UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH
Facultat d'Òptica i Optometria de Terrassa

GRAU EN ÒPTICA I OPTOMETRIA

TREBALL FINAL DE GRAU

BIOMATERIALS PER A LA REGENERACIÓ CORNEAL

Abril Ripoll Parella

Director: Pere Garriga Solé
Departament: Òptica i optometria

DATA DE LECTURA: juny 2020

Facultat d'Òptica i Optometria de Terrassa

Agraïments

En primer lloc m'agradaria agrair al meu tutor Pere Garriga Solé, qui tot i les circumstàncies actuals, m'ha guiat a l'hora de realitzar aquest treball i m'ha orientat i ajudat quan ho he necessitat.

Agrair també a tots els professors i companys de la facultat per fer que aquests quatre anys hagin estat un aprenentatge constant, tant acadèmicament com personal.

Finalment, unes paraules d'agraïment als meus familiars i amics, que sempre m'han donat suport i animat, gràcies per fer aquests mesos menys difícils.

GRAU EN OPTICA I OPTOMETRIA

Biomaterials per a la regeneració corneal

RESUM

Les patologies corneals són una de les principals causes de ceguesa al món. El tractament tradicional és un trasplantament de còrnia amb una còrnia de donant humà, i en casos més específics, la implantació d'una còrnia artificial. Aquests tractaments però, tenen limitacions importants: per una banda, hi ha una gran escassetat de donants corneals, el que genera llargues llistes d'espera, i per altra banda, tant en el trasplantament corneal com en la implantació de còrnies artificials hi ha un alt risc de complicacions i rebuig. Per aquest motiu, hi ha la necessitat de buscar una solució efectiva i cada vegada més grups d'investigació busquen aquesta solució a través de l'enginyeria tissular i la regeneració de teixits. En aquest treball, es fa una recerca bibliogràfica per identificar les principals limitacions de les opcions actuals de tractament, així com les opcions de regeneració corneal a través dels biomaterials més importants i amb més perspectives de futur. Aquestes estratègies de regeneració corneal són molt diverses i utilitzen biomaterials naturals, sintètics, o un barreges d'ambdós. En qualsevol cas, tot i els recents avenços en aquest camp, no s'ha trobat encara la tècnica ideal, però es preveu trobar-la en un futur proper, i segurament sigui una combinació de dues o més de les estratègies analitzades.

GRAU EN OPTICA I OPTOMETRIA

Biomateriales para la regeneración corneal

RESUMEN

Las patologías corneales son una de las principales causes de ceguera al mundo. El tratamiento tradicional es un trasplante de córnea con una cornea de donante humano, y en casos más específicos, la implantación de una cornea artificial. Pero estos tratamientos tienen limitaciones importantes: por una parte, hay escasez de donantes corneales, lo que genera largas listas de espera, y por otra parte, tanto en el trasplante de córnea como en la implantación de corneas artificiales hay un gran riesgo de complicaciones y rechazo. Por ese motivo hay la necesidad de buscar una solución efectiva y cada vez más grupos de investigación buscan esa solución a través de la ingeniería de tejidos i la regeneración corneal. En este trabajo se hace una revisión bibliográfica para identificar las limitaciones de los tratamientos actuales, así como las opciones de regeneración corneal a través de los biomateriales más importantes y con mayores perspectivas de futuro. Estas estrategias de regeneración corneal son muy diversas y utilizan biomateriales naturales, sintéticos o mezclas de los ambos. En cualquier caso, aunque los últimos avances en este campo son prometedores, no existe una técnica ideal, pero se prevé encontrar-la en un futuro próximo, seguramente como una combinación de dos o más de las estrategias analizadas.

GRAU EN OPTICA I OPTOMETRIA

Biomaterials for corneal regeneration

ABSTRACT

Corneal diseases are one of the most important causes of blindness in the world. The traditional treatments are corneal transplantation from a human donor, or in specific cases, implantation of an artificial cornea. But these treatments have several limitations: on the one side, there is a severe donor cornea shortage that generates long waiting lists, and on the other side, both the corneal transplantation and the implantation of an artificial cornea have a high risk of complications and rejection. For this reason, there is a need for an effective solution and increasingly more research groups are looking for this solution through tissue engineering and corneal regeneration approaches. In this work, an overview of the main limitations of the current treatment options, as well as the more relevant and promising future perspectives for corneal regeneration with biomaterials, is presented. These corneal regeneration approaches are diverse and use natural and synthetic biomaterials or a combination of both. In spite of all the recent advances in this field, the optimal approach has yet to be developed, but it is expected to be found in the near future, probably as a combination of two or more of the approaches analysed.

Índex

1. Introducció 8
2. Objectius 9
3. La còrnia 10
3.1. Bases anatòmiques 11
3.2. Transparència de la còrnia 12
4. Els biomaterials 13
4.1. Introducció als biomaterials 13
4.2. Biomaterials oftàlmics 14
4.3. Desenvolupament de biomaterials oftàlmics 15
5. Opcions actuals de reparació corneal 17
5.1. Queratoplàstia 17
5.2. Còrnies artificials sintètiques 20
5.2.1. Còrnia artificial AlphaCor™ 22
6. Enginyeria de teixits i medicina regenerativa en oftalmologia 22
7. Aproximacions terapèutiques 24
7.1. Estratègies cel·lulars 24
7.1.1. Cèl·lules per a la regeneració de l'endoteli 25
7.1.2. Cèl·lules per a la regeneració de l'estroma 26
7.2. Aproximacions basades en el suport 27
7.2.1. Biomaterials amb base de col·lagen 277
7.2.1.1. Suports derivats de l'estroma descel·lularitzat 29
7.2.1.2. Suports fabricats de col·lagen polimeritzat: Hidrogels de col·lagen 32
7.2.1.2.1. GelCORE 33
7.2.1.3. Suports fabricats de cèl·lules 36
7.2.2. Estratègies alternatives 366
7.2.2.1. Hidrogels de gelatina 37
7.2.2.2. Polímers 37
7.2.2.3. Pèptids similars al col·lagen 37
7.2.2.4. Reemplaçament de l'estroma amb fibroïna de la seda 37
8. Tendències futures 388
9. Conclusions 39
Bibliografia 400

Llistat d'abreviatures

CD45; Cúmul de diferenciació 45 *(Cluster of differentation 45)*

DAPI; 4',6'-diamidino-2-fenilindol

DSAEK; Extirpació de la membrana de Descemet amb queratoplàstia endotelial automatitzada (*Descemet stripping with automated endothelial keratoplasty*)

ECM; Mem

brana extracel·lular (*Extracelluar membrane)*

EDTA; Àcid etilendiaminotetraacètic

HCEC; Cèl·lules endotelials de còrnia humana (*Human corneal endothelian cells)*

IOL; Lents intraoculars (*Intra Ocular Lenses)*

OCT; Tomografia de coherència òptica *(Optical coherence tomography)*

pHEMA; Polihidroxietilmetacrilat

PMMA; Polimetilmetacrilat

PVA; Alcohol polivinílic

PVP; Polivinilpirrolidona

WHO; Organització mundial de la salut (*World Health Organization)*

1. Introducció

Segons la definició de ceguesa proposada per la Organització Mundial de la Salut (*WHO)*, s'estima que hi ha 45 milions de persones al món que pateixen ceguesa bilateral i 135 milions que tenen la visió severament afectada i deteriorada. Aquest elevat nombre no engloba els cents de milions de persones que tenen algun tipus de pèrdua visual monocular severa.

Les patologies que afecten a la còrnia són una de les principals causes de ceguesa al món, tant sols per darrera de les cataractes. L'epidemiologia d'aquestes patologies corneals és complicada i engloba una gran varietat de patologies infeccioses, inflamatòries, degeneratives o distròfiques. Tot i que la prevalença varia entre països, en general les úlceres corneals són la causa més comuna de ceguesa monocular en diverses regions. Altres causes importants que provoquen ceguesa d'origen corneal són la opacificació corneal secundària a patologies com el tracoma (malaltia ocular infecciosa causada pel bacteri Chlamydia), ferides i cicatrius corneals produïdes per traumes oculars, deficiència de vitamina A (sobretot en països del tercer món) i efectes secundaris o complicacions per l'ús de medicaments tradicionals emprats per tractaments oculars (1).

En l'última dècada el trasplantament de còrnia o queratoplàstia s'ha convertit en el mètode més utilitzat per al tractament de patologies corneals quan la transparència corneal ha quedat afectada, però sempre depenent de la disponibilitat de teixit corneal donant, el factor limitant més important d'aquest tractament. La còrnia és el teixit més trasplantat arreu del món, el que fa que els bancs d'ulls no puguin abastar la gran demanda i això produeix unes llargues llistes d'espera per al trasplantament corneal, sobretot en els països en desenvolupament (2). Aquesta falta de teixit fa que només hi hagi una còrnia disponible per a cada 70 pacients arreu del món. Un altre factor limitant important és el rebuig del teixit trasplantat, tot i que el rebuig immunològic a la còrnia és menor comparat amb altres òrgans sòlids trasplantats, en bona part gràcies a la seva avascularitat. Tot i així, un rebuig sever pot portar a la pèrdua visual permanent (3).

Degut a aquestes limitacions, hi ha una gran necessitat de buscar-ne solucions alternatives, pel que en els últims anys diversos grups de recerca investiguen en el camp de l'enginyeria de teixits per desenvolupar mètodes per a la regeneració corneal a partir de biomaterials, i així poder suplir l'escassetat de teixit cornal donant i el rebuig en el trasplantament, així com altres problemes més minoritaris. Els biomaterials utilitzats han de replicar l'estructura i funcionalitat de la còrnia nativa, i d'entre altres característiques, han de ser transparents i altament biocompatibles. Normalment s'utilitzen polímers naturals i sintètics.

Per aquest motiu, el camp de la enginyeria tissular per a la regeneració corneal té un gran pronòstic de futur i cada vegada més grups de recerca hi mostren interès. En aquest treball es fa una revisió dels mètodes actuals per al tractament de les patologies corneals, així com les seves limitacions, seguit d'una recerca de les opcions més actuals de tractament a través de la regeneració corneal. La majoria d'aquests mètodes són estudis que s'han realitzat *in vivo* només en models animals i, tot i presentar resultats prometedors, s'estan encara investigant i es necessita més recerca en humans per poder arribar a comercialitzar-los i aplicar-los en la pràctica clínica. Com que són mètodes que la majoria s'han assajat en laboratoris, animals o grups humans de població molt reduïts, estan en ple desenvolupament i s'espera que en un futur proper hi hagi més avenços interessants, pel que també es fa una previsió de les tendències futures en aquest camp.

2. Objectius

A la vista de la rellevància clínica del tema de les patologies corneals i de les diferents noves estratègies terapèutiques en aquest camp, l'objectiu general del treball ha estat fer una recerca bibliogràfica sobre la regeneració cornal amb l'ús de biomaterials com a tractament per a les patologies corneals severes.

Aquest objectiu general es desglossa en els següents objectius específics:

- Entendre l'estructura i funcions de la còrnia i cada una de les seves capes per així entendre el seu procés de curació i regeneració.

- Identificar les opcions terapèutiques vigents per a les patologies corneals severes, les seves limitacions i la necessitat de buscar alternatives viables que aportin solucions a les limitacions actuals
- Analitzar els principals mètodes de regeneració cornal a través de diferents biomaterials, tant naturals com sintètics, els seus avantatges i inconvenients i la seva viabilitat per ser comercialitzats.
- Conèixer les tendències futures de tractaments basats en la regeneració corneal a partir dels estudis actuals i la seva evolució

3. La còrnia

3.1. Bases anatòmiques

La còrnia és el teixit transparent que constitueix la capa fibrosa externa del globus ocular juntament amb l'escleròtica. Té aspecte de disc membranós amb forma de vidre de rellotge, amb un diàmetre horitzontal de 12 mm i vertical de 11 mm, i un gruix central de 0.5mm i perifèric de 1mm aproximadament.

Limita anteriorment amb les parpelles o amb el medi extern, zona on sempre està banyada per la llàgrima, mentre que posteriorment està banyada per l'humor aquós. En la seva vora perifèrica trobem el limbe esclerocorneal, un espai de transició amb la esclera en el que trobem les cèl·lules mare encarregades de la regeneració de les cèl·lules epitelials corneals.

La funció de la còrnia és tant refractiva com de barrera química i mecànica entre l'ull i el medi ambient. Està constituïda microscòpicament per tres capes: l'epiteli, l'estroma i l'endoteli, separades per la membrana de Bowman i la membrana de Descemet respectivament (*Fig. 1*)

La capa més externa de la còrnia és l'epiteli corneal, un epiteli estratificat, escamós i no queratinitzat, que consta de 4 a 6 capes de cèl·lules i representa el 10% del gruix corneal. És essencial per la transparència corneal i es troba en continua renovació al llarg de la vida a partir de a població de cèl·lules mare limbocorneals, que es troben en les capes

basals de l'epiteli limbocorneal. Seguidament trobem la membrana de Bowman, una estructura acel·lular que representa la capa superficial de l'estroma, formada per fibres de col·lagen organitzades a l'atzar que no es regeneren quan queden danyades. La següent capa és l'estroma, la capa més gruixuda, que ocupa al voltant del 90% del gruix corneal. Està compost bàsicament per fibril·les de col·lagen (71%), principalment de tipus I, orientades de manera regular (matriu extracel·lular). Entre les capes trobem una substància fonamental de proteoglicans amb una cèl·lula amb varis nuclis de queratòcits, que ocupen el 3-5% del volum estromal. La membrana que separa l'estroma de l'endoteli és la membrana de Descemet, una làmina basal grossa segregada per l'endoteli i composta per fibril·les de col·lagen entrecreuades. Finalment, l'endoteli està format per una única capa de cèl·lules hexagonals i té una funció vital en la turgència de la còrnia. No es regenera, pel que quan hi ha un descens de les cèl·lules endotelials degut a la edat, les cèl·lules properes són les que canvien per ocupar l'espai buit (4).

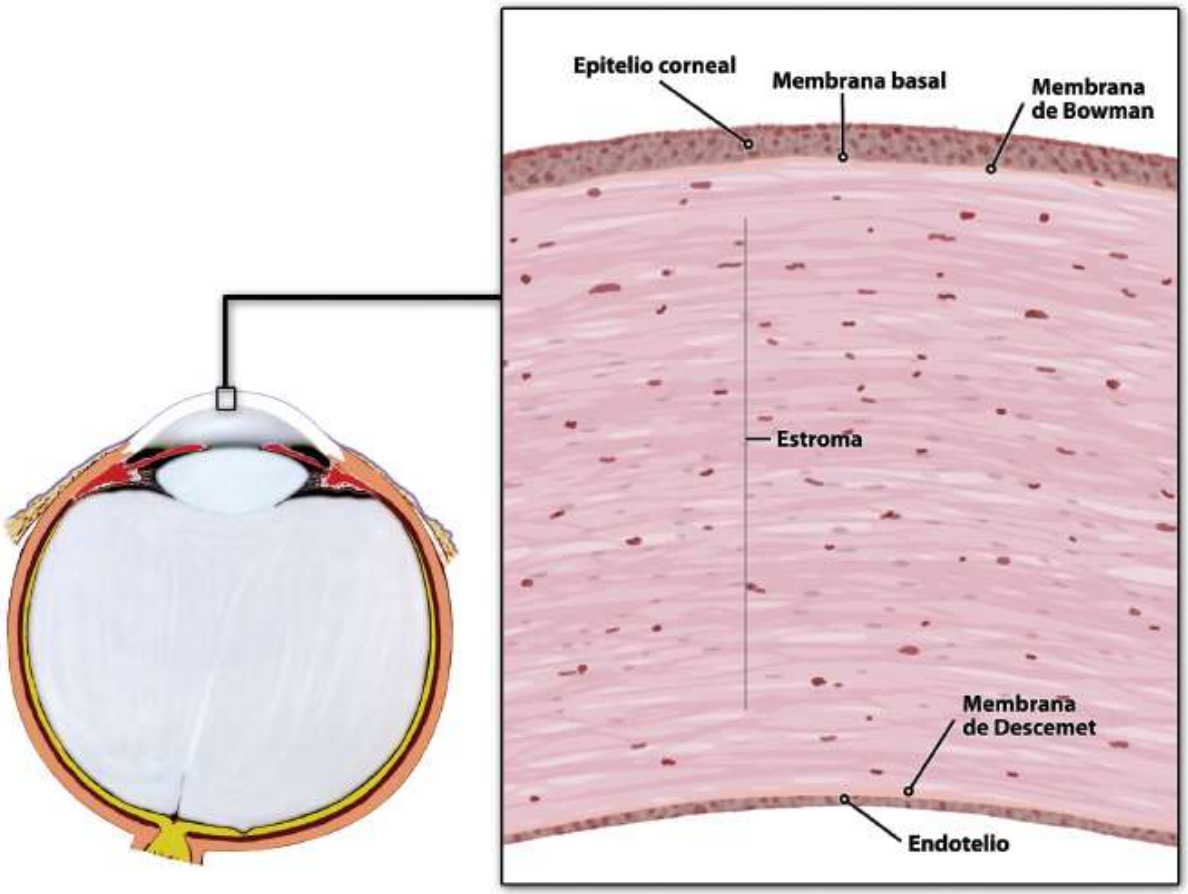

Figura 1. Imatge histològica d'una còrnia normal (200x). Poden diferenciar-se les diferents capes que la componen (4).

3.2. Transparència de la còrnia

La còrnia constitueix l'element més important del sistema òptic ocular gràcies a la seva transparència, la seva característica més important, que depèn de dos tipus de factors:

1. Factors anatòmics. Les cèl·lules epitelials han de mantenir una regularitat, els feixos de col·lagen han de ser fins i paral·lels i ha d'haver-hi avascularitat corneal.
2. Factors bioquímics. Ha d'haver-hi un alt grau d'hidratació tissular , és a dir, al voltant del 78% de la composició química corneal ha de ser aigua, ja que en absència de component aquós la còrnia s'edematitza i en conseqüència perd transparència.

Si aquests factors no es compleixen, no es manté la transparència corneal i per tant la còrnia no pot realitzar les seves funcions principals. Diverses patologies corneals (degeneració, distròfia, infeccions, trastorns inflamatoris, i danys mecànics o químics) són les causants de l'aparició d'opacitats permanents que alteren seriament l'agudesa visual o que deriven en complicacions (no infreqüents) que, si els queratòcits no són capaços de neutralitzar-ne el dany o si queden cicatrius, produeixen un deteriorament profund de la funció corneal i una conseqüent pèrdua visual. En aquests casos es necessita un reemplaçament de la zona danyada o, fins i tot, de tota la còrnia. Segons quines patologies, si es compliquen, poden arribar a ocasionar la pèrdua del globus ocular.

Segons Maurice (1960), la còrnia és transparent perquè, encara que l'estroma està constituït per dos medis diferents (col·lagen i substància fonamental amorfa), amb diferents índex de refracció, les fibres de col·lagen tenen un diàmetre regular i estan disposades també de manera regular amb espais interfibril·lars menors que el de la longitud d'ona de la llum. Quan la llum xoca amb les fibres i aquesta es dispersa, al mateix temps, és neutralitzada per interferències procedents de la llum dispersada per les fibres més properes. Gràcies a això, es minimitza la dispersió de la llum (*scattering*) i augmenta la transparència (5).

4. Els biomaterials

4.1. Introducció als biomaterials

El concepte de "biomaterial" té moltes definicions, però totes remeten a un mateix concepte. Un biomaterial es defineix, segons una proposta recent (Williams, 2014), com "una substància que ha estat dissenyada per prendre una forma que, sola o com a part d'un sistema complex, sigui utilitzada per dirigir, controlant les interaccions amb components de sistemes vius, el curs de qualsevol procediment terapèutic o de diagnòstic ". No obstant, el terme "biomaterial" també pot utilitzar-se per designar materials biològics (substàncies vives o materials d'origen natural). Així doncs, quan s'ha intentat posar d'acord els dos significats, es conclou que un biomaterial és "una substància, tan artificial com d'origen natural, utilitzada per crear aplicacions rellevants en sistemes vius (sovint amb finalitats terapèutiques), amb el consens general que aquests sistemes son principalment humans".

Durant els dos últims segles, s'han descrit una gran varietat de biomaterials nous, incloent metalls, minerals, ceràmiques, fusta, biopolímers i polímers sintètics.

L'objectiu principal en la recerca i desenvolupament d'aquests materials per a l'ús en medicina és imitar la gran versatilitat de les propietats dels materials naturals. En molts casos els materials creats en el laboratori no encaixen en les entitats les quals haurien d'augmentar o reemplaçar (molts cops per manca de biocompatibilitat), ja que els teixits i òrgans del cos són extremadament complexes. Aquesta situació òbviament és diferent del desenvolupament de materials per aplicacions industrials, on normalment els materials desenvolupats tenen un millor comportament que els seus homòlegs naturals (si existeixen). A més, aquests evolucionen relativament ràpid, ja que no existeixen obstacles com les limitacions biològiques que trobem en els sistemes vius (6).

Els biomaterials, actualment tenen diferents usos clínics. La majoria d'ells estan fets de plàstics considerats biocompatibles, i en molts casos, tenen la superfície modificada amb un revestiment d'un component cel·lular, normalment derivat de la matriu extracel·lular o un anàleg sintètic (7).

Durant molt temps, un rendiment final acceptable a curt termini era el requeriment principal d'un biomaterial, es prenia poca atenció en si es canviava la seva massa i/o les propietats de la seva superfície a través de la manipulació de la composició i/o estructura, per tal de maximitzar el resultat clínic. En les darreres dècades, però, han augmentat notablement els avenços en l'aproximació de les propietats i la funcionalitat dels biomaterials a les dels seus homòlegs naturals.

En quant al desenvolupament general en el camp dels biomaterials, habitualment s'ha calibrat a través del progrés en branques de biomaterials ortopèdics i, en menor mesura, biomaterials per cardiologia o odontologia, però el progrés dels biomaterials oftàlmics normalment és més ignorat o rarament presentat. No obstant, els biomaterials oftàlmics presenten algunes característiques particulars en quant al seu desenvolupament, que s'explicaran més endavant.

4.2. Biomaterials oftàlmics

Per poder col·locar un material a l'ull, aquest ha de ser transparent. Per tant, la transparència del material és una condició única i indispensable dels biomaterials oftàlmics. Per aquest motiu, la majoria de biomaterials són polímers sintètics, biopolímers (com a tals o modificats) i combinacions dels dos tipus, ja que els altres materials no són transparents.

Abans de la utilització de polímers, els materials emprats per a aplicacions oftàlmiques eren el vidre i el quars, tant en còrnies artificials com en lents de contacte. Altres materials opacs, com algunes ceràmiques, encara tenen usos minoritaris en l'ull, però sempre fora de l'eix visual (6).

La tecnologia dels biomaterials en oftalmologia ofereix una àmplia gamma de noves oportunitats per superar les limitacions actuals, aporta nous materials i nous dissenys. Un avantatge molt important de la regeneració corneal a través de biomaterials el trobem quan parlem de la producció. Es podrien produir els implants corneals que es necessitessin, proporcionant una solució a la escassetat de donants de còrnia arreu del món. A més, la fabricació controlada d'implants permetria un control de qualitat ajustat

i eliminaria el costós procés de qualitat pel que han de passar les còrnies dels donants, el que també ajudaria en la reducció de rebuig a la còrnia rebuda. Finalment, la forma dels implants corneals pot ser individualitzada i per tant garanteix millor resultats refractius postoperatoris. Fins i tot en un futur, es treballa perquè els implants siguin intel·ligents i puguin incorporar altres funcions per interactuar amb les cèl·lules corneals i amb els nervis, o fins i tot combatre agents infecciosos i inflamatoris (7).

4.3. Desenvolupament de biomaterials oftàlmics

Els biomaterials oftàlmics presenten algunes característiques particulars en quant al seu desenvolupament.

L'ull és un òrgan molt complex, encara que és més accessible a la observació mèdica i la manipulació quirúrgica que molts dels altres òrgans. Aquesta facilitat de manipulació explica el fet que el primer trasplantament de teixit donant que va tenir èxit en humans va ser el 1906 en l'ull, tot i que no està reconegut com el primer òrgan trasplantat d'un teixit humà donant a un receptor (reconeixement atorgat a un transplantament de ronyó el 1955). També l'ull va ser l'òrgan on es van implantar materials externs per primera vegada, el 1862, Onofrio Abbate va presentar experiments amb una còrnia artificial. Aquesta queratopròtesis estava feta d'un disc de vidre envoltat de dos anells, el primer fet de gutaperxa (trans-isòmer d'una goma natural provinent dels arbres) i el segon de caseïna (una barreja de fosfoproteïnes de la llet o el formatge), els dos polímers naturals, amb la intenció d'aconseguir un material diferent de l'utilitzat en la zona central per augmentar la biointegració. Tot i la bona idea inicial, el dispositiu final no va aconseguir obtenir gaires bons resultats (es va provar en còrnies animals i la pròtesis no durava més d'una setmana), conseqüència de la inadequada resposta dels materials en l'exposició a l'aire i a la llum (8).

El primer material fet per l'home utilitzat per a fer una pròtesis funcional va ser entre el 1889 i 1891. Dimmer va crear una còrnia artificial de cel·lulosa, que va ser implantada a quatre pacients, amb resultat desfavorable al cap de pocs mesos. La cel·lulosa, una barreja de nitrocel·lulosa (polímer modificat), càmfora (cetona terpènica) i agents

estabilitzadors, va ser el primer plàstic comercial desenvolupat al món, encara que no era del tot un polímer sintètic (9).

L'ús de materials 100% sintètics com a biomaterials per a implants oculars va arribar a partir del 1939 i 1941 amb gels de polivinil alcohol (PVA) (*Fig. 2)* , seguit de les primeres còrnies artificials de polimetilmetacrilat (PMMA) (*Fig. 3)* i finalment de les lents intraoculars (IOL) de PMMA desenvolupades per Ridley. Anys més tard, la polivinilpirrolidona (PVP) (*Fig. 4)*, un polímer sintètic soluble en aigua, va ser el primer de ser implantat en la cavitat vítria com un substitut de l'humor vitri.

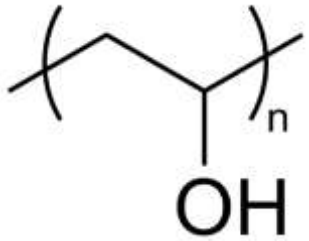

Figura 2. Unitat estructural del PVA (10)

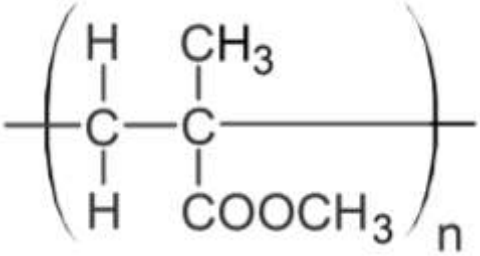

Figura 3. Unitat estructural del PMMA (11)

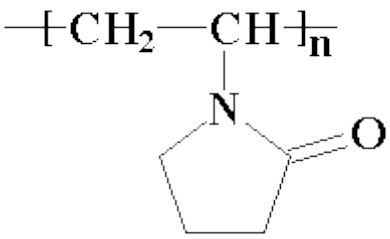

Figura 4. Unitat estructural del PVP (12)

El rang de biomaterials oftàlmics es va estendre significativament a partir del 1960, després de la introducció d'hidrogels sintètics (polímers que absorbeixen i retenen l'aigua sense dissoldre's en un medi aquós).

A mitjans dels anys 70, el camp dels biomaterials oftàlmics es va establir com una disciplina i la quantitat de científics investigant en aquest camp arreu del món està augmentant constantment des de llavors, encara que no tant com en altres branques relacionades amb els biomaterials (6).

5. Opcions actuals de reparació corneal

La ceguesa corneal tradicionalment es tracta amb transplantament de còrnia i, en casos severs, amb la implantació d'una còrnia artificial o queratopròtesis. Degut a l'escassetat de donants de còrnia i els riscos de les complicacions en implantar còrnies artificials, l'enginyeria de teixits en oftalmologia es centra més en estratègies de regeneració, utilitzant materials biocompatibles, ja sigui amb cèl·lules o sense.

5.1. Queratoplàstia

Tradicionalment, quan una còrnia malalta necessita ser substituïda, el teixit patològic és extret i reemplaçat per una còrnia d'un donant humà (transplantament de còrnia o queratoplàstia). Tot i que l'èxit general és alt (85-90%), aquest disminueix en pacients d'alt risc (13).

Hi ha tres tipus de queratoplàstia (*Fig.5*) : la queratoplàstia penetrant, en la que es trasplanta un botó corneal d'espessor complet (4), la queratoplàstia lamel·lar, on es separen les lamel·les que componen la còrnia trasplantant només l'epiteli i l'estroma, deixant l'endoteli del receptor (possible només quan el problema no resideixi en l'endoteli) i finalment la queratoplàstia endotelial, una tècnica novedosa que consisteix en trasplantar exclusivament la capa endotelial quan aquesta es troba alterada (14).

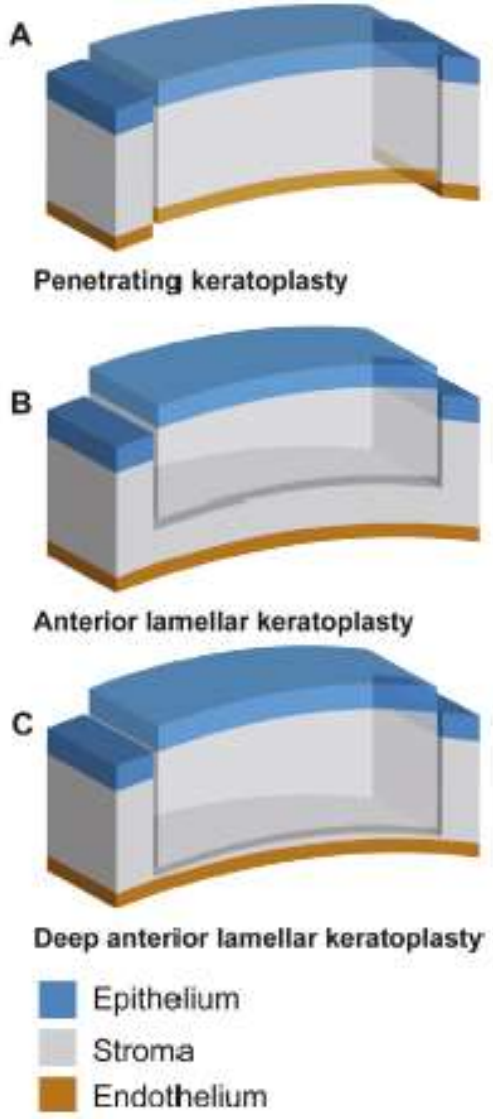

Figura 5. Esquema dels tres tipus de queratoplàstia més utilitzats, (A) queratoplàstia penetrant, la més utilitzada, on s'extreu tot el gruix corneal, (B) queratoplàstia lamel·lar i (C) queratoplàstia lamel·lar anterior profunda, en les quals l'endoteli no s'extreu (14)

El mètode més utilitzat sempre ha estat la queratoplàstia penetrant, tot i que presenta limitacions funcionals significatives, com per exemple les diferències que existeixen en el gruix i la curvatura de la còrnia del donant i el receptor, que resulten en astigmatisme que redueix la qualitat de visió. El procés d'integració de la còrnia donant pot durar com a mínim un any. A més, les sutures utilitzades (*Fig.6)* poden ser una font d'infeccions i inflamació i fins i tot, neovascularització, que incrementa el risc de rebuig. Per pacients d'alt risc (amb malalties inflamatòries o patologies severes, com cremades químiques, malalties autoimmunitàries, etc.) les possibilitats de complicacions pugen al 49%. Aquests pacients que presenten complicacions passen per més cirurgies, i per cada rebuig de trasplantament augmenten les possibilitats de pèrdua visual total irreversible. Les queratoplàsties lamel·lars s'estan utilitzant amb augment últimament amb cada cop millors resultats, però aquesta tècnica no es pot utilitzar quan tot el gruix de la còrnia està danyat (7).

Figura 6. Resultat final d'una queratoplàstia penetrant. Es poden observar les sutures (4)

A part de les limitacions explicades anteriorment, el major inconvenient dels trasplantaments corneals amb teixit donant es troba en la falta de teixit corneal donant adequat per dur a terme la queratoplàstia. Estats Units, seguit d'Espanya i Japó, són dels pocs països amb suficient capacitat d'obtenció de teixit donant corneal, altres països encara estan experimentant una falta de teixit per realitzar aquesta cirurgia (15). Aquesta disminució de la capacitat d'obtenir teixit desafortunadament no millora.

5.2. Còrnies artificials sintètiques

Les pròtesis corneals fetes de plàstic, conegudes com a queratopròtesis (*Fig. 7)* i més comunament anomenades còrnies artificials, es van desenvolupar per substituir les funcions mínimes de la còrnia, com la visió central i la protecció dels elements interiors de l'ull, quan aquesta esta alterada, i normalment són només per períodes limitats de temps (7).

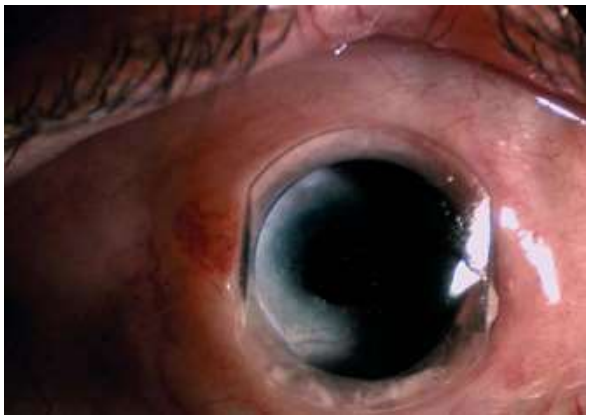

Figura 7. Queratopròtesis de PMMA de 2 peces implantada en l'ull d'un pacient (15)

La implantació d'una còrnia artificial és una alternativa al transplantament de còrnia, però no és una opció biomimètica i per tant no presenta molt bons resultats.

Molt abans que es consideres la opció del transplantament de còrnia d'un teixit de donant humà, ja es plantejaven diferents materials per substituir la còrnia anormal. El primer plantejament va ser de Guillaume Pellier de Quensgsy el 1789: reemplaçar una còrnia humana completament opaca amb un disc de vidre de forma convexa amb la vora de plata (16). No van haver-hi gaires avenços més fins a principis del 1950, quan el PMMA va començar a ser utilitzat per diferents cirurgians, tot i que amb resultats no massa bons a llarg termini (17). No va ser fins a mitjans dels anys 70 que van aparèixer tres tipus de queratopròtesis que proporcionaven resultats acceptables a mig termini, i van ser acceptades per el món de l'oftalmologia. Aquestes tres queratopròtesis van ser Dohlman-Doane, Strampelli i Cardona KPros, les quals presentaven una zona òptica rígida de PMMA, la superfície exterior de la qual estava ancorada a tot el seu voltant per el teixit utilitzat per cobrir l'entorn. Aquests dispositius van tenir èxit, però només es realitzaven a molt pocs centres especialitzats i en molt pocs casos, mentre que el

trasplantament de còrnia de donants humans estava tenint gran èxit i popularitat (18). Tot i així, les limitacions que ja s'han comentat sobre els trasplantaments de còrnia de donants humans han portat a la necessitat d'investigar més en el camp de la implantació de còrnies artificials.

Aquests primers dissenys amb components rígids, requerien una cirurgia complexa i tenien una alta incidència de complicacions, com la extrusió, la lisis estromal corneal, la pèrdua d'humor aquós, infecció, formació de membranes retroprotèsiques i glaucoma. Aquest fracàs a llarg termini es devia a la rigidesa, baixa humectació i falta de biointegració d'aquestes pròtesis.

Tenint en compte totes les limitacions anteriors, es va plantejar un model de queratoprotesis ideal: un botó artificial que pugui epitelitzar-se i ser implantat d'una manera similar a una queratoplàstia penetrant, on la còrnia danyada sigui extreta com un botó i substituïda. Perquè això sigui possible la pròtesis hauria de tenir dues parts nucli-vora, una zona òptica central rodejada d'una vora o "camisa" biointegrada, amb porus micronomètrics. Aquesta vora hauria de ser suficientment forta per poder ser suturada. A més, la superfície anterior hauria de permetre l'epitelització i alhora la inhibició de la migració epitelial cap a l'interior de la pròtesi. La superfície posterior hauria d'inhibir l'adherència cel·lular i la proliferació per així prevenir la formació de membranes retroprostètiques opaques. Finalment, hauria de ser permeable als nutrients i a l'oxigen, ja que s'ha d'intentar mantenir sense cap component cel·lular la zona central òptica. En aquest model ideal és amb el que s'estan basant els nous desenvolupaments de còrnies artificials (15).

Actualment hi ha quatre tipus de còrnies artificials comercialitzades: *Boston Keratoprothesis (B-KPro), Osteo-OdotoKeratoprothesis (OOKP), AlphaCor i KeraKlear Artificial Cornea.*

Tot i així, aquests tipus de pròtesis no permeten, avui en dia, la completa reepitelització i cap d'aquestes ha permès la reinnervació, una de les causes que pot ser més important en la futura pèrdua de visió.

5.2.1. Còrnia artificial AlphaCor™

En els últims anys hi ha hagut avenços significatius en moltes àrees de la còrnia artificial: l'AlphaCor™ (*Fig.8*), una còrnia protètica fabricada en pHEMA, que ha rebut l'aprovació en varis països. Aquesta queratopròtesis probablement és la més coneguda en l'actualitat(9). Es composa de pHEMA, i està íntimament adherit a una vora microporosa, de composició química similar i altament flexible. Aquest anell del voltant és opac i està dissenyat per permetre créixer als fibroblasts i el depòsit de matriu extracel·lular (composta principalment de col·lagen), ja que així es produirà una adhesió adequada i una integració dels teixits del voltant, sense utilitzar altres adhesions mecàniques. La part central és transparent i amb característiques òptiques refractives.

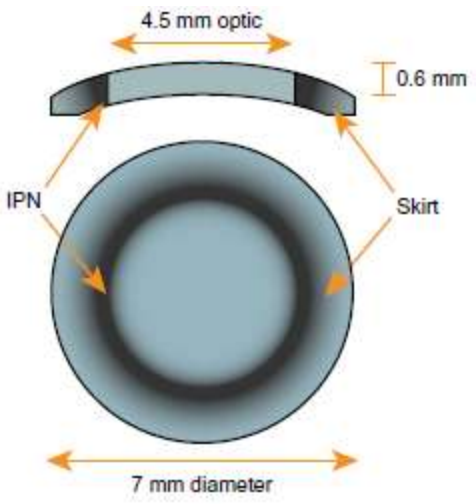

Figura 8. Esquema i dimensions de la còrnia artificial AlphaCor™ (18)

La implantació de la còrnia artificial AlphaCor™ és similar al procediment d'una queratoplàstia penetrant. Segueix dues fases (dues cirurgies). En la primera fase, el dispositiu es col·loca en l'estroma corneal en una espècie de butxaca lamel·lar, oberta posteriorment a la cambra anterior. Es fa un gran penjoll corneal superior per guanyar accés a l'estroma posterior. En aquesta fase, si hi ha poca epitelització o deficiència de cèl·lules mare, s'ha de fer també un penjoll conjuntival (*Fig. 9i)*. Si l'epiteli està sa, no és necessari el penjoll conjuntival (*Fig. 9ii)*. Després de la primera fase, el pacient ha de ser visitat regularment per fer un seguiment i comprovar que els teixits anteriors segueixen

intactes. Aproximadament tres mesos després de la primera fase, es realitza la segona. Durant la segona cirurgia, el teixit anterior al centre òptic també es treu, pel que el dispositiu passa a ocupar tot el gruix corneal, sense teixit corneal anterior o posterior a aquest.

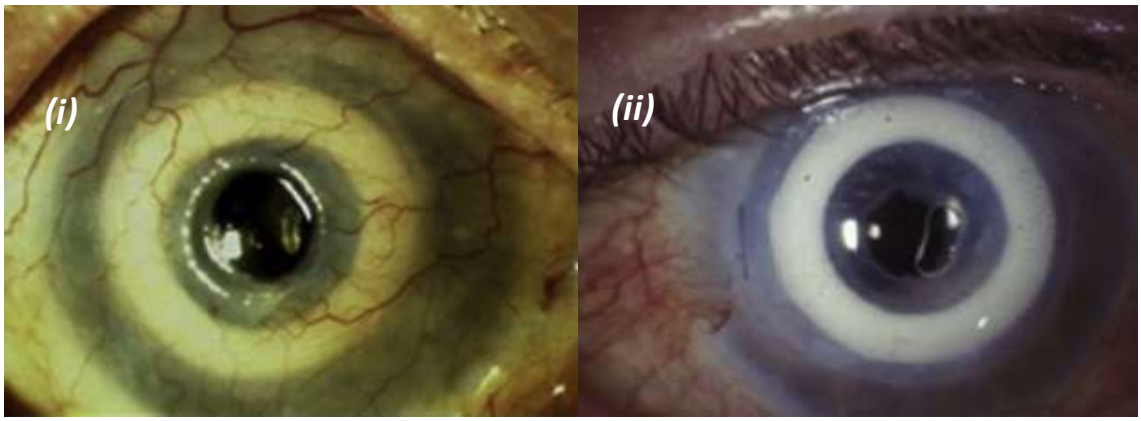

Figura 9. Inserció de AlphaCor™, (i) amb penjoll conjuntival (després de la segona fase) i (ii) sense penjoll conjuntival (després de la segona fase) (18)

Un cop implementada la queratopròtesis, la probabilitat de tenir complicacions és molt elevada, al voltant del 54%. Les complicacions més freqüents són la fusió de l'estroma, depòsits corneals, una mala biointegració i glaucoma. Segons el tipus de complicació s'ha de reemplaçar el dispositiu per un altre, passar a una queratoplàstia penetrant o, en casos severs, a la enucleació (18).

Tot i la millora en els últims anys, encara falten molts més estudis per aconseguir modificar la superfície d'aquestes queratopròtesis i promoure la capacitat de l'epiteli a adherir-s'hi. A més, com passa en altres tipus de pròtesis corneals, a dia d'avui no s'ha aconseguit la regeneració nerviosa, condició essencial per una funció corneal completa, ja que una falta d'innervació corneal és motiu habitualment de la pèrdua de visió.

6. Enginyeria de teixits i medicina regenerativa en oftalmologia

Les pròtesis i trasplantaments no són generalment vàlids com a estratègies de medicina regenerativa, ja que reemplaçar no és el mateix que regenerar. També és diferent el fet de reparar que el fet de regenerar. Quan hi ha algun teixit danyat, la resposta dels

mamífers adults pot ser la reparació espontània, que aconsegueix la curació d'una ferida mitjançant la contracció i formació de teixits cicatritzants, però és incapaç de restaurar la integritat original i la funció total. El procés de regeneració consisteix en la curació total sintetitzant els teixits o òrgans danyats o fins i tot perduts i recuperant la seva estructura i funció normals. Però la veritable regeneració d'òrgans sòlids no existeix en organismes de mamífers adults. En humans, només passa en els fetus durant els 6 primers mesos de gestació. En adults, els teixits només tenen una capacitat limitada de reparació espontània, només suficient per prevenir algunes infeccions o falta de mobilitat per culpa d'algun petit trauma.

Així doncs, la única alternativa viable és la regeneració induïda, la síntesi de teixits no capaços de regenerar-se per sí mateixos d'òrgans adults greument ferits amb la intenció de recuperar (totalment o parcial) la seva funció o estructura. Aquest tipus de regeneració fa temps que s'investiga i s'ha aplicat en teixits com la pell, nervis perifèrics, ossos, vàlvules del cor, cartílags, òrgans de la uretra, medul·la espinal i també per la còrnia i la conjuntiva. Tot i així, només alguns pocs productes estan comercialitzats i acceptats per al seu ús clínic, i la majoria d'aquests són per a la regeneració de la pell o de cartílag (6).

Aquest plantejament diferent i necessari que aporta l'enginyeria tissular i la medicina regenerativa, ha incentivat cada vegada a més grups de recerca a investigar el desenvolupament de reemplaçaments corneals efectius per evitar l'insuficient potencial d'aplicació de les còrnies artificial. Aquestes aplicacions poden conduir a complicacions severes i patologies secundàries, i a engreixar les llargues llistes d'espera per transplantaments de còrnia (actualment de més de 10 milions de pacients), conseqüència de l'escassetat de donants de còrnia.

Les prioritats en quant a propietats, a l'hora de buscar alternatives corneals són la transparència, la força del teixit i la biocompatibilitat per millorar la integració. La complexa estructura de l'estroma corneal fa que la seva recreació *ex vivo* sigui un gran repte.

S'han fet diversos intents per regenerar les còrnies humanes mitjançant un enfocament basat en l'enginyeria tissular, on s'ha regenerat la capa epitelial, estromal i endotelial de

la còrnia (19). Recentment s'ha avançat significativament en l'ús clínics de biomaterials per a aconseguir-ho. En general, hi ha dues estratègies principals:

i) La primera, és una estratègia basada en cèl·lules, en la qual les cèl·lules mateixes tenen el paper principal. L'epiteli i l'endoteli estan estretament associats a les capes basals de la còrnia *in vivo*, per tant la majoria de projectes d'aquest tipus estan enfocats a reemplaçar aquestes capes de cèl·lules. Per altra banda, l'estroma és una estructura rígida que ocupa el major gruix de la còrnia i està composat principalment de col·lagen tipus I, només el 10% del seu volum són cèl·lules, pel que les estratègies basades en cèl·lules són inadequades per regenerar l'estroma.

ii) La segona estratègia consta d'un enfocament basat en el suport, on l'objectiu és desenvolupar un substrat que imiti l'estructura desitjada, proporcionant suport a la població cel·lular que interessa. En aquest tipus d'estratègies és on es desenvolupen reemplaçaments biomimètics de l'estroma corneal, i podem trobar una àmplia gamma d'alternatives estromals basades en el suport (14). L'enginyeria tissular de la capa estromal de la còrnia presenta reptes particulars degut a les seves funcions especialitzades, de transmetre i enfocar la llum i mantenir la pressió intraocular (19).

7. Aproximacions terapèutiques

7.1. Estratègies cel·lulars

Com s'ha comentat anteriorment, aquest tipus d'estratègies s'utilitzen bàsicament per a la regeneració de l'epiteli i l'endoteli corneal, molt rarament per a la regeneració de l'estroma.

7.1.1. Cèl·lules per a la regeneració de l'endoteli

Les cèl·lules endotelials corneals humanes (HCEC) tenen una capacitat de proliferació limitada. L'extirpació de la membrana de Descemet amb queratoplàstia endotelial automatitzada (DSAEK), en la qual l'endoteli danyat i la membrana de Descemet són reemplaçats per l'estroma corneal posterior, la membrana de Descemet i l'endoteli d'un donant, és el principal mètode pel tractament de la deficiència de cèl·lules endotelials corneals, ja que obté millor qualitat visual postoperatòria i redueix els riscos associats amb la queratoplàstia penetrant (20). Aquest procediment però, requereix una donació de còrnia humana, i degut a l'escassetat de donants de còrnia nombrosos estudis estan experimentant amb el transplantament de capes de HCEC cultivades. Amb aquest nou mètode de tractament, diversos pacients amb disfunció endotelial corneal podrien rebre tractament utilitzant les cèl·lules d'un únic donant de còrnia. Per a obtenir aquests cultius de HCEC i que siguin comparables o millors que les còrnies de donants humans cal que tinguin una alta densitat cel·lular i cèl·lules normals hexagonals amb una funció endotelial adequada (*Fig. 10)*.

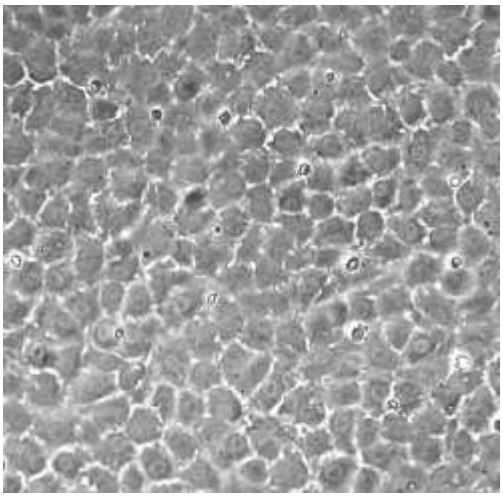

Figura 10. Imatge per microscòpia especular d'un cultiu de cèl·lules endotelials corneals humanes d'un donant de 65 anys. Es pot apreciar la forma hexagonal característica de les cèl·lules endotelials (21).

En el procés quirúrgic, es realitza una incisió central i es retira la membrana de Descemet de la càmera anterior. També a la càmera anterior s'insereix una fulla circular de HCEC orientades cap amunt, la qual es fixa a l'estroma posterior. Si aquesta fulla té dificultats en adherir-se, s'injecta una bombolla d'aire en la càmera anterior. La ferida

esclerocorneal es sutura amb punts. És una tècnica similar al procés clínic de la DSAEK. Aquest procés provat en animals per Mimura et al. demostra que als 28 dies després del trasplantament la còrnia es manté transparent i sense edema en l'estroma (*Fig. 11)*.

Figura 11. Fotografia del segment anterior vist amb biomicroscopi 28 dies després del transplantament amb HCEC cultivades en còrnies de conill. Hi ha una diferència significativa del gruix corneal, es veu una còrnia prima sense edema estromal (21)

Les recents innovacions en cirurgia DSAEK utilitzant HCEC cultivades amb l'objectiu de millorar l'escassetat de donants de còrnia són bones opcions pel tractament de determinades disfuncions, però calen diverses modificacions abans que es puguin aplicar clínicament. Primer de tot, la densitat i qualitat de les HCEC han de ser similars a les de la còrnia *in vivo*. En segon lloc, tot i que els primers cultius semblen ser de bona qualitat, s'hauria de realitzar un cultiu massiu amb capacitat de proliferació a llarg termini per aconseguir millorar l'escassetat de donants de còrnia. A més a més, com passa amb altres mètodes d'enginyeria tissular per a la regeneració d'òrgans, el transplantament de HCEC cultivades pot ocasionar problemes ètics que poden interferir amb el seu ús clínic (21).

7.1.2. Cèl·lules per a la regeneració de l'estroma

L'única manera d'aconseguir la regeneració estromal a través de l'estratègia basada en les cèl·lules està basada en que s'indueixi les cèl·lules mateixes a secretar la seva pròpia ECM i així formin estructures semblants a l'estroma.

Es coneix que l'àcid L-ascòrbic 2-fosfat (Asc-2P), un derivat de l'àcid L-ascòrbic (vitamina C), incrementa la secreció de col·làgens en cultius de cèl·lules de l'estroma corneal. En

l'experiment que van dur a terme *Guo et al.*, van aconseguir induir cèl·lules de l'estroma corneal a formar la seva pròpia matriu extracel·lular fibril·lar en cinc setmanes, estimulant les cèl·lules amb l'adició d'un derivat estable de la vitamina C. En aquest experiment es va concloure que els queratòcits humans cultivats amb un derivat estable de la vitamina C són capaços de crear una ECM compresa d'un conjunt de fibres de matriu extracel·lular paral·leles entre si (22). El resultat final, altament cel·lular, va ser morfològicament similar a l'estroma del mamífer del qual derivava la matriu inicial. Per això, aquest model proporciona una visió crítica sobre els processos fonamentals de la gènesi de teixits connectius organitzats com el de la còrnia

Altres grups de recerca han investigat l'ús d'una barreja de fibroblasts dèrmics i corneals, demostrant que l'estructura de l'estroma natiu es pot imitar mitjançant aquesta tècnica. Durant el procés, s'utilitza un camp magnètic per aconseguir la disposició paral·lela de les fibres de col·lagen (14).

7.2. Aproximacions basades en el suport

La selecció d'un suport que proporcioni una estructura en 3D per el creixement cel·lular i el manteniment de les funcions corneals és molt important per aconseguir aquests requeriments funcionals. Materials biodegradables com l'àcid polilàctic, l'àcid poliglicòlic, diferents tipus de col·làgens i la matriu de l'estroma corneal acel·lular són els materials més utilitzats per l'enginyeria corneal de l'estroma. De tots aquests, la matriu estromal acel·lular presenta interès especial ja que conté components naturals i l'estructura de l'estroma corneal (19).

7.2.1. Biomaterials amb base de col·lagen

Utilitzen suports de col·lagen entrecreuat, imitant l'estructura de l'estroma corneal natural. Quan es considera la creació de pròtesis corneals, l'estructura i la funció són igual d'importants. Com ja s'ha comentat anteriorment, el col·lagen (*Fig. 12)* té un paper molt important en l'estructura i funció de l'estroma corneal, ja que la majoria d'aquest

consisteix d'una ECM amb fibres de col·lagen tipus I ordenades regularment en capes ortogonals o làmines. Aquestes xarxes de fibres de col·lagen tenen un paper principal en mantenir l'estructura integral i la biologia de la ECM, alhora que son altament dinàmiques i es troben en fase de remodelació constant. A més de la seva funció com a estructura biomecànica, el col·lagen interactua directament amb les cèl·lules per influir en l'adhesió entre cèl·lules, el creixement cel·lular, la diferenciació i altres activitats cel·lulars, destacant la interacció amb factors de creixement i les citocines (proteïnes que coordinen la resposta del sistema immunològic) durant el desenvolupament i reparació dels teixits. Aquestes fibres de col·lagen tipus I estan intercalades en menor quantitat amb fibres de col·lagen tipus V i VI i varis proteoglicans específics, que afecten la formació i el creixement del col·lagen i proporcionen suport i organització a les fibres de col·lagen per complir els requeriments per la transparència corneal.

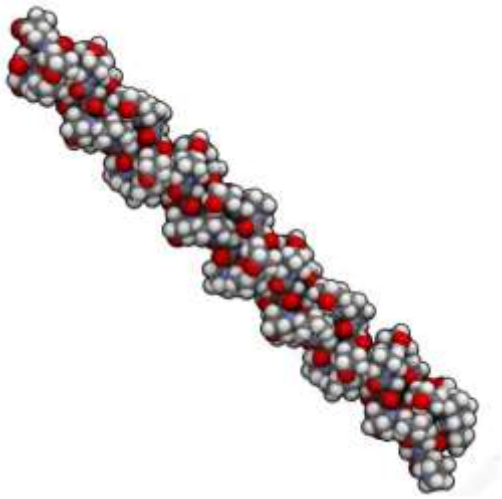

Figura 12. Model de l'estructura química de la proteïna de col·lagen. El col·lagen adopta una estructura característica de triple hèlix i és un component important de molts teixits (23).

Tot i que s'han descrit fins a 28 tipus diferents de col·lagen, només uns quants són utilitzats per produir biomaterials basats en col·lagen. Els col·làgens que formen fibril·les són els més utilitzats, predominant el col·lagen tipus I. Els col·làgens per matrius tissulars artificials són principalment obtinguts de fonts animals, ja que el col·lagen dels mamífers és molt similar entre espècie i per això hi ha baixa antigenicitat. El col·lagen tipus I és el material més adequat per implantar ja que molt poca gent hi presenta immunitat

humoral, i és molt senzill de detectar si el pacient pot desencadenar una reacció al·lèrgica (24).

Podem destacar dues estratègies generals per a la utilització del col·lagen com una proteïna biomimètica per la fabricació de suports, les dues amb l'objectiu comú de crear un substitut corneal ideal. La primera, a través de la descel·lularització, consisteix en agafar (de cadàvers o animals) tot el teixit connectiu d'una ECM rica en col·lagen i treure tots els components cel·lulars, al mateix temps que es manté una còpia de l'estructura del teixit requerit. Aquesta estratègia, anomenada *top-down*, tendeix a reduir la complexitat dels teixits natius. La segona estratègia es basa en la construcció molecular de blocs amb l'objectiu de muntar-los construint un suport. Aquesta segona estratègia és anomenada *bottom-up* i actua augmentant la complexitat del teixit utilitzant blocs de col·lagen simples (25).

7.2.1.1. Suports derivats d'estroma descel·lularitzat

La descel·lularització és capaç de mantenir l'estructura altament organitzada del teixit natural sense afectar-ne la composició i per tant la seva funció biològica (24). Aquest procés consisteix en l'eliminació de tots els components cel·lulars i cèl·lules del teixit, deixant simplement un suport de proteïnes de la ECM nativa, proporcionant així una estructura nativa de col·lagen per a la repoblació després de la implantació, amb taxes de rebuig potencialment reduïdes (14,24).

Hi ha múltiples tècniques per aconseguir produir aquests suports de matrius de col·lagen descel·lularitzat. Aquestes tècniques es classifiquen segons el mètode que utilitzen per aconseguir la descel·lularització: mètodes físics, químics o biològics (enzimàtics). Les tècniques que utilitzen mètodes físics ho fan a través de congelació instantània, que interromp les cèl·lules formant cristalls de gel, amb l'aplicació de pressió elevada, que provoca que les cèl·lules explotin, i finalment a través de l'agitació, que indueix a la lisis cel·lular (normalment s'utilitza en combinació amb mètodes químics per facilitar la penetració de molècules actives al teixit). En els mètodes químics s'inclouen una varietat de reactius que es poden utilitzar per eliminar el contingut cel·lular de la ECM com àcids,

tractaments alcalins, agents quelants (com l'EDTA), detergents iònics o no iònics i solucions d'osmolaritat extrema. Finalment, els tractaments biològics o enzimàtics també són utilitzats per produir suports acel·lulars, un exemple és la tripsina, que degrada proteïnes i nucleases que digereixen l'ADN i el l'ARN.

Tot i que la ECM utilitzada pot extreure's de diferents fonts, la diversitat de col·lagen descel·lularitzat es redueix degut a aspectes com la immunitat, la mida, la forma i la disponibilitat dels teixits. Normalment, es produeixen a partir de còrnies humanes o de porc, tot i que recentment s'han estudiat també les còrnies d'estruç, ja que tenen una forma i unes capacitats refractives comparables a les humanes (24). Una vegada realitzat el procés de descel·lularització de la còrnia, s'implanta al pacient amb defecte corneal mitjançant procediments quirúrgics (*Fig. 13*). Es crea un penjoll estromal i es retira la capa estromal danyada, es col·loca el teixit descel·lularitzat per capes i finalment es sutura el penjoll estromal (19).

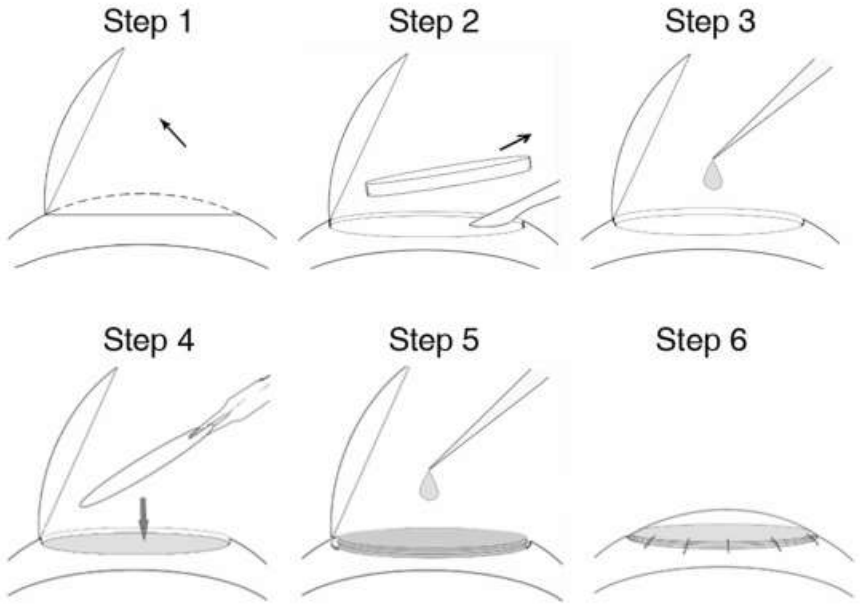

Figura 13. Procés quirurgicde la implantació d'un suport d'estroma descel·lularitzat amb diferentes capes per a la regeneració corneal. (Step 1) Es crea un penjoll estromal, (Step 2) s'extreu la part d'estroma corneal danyada mitjanánt queratoplàstia lamel·lar, (Step 3) es col·loca una capa de queratòcits en l'àrea danyada, (Step 4) es col·loca una làmina de teixit estromal descel·lularitzat, (Step 5) es col·loca una altra capa de queratòcits, seguit d'una làmina d'estroma descel·lularitzat i així seguit fins a completar les làmines de teixit descel·lularitzat, (Step 6) finalment es tanca el penjoll estromal i es sutura. (19)

El gran avantatge dels teixits descel·lularitzats és que aquests poden emmagatzemar-se durant llargs períodes, pel que els suports derivats de l'estroma descel·lularitzat milloren altament la logística que envolta el trasplantament corneal.

En analitzar les propietats mecàniques i estructurals, s'ha demostrat que l'estructura dels teixits descel·lularitzats té propietats histològiques, mecàniques i òptiques adequades, afavoreix el creixement de cèl·lules corneals i no presenta cap reacció immune després de la seva implantació en animals. Malgrat això, tots els teixits que s'han sotmès a processos de descel·lularització han presentat edema en l'estroma, caracteritzat per la separació de les lamel·les de col·lagen. Tot i així, cal més investigació per entendre l'impacte complet dels tractaments de descel·lularització en presència de components solubles de la ECM tant de l'estroma com de les membranes basals. A més a més, els teixits descel·lularitzats són sensibles a la temperatura i no poden ser esterilitzats mitjançant autoclau, de manera que requereixen processos d'esterilització alternatius. Aquest fet fa que no hi hagi una tècnica d'esterilització perfecta per els suports de col·lagen sense que aquests pateixin cap alteració molecular en la seva estructura.

Les còrnies descel·lularitzades han estat estudiades per diversos grups d'investigació i han aconseguit resultats prometedors en models animals. Tot i així, de moment cap dels mètodes mencionats anteriorment pot produir una ECM completament lliure de components cel·lulars, normalment es necessita una combinació d'aquestes tècniques per obtenir un material lliure de restes cel·lulars (24). Aquest problema és degut a l'estructura compacta del teixit, el que també fa que la matriu sigui poc porosa i per tant les cèl·lules epitelials tinguin dificultat a migrar en el suport. L'escàs creixement de queratòcits (epitelització) una vegada implementat el suport és problemàtic, i sense el creixement de queratòcits en la matriu a llarg termini els resultats utilitzant aquest tipus de suport per a la regeneració corneal són incerts (19).

7.2.1.2. Suports fabricats de col·lagen polimeritzat: Hidrogels de col·lagen

Aquests tipus de suports artificials basats en el col·lagen s'han desenvolupat com a alternatives al teixit natural decel·lularitzat, suposant que l'aplicació de principis d'enginyeria a sistemes biològics pot arribar a reproduir òrgans i cèl·lules. S'utilitzen suports sintètics formats per col·lagen natural o recombinat, bàsicament fibres de col·lagen tipus I, com ja s'ha descrit anteriorment (24). El col·lagen pot jugar un paper molt positiu en la regeneració de teixits, però degut a les seves baixes propietats mecàniques i l'alt grau de degradació te un ús limitat en aplicacions biomèdiques. Tot i així, la combinació de col·lagen amb altres polímers s'ha presentat com una solució alternativa per millorar el resultat final.

Els hidrogels són matrius de polímer 3D capaços de retenir grans quantitats d'aigua quan s'inflen, una funció que els fa similars als teixits biològics (26). Per això, aquest model de regeneració està basat en que l'estroma de la còrnia per si mateix es pot considerar un hidrogel en gran part compost de col·lagen. Els hidrogels de col·lagen són gels formats per una xarxa de col·lagen fibril·lar i requereixen ser reticulats per generar estructures fermes i rígides. Les tècniques d'encreuament són especialment importants pels biomaterials basats en col·lagen per millorar les propietats mecàniques i de resistència enzimàtica de cara a la implantació. Durant la última dècada s'ha estudiat molt el desenvolupament de bioreactors per la enginyeria tissular de la còrnia, i s'ha descobert que els hidrogels de col·lagen són més resistents a la dissolució enzimàtica quan estan formats a través de tècniques d'encreuament mecàniques. A més, les cèl·lules estromals són capaces de produir més col·lagen quan s'aplica un estímul mecànic de restricció al cultiu de cèl·lules dels hidrogels de col·lagen. Els bioreactors aconsegueixen aplicar estrès mecànic als hidrogels i controlar l'ambient de cultiu a la vegada (14,24).

Els biomaterials adhesius s'han presentat com una estratègia prometedora en el tractament de la pèrdua de l'estroma corneal i la seva regeneració (*Fig. 14)*, particularment en situacions d'emergència. Els biomaterials utilitzats com a teixit adhesiu per reparar i segellar la còrnia es classifiquen en dues classes: adhesius sintètics i adhesius naturals (on trobem els hidrogels de col·lagen). Els biopolimers naturals tendeixen a tenir una biocompatibilitat excel·lent, però solen tenir baixa estabilitat

mecànica i adhesió. Actualment no hi ha disponible cap gel adhesiu dissenyat per a la integració a la còrnia a llarg termini, tot i que hi ha comercialitzats gels adhesius per segellar incisions corneals, però no poden utilitzar-se per omplir defectes estromals. Tampoc hi ha cap hidrogel adhesiu que combini propietats de regeneració i adhesió i pugui imitar la curació normal del teixit normal. Per fer front a la necessitat d'un hidrogel adhesiu biocompatibles per a la reparació del teixit corneal, Shirzaei Sani et al. (27) van crear un biomaterial adhesiu basat en gelatina: GelCORE (*gel for corneal regeneration*), pensat per reparar defectes estromals de la còrnia a curt o llarg termini.

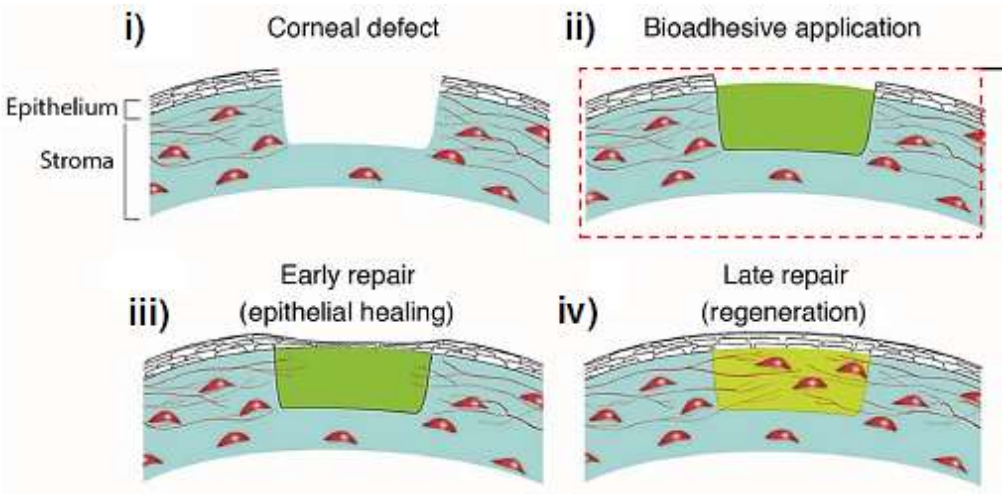

Figura 14. Diagrama esquemàtic de l'aplicació d'un hidrogel de col·lagen bioadhesiu per a la reparació d'un defecte de l'estroma corneal amb quatre fases: (i) formació del defecte estromal i queratoplàstia lamel·lar per extreure la part danyada, (ii) aplicació del gel bioadhesiu, (iii) regeneració de l'epiteli corneal i (iiii) regeneració completa de l'estroma (27).

7.2.1.2.1. GelCORE

Aquest hidrogel bioadhesiu està format d'una forma de gelatina modificada químicament i de fotoiniciadors, que poden ser reticulats després d'una curta exposició a la llum visible. Una vegada completat l'entrecreuament, es forma un hidrogel sòlid i transparent que s'adhereix fermament al teixit corneal, amb unes propietats mecàniques que imiten la rigidesa de la còrnia nativa.

Després de prometedors estudis *ex vivo* (*Fig. 15*), Shirzaei Sani et al. van implementar l'hidrogel *in vivo*, en un grup de conills blancs de Nova Zelanda (29).

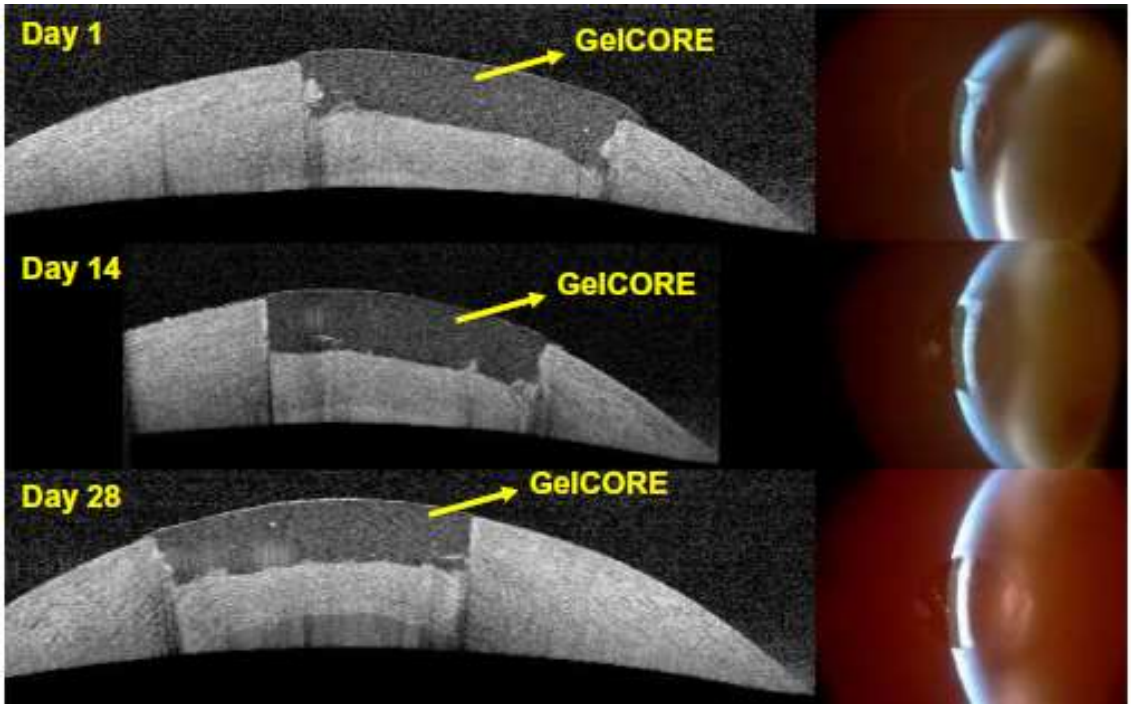

Figura 15. Imatges fetes amb OCT després de l'aplicació ex vivo de l'hidrogel bioadhesiu GelCORE en còrnies de conill fetes els dies 1, 14 i 28 després de l'aplicació. Es pot observar que amb el pas dels dies el gruix es manté regular i el gel bioadhesiu es manté completament adherit a la còrnia. Amb les imatges de la dreta, fetes amb biomicroscopi, veiem com la superfície es manté transparent i llisa, sense signes microscòpics de canvis e la forma (27).

Aquests conills se'ls va crear un defecte corneal d'un gruix del 50% de la còrnia, amb la finalitat d'avaluar la biocompatibilitat i biointegració del GelCORE per reparar i segellar els defectes corneals. Es va aplicar un 20% del precursor de l'hidrogel bioadhesiu en la zona del defecte corneal i seguidament es va fer la polimerització *in situ* amb llum visible durant quatre minuts. Immediatament després de la polimerització ja hi havia una adhesió ferma del gel bioadhesiu al defecte corneal. Un dia després de la cirurgia la superfície corneal es mantenia transparent i llisa, una situació que es mantenia 14 dies després de l'aplicació. També es va observar una reducció progressiva de la mida del defecte epitelial, el que significa una migració de l'epiteli per sobre de l'hidrogel. Al dia 14 de l'aplicació, el defecte epitelial de la còrnia estava completament curat (*Fig. 16)*. Els resultats demostren que no hi ha creixement de teixit inflamatori ni deposició de

càpsules de col·lagen fibrós al cap de 14 dies, fet similar al que passa amb la còrnia nativa. El gruix corneal obtingut també era similar al de la còrnia nativa.

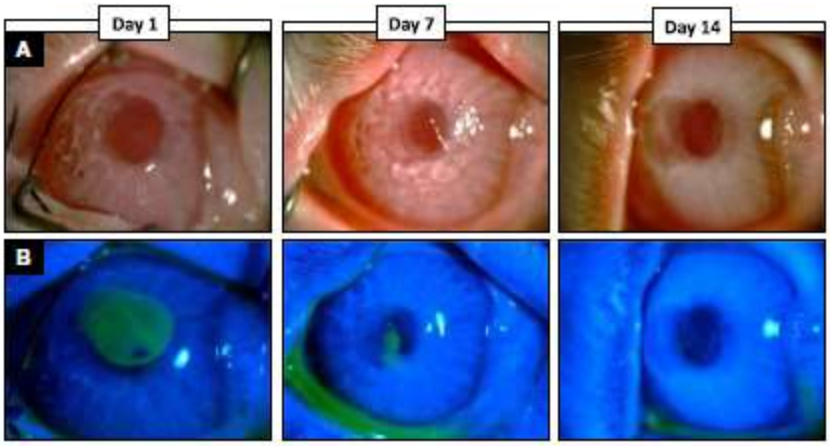

Figura 16. Epitelització corneal després de l'aplicació in vivo de l'hidrogel bioadhesiu GelCORE en defectes corneals en una còrnia de conill els dies 1, 7 i 14 després de la seva aplicació. (A) Fotografies fetes amb biomicroscopi, (B) Fotografies fetes amb biomicroscopi amb llum blau cobalt i fluoresceïna. Podem apreciar la reducció del defecte epitelial (àrea de color verdós al centre de la còrnia en les imatges (B)), el que implica la migració epitelial per sobre l'hidrogel. (Crèdits: Ahmad Kheirkhah, MEE, Harvard Medical School) (27)

Així doncs, una característica important de l'hidrogel bioadhesiu GelCORE és la seva habilitat per permetre una resposta regenerativa normal mentre que omple el defecte extret de l'estroma corneal, adaptant-se a la seva forma i geometria, presentant moltes similituds amb la còrnia nativa (*Fig.17*). Això fa que es produeixi una recuperació més ràpida dels pacients, redueix la necessitat de mesures de rehabilitació visual en un futur i en alguns casos eludeix el trasplantament corneal (27). L'estudi sobre el GelCORE presenta uns resultats amb molts avantatges, fent que sigui una substància amb prometedors resultats per l'ús en la regeneració corneal.

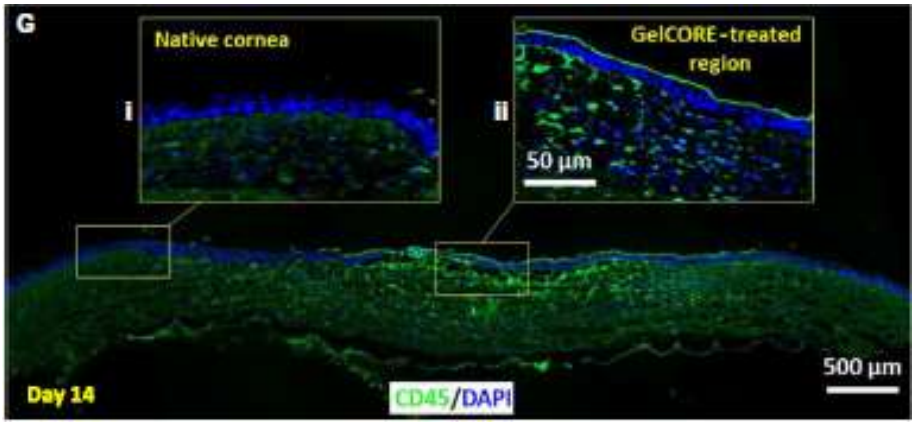

Figura 17. Imatges immunohistoquímiques fluorescents (marcadors DAPI i CD45) de l'àrea sense defecte de còrnia nativa (i) i de l'àrea de defecte estromal tractada amb GelCORE als 14 dies de tractament en una còrnia in vivo de conill. Es pot observar epitelització de la zona tractada similar a la còrnia nativa. S'observen infiltracions de leucòcits en la zona tractada, resposta inflamatòria normal en el procés de regeneració. També s'observen similituds entre els nuclis cel·lulars formats a la zona de teixit nova i els del teixit natiu (27).

7.2.1.3. Suports fabricats de cèl·lules

Els últims avenços en cèl·lules mare i biologia corneal han permès el desenvolupament d'estratègies sofisticades per recrear suports de col·lagen per a la regeneració corneal, una de les quals consisteix en plantilles 2D i 3D per controlar el comportament de les cèl·lules corneal, basades en l'estratègia *bottom-up* comentada anteriorment. Aquestes plantilles no només permeten que les cèl·lules s'adhereixin i proliferin, també dirigeixen el seu fenotip de manera que aquestes mateixes cèl·lules sintetitzin nova ECM amb propietats estructurals, bioquímiques, mecàniques i òptiques similars a la còrnia nativa. (22)

7.2.2. Estratègies alternatives

Utilitzen una àmplia gamma d'altres materials i tècniques per desenvolupar suports amb bones propietats mecàniques. Hi ha moltes tècniques amb una gran diversitat de materials, aquí presentem els més importants i més estudiats.

7.2.2.1. Hidrogels de gelatina

La gelatina és la forma desnaturalitzada del col·lagen, per tant és més propensa a la biodegradació i l'absorció, les majors limitacions del col·lagen *in vivo*. Aquests hidrogels poden ser fabricats a partir de dos polímers naturals de baix cost: la gelatina i l'alginat (29). Tot i que és una tècnica que encara no ha estat provada *in vivo*, aquests tipus de suports fets d'hidrogels de gelatina sembla presentar resultats prometedors per a futures aplicacions en la regeneració de l'estroma corneal, sobretot per la seva bona transparència òptica (14).

7.2.2.2. Polimers

També existeixen suports fets exclusivament de polímers utilitzats com a reemplaçaments estromals. Aquests poden ser basats en polièsters naturals biodegradables, suports d'àcid poliglicòlic combinat amb cèl·lules mare o polièsters fibrosos. Està demostrat que aquests tipus de suports ajuden al creixement cel·lular i produeixen reemplaçament estromals més o menys transparents. Els inconvenients més importants d'aquests tipus de suports són la força i el gruix, tot i que a sovint són superiors als suports basats en col·lagen. S'està reballant en poder millorar les tècniques de producció d'aquests polímers i així evitar aquests inconvenients en un futur.

7.2.2.3. Pèptids similars al col·lagen

Aquesta és una alternativa al col·lagen amb les mateixes característiques biològiques i fisicoquímiques. Són uns pèptids que formen un hidrogel suau, que a l'afegir-hi amino-àcids extra es torna més robust. Aquest tipus de suport s'ha provat *in vivo*, on als dotze mesos va aparèixer una lleu capa semi-opaca, però també innervació, integració cel·lular i deposicions de col·lagen tipus I i V (14).

7.2.2.4. Reemplaçament de l'estroma amb fibroïna de la seda

S'ha investigat la fibroïna de la seda com un reemplaçament per la membrana amniòtica, sovint utilitzada per a la regeneració corneal gràcies a les seves característiques. Les

membranes de la fibroïna són més transparent que la membrana amniòtica, tot i que la transparència disminueix a mesura que el gruix augmenta, pel que només es pot utilitzar per a suports per les cèl·lules limbals i esclerals, on la transparència no és crucial (30). Tot i així, alguns estudis demostren que combinada amb quitosà pot servir com a implant per a reemplaçar l'estroma (no queda transparent al moment de producció però en el transplantament esdevé més transparent, sense reaccions immunològiques i sense neovascularització) (31).

8. Tendències futures

Els avenços en les tècniques de visualització i histologia han suposat importants progressos en la comprensió de la estructura corneal, que han portat de tractar els danys corneals amb el transplantament de còrnia a la regeneració i reparació d'aquesta.

El camp dels biomaterials oftàlmics per a la regeneració i/o reconstrucció corneal és un camp relativament recent, en el qual cada vegada hi ha més avenços i més grups científics investigant. A més, el fet de que no hi hagi una solució suficientment efectiva fa que es segueixi investigant i augmenti la possibilitat que en un futur hi hagi nous avenços en aquest camp.

Tècniques de fabricació com la impressió 3D, combinada amb diferents avenços sobre la programació de cèl·lules mare i el disseny computeritzat permetran algun dia produir teixits personalitzats per ús clínic (6). Tot i així, en un futur proper sembla que els suports de col·lagen derivats d'animals seran l'avantguarda de la recerca en aquest camp, que a llarg termini avançaran cap a suports basats en cèl·lules humanes o suports completament sintètics per tal de millorar l'escassetat i els problemes d' immunitat (24).

Finalment, considerant el paper de les cèl·lules mare en la regeneració de teixits, s'espera que una gran part dels futurs estudis es focalitzi en el desenvolupament de cèl·lules mare en la regeneració i reparació de la còrnia (32).

9. Conclusions

La majoria dels tractaments exposats presenten resultats prometedors per a la curació de ferides en la superfície ocular, però en molts casos es deixen de banda les distròfies que afecten al gruix corneal sencer. Fins l'actualitat, la majoria d'estudis han treballat en introduir nous materials i tècniques bioquímiques per a la regeneració corneal, però sense prestar gaire atenció a les propietats físiques. Per això, els avenços en tècniques de visualització ajudaran a millorar la identificació de l'estructura física de la còrnia que, amb combinació amb la ciència dels materials donarà lloc a nous punts de vista en les estratègies actuals de tractament.

Com en totes les branques de l'enginyeria tissular, els resultats dels estudis *in vitro* no sempre proporcionen resultats 100% fiables i iguals que quan es realitzen *in vivo*. Com s'ha vist, molts dels estudis actuals són realitzats *in vitro*, pel que encara que tinguin resultats prometedors, caldria realitzar-los *in vivo* i en humans per conèixer si són tractaments efectius i segurs per a la seva aplicació clínica.

Cada tècnica té els seus avantatges, per això nombrosos grups de recerca que treballen en aquest camp estan enfocant-se sobretot en combinar diferents estratègies per aconseguir regenerar la còrnia mantenint-ne la transparència i funcionalitat. Totes les tècniques i estudis presentats són un exemple del ràpid progrés en el camp de l'enginyeria tissular corneal, pel que s'espera que, tot i que actualment no hi hagi una estratègia única de regeneració ideal que pugui solucionar totes les limitacions dels tractaments actuals, en un futur pròxim es pugui arribar a desenvolupar.

10. Bibliografia

1. J.P. Whitcher, M. Srinivasan, M.P. Upadhayay. Corneal blindness: A global perspective. Bulletin of the World Health Organization (2001), 79(3), 214-221
   DOI: 10.1590/S0042-96862001000300009
2. D.T.H. Tan, J.K.G. Dart, E. Holland, S. Kinashita. Corneal transplantation. The Lancet (2012), 379 (9827), 1749-1761
   DOI: 10.1016/S0140-6736(12)60437-1
3. Z. Chen, J. You, S. Cooper, C. Hodge, G. Sutton, J.M. Crook, G.G. Wallace. Biomaterials for corneal bioengineering. Biomedical Materials (Bristol)(2018), 13(3), 1-28
   DOI: 10.1088/1748-605X/aa92d2
4. A Fernández, J Moreno, F Prósper, M García, J Echeveste. Regeneración de la superfície ocular: stem cells/cèl·lules madre y técnicas reconstructivas. An. Sist. Sanit. Navar. 2008, Vol.31, Nº1, enero-abril
   DOI: 10.4321/s1137-66272008000100005
5. D. M. Maurice. The structure and transparency of the cornea. From the Medical Research Council Ophtalmedical Research Unit, Institute of Ophtalmology, Judd Street, London, W.C. J. Physiol. (1957) 136, 263-286
   DOI: 10.1113/jphysiol.1957.sp005758
6. T.V. Chirila, D.G. Harkin. An introduction to ophthalmic biomaterials and their role in tissue engineering and regenerative medicine. Biomaterials and Regenerative Medicine in Ophtalmology (2016), 1-14
   DOI: 10.1016/B978-0-08-100147-9.00001-8
7. M. Griffith, E. I. Alarcon, I. Brunette. Regenerative approaches for the cornea. Journal of Internal Medicine (2017), 280; 276-286
   DOI: 10.1111/joim.12502
8. D.F. Williams. The Williams Dictionary of Biomaterials. Liverpool University Press (1999)
   DOI: 10.5949/upo9781846314438
9. F. Dimmer. Notiz über Cornea arteficialis. Lkin. Monatsbl. Augenheilkd (1891) 29, 104-105

10. Figura 2: https://www.lifeder.com/alcohol-polivinilico/
11. Figura 3: http://polymerdatabase.com/Polymer%20Brands/PMMA.html
12. Figura 4: https://sidibeauty.blogspot.com/2015/05/diccionario-cosmetico.html
13. M. Griffith, E. I. Alarcon, I. Brunette. Regenerative approaches for the cornea. Journal of Internal Medicine (2017), 280; 276-286
    DOI: 10.1111/joim.12502
14. Steffi Matthyssen, Bert Van den Bogerd, Sorcha Ní Dhubhghaill, Carina Koppen, Nadia Zakaria. Corneal regeneraiton: A review of stromal replacements. Acta Biomaterialia 69 (2018) 31-41
    DOI: 10.1016/j.actbio.2018.01.023
15. C. Lahmann, J.L. Güell, M. Griffith, Fengfu Li, D. J. Carlsson, Yuwen Liu, D. Beuckert, E. Suuronen. Córnea artificial. Queratoplastia: Aspectos refractivos. (2005) Capitulo 16, 357-366
    https://secoir.org/~josepr23/sociedades/SECOIR/images/site/monografias/2005/2005-Cap%2016%20C%C3%B3rnea%20artificial.pdf
16. T. Chirla, C. Hicks. The origins of the artificial cornea: Pellier de Quengsy and his cotnribution to the modern concept of keratoprothesis. Gesnerus (1999) 56 (1-2) 96-106
    DOI: 10.5169/seals-520944
17. T. Chirla, G. Crawford. A controversial episodi in the history of artificial cornea: the first use of poly(methyl methacrylate). Gesnerus (1996) 53(3-4) 236-242
    ISSN: 00169161
18. G.J. Crawford. The development and results of an artificial cornea: AlphaCor™. Biomaterials and Regenerative Medicine in Ophthalmology (2016), 443-462
    DOI: 10.1016/B978-0-08-100147-9.00018-3
19. Xiao Yun Ma, Yun Zhang, Dan Zhu, Yang Lu, Guangdong Zhou, Wei Liu, Yilin Cao, Wen Jie Zhang, Alexander V. Ljubimov. Corneal Stroma Regeneration with Acellular Corneal Stroma Sheets and Keratocytes in a Rabitt Model. PLoS ONE (2015) 10 (7), 1-13
    DOI: 10.1371/journal.pone.0132705

20. T. Tourtas, K. Laaser, B.O. Bachmann, C. Cursiefen, F.E. Kruse. Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Versus Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty. American Journal of Ophthalmology (2012) 153 (6) 1082-1090
DOI: 10.1016/j.ajo.2011.12.012
21. T. Mimura, S. Yamagami, S. Amano. Corneal endothelial regeneration and tissue engineering. Progress in retinal and Eye Research 35 (2013) 1-17
DOI: 10.1016/j.preteyeres.2013.01.003
22. Xiaoquing Guo, Audrey E. K. Hutcheon, Suzanna A. Melotti, James D. Zieske, Vickery Trikaus-Randall, Jeffrey W. Ruberti. Morphologic characterization of organized extracellular matrix deposition by ascorbic acid-simulated human corneal fibroblasts. Investigative Ophthalmology & Visual Science (September 2007), Vol. 48, Nº 9, 4050-406
DOI: 10.1167/iovs.06-1216
23. Figura 12: https://es.123rf.com/photo_16083437_estructura-qu%C3%ADmica-de-una-prote%C3%ADna-modelo-de-col%C3%A1geno-el-col%C3%A1geno-adopta-una-estructura-caracter%C3%ADstica-de-trip.html
24. R.M. Gouveia, C.J. Connon. Collagen scaffolds for corneal regeneration. Biomaterials and Regenerative Medicine i Ophthalmology (2016), 151-177
DOI: 10.1016/B978-0-08-100147-9.00007-9
25. C.J. Connnon. Approaches to corneal tissue engineering: top-down or bottom-up?. Procedia Engineering 110(2015), 15-20
DOI: 10.1016/j.proeng.2015.07.004
26. Luís J. Del Valle, Angélica Díaz, Jordi Puiggalí. Hydrogels for Bioedical Applications: Cellulose, Chitosan, and Protein/Peptide Derivates. Gels (2017), 1-28
DOI: 10.3390/gels3030027
27. E. Shirzaei Sani, A. Kheirkhah, D. Rana, Z. Sun, W. Foulsham, A. Sheikhi, A. Khademhosseini, R. Dana, N. Annabi. Sutureless repair of corneal injuries using naturally derived bioadhesive hydrogels. Science Advances 5, eaav1281 (2019) 1-14

DOI: 10.1126/sciadv.aav1281

28. S.E. Shirzaei, R. Portillo-Lara, A. Spencer. Engineering Adhesive and Antimicrobial Hyaluronic Acid/Elastin-like Polypeptide Hybrid hydrogels for Tissue Engineering Applications. ACS Biomaterials Science and Engineering 82018) 4(7) 2528-2540 DOI: 10.1021/acsbiomaterials.8b00408
29. K. Tonsomboon, M.L. Oyen. Composite electorspun gelatin fiber-alignate gel scaffolds for mechanically robust tissue engineered cornea. Journal of the mechanical behavior of biomedical materials 21 (2013) 185-194 DOI: 10.1016/j.jmbbm.2013.03.00
30. E.S. Gil, B.B. Mandal, S. Park, J.K, Marchant, G. Fiorenzo, D.L. Kaplan, Helicoidal multi-lamellar features of RGD-functionalized silk biomaterials for corneal tissue engineerig, Biomaterials 31 (2010) 895/8963
31. L. Guan, P. Tian, H. Ge, X. Tang, H. Zhang, L. Du, P. Liiu. Chitosan-functionalized silk fibroin 3D scaffold for keratocyte culture, J. Mol. Histol. 44 (2013) 609 DOI: 10.1007/s10735-013-9508-5
32. M. Mobraki, R. Abbasi, S.O. Vandchali, M. Ghaffari, F. Moztarzadeh, M. Mozafari. Corneal Repair and Regeneration: Current Concepts and Future Directions. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology (2019) 7:135, 1-20 DOI: 10.3389/fbioe.2019.00135