oie, Y., Nozaki, T., Takayanagi, H., Hara, S., Hayashi, R., Takeda, S., Mori, K., Moriya, N., Soma, T., Tsujikawa, M., Saito, K., & Nishida, K. (2014). Development of a cell sheet transportation technique for regenerative medicine. *Tissue Engineering. Part C, Methods*, 20(5), 373–382. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2013.0266>.
31. Makuloluwa, A. K., Hamill, K. J., Rauz, S., Bosworth, L., Haneef, A., Romano, V., Williams, R. L., Dartt, D. A., & Kaye, S. B. (2021). Biological tissues and components, and synthetic substrates for conjunctival cell transplantation. *The Ocular Surface*, 22, 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2021.06.003>.
32. Stern, M. E., Gao, J., Siemasko, K. F., Beuerman, R. W., & Pflugfelder, S. C. (2004). The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye. *Experimental Eye Research*, 78(3), 409–416. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2003.09.003>.