



**Universidad de Valladolid**



# **CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES DE LA CONJUNTIVA PORCINA**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**Realizado por:**

Lorena Jiménez Hernández

**Tutora:**

Dra. Yolanda Diebold Luque

Valladolid, 1 de Julio de 2015



## AUTORIZACIÓN DEL TUTOR PARA LA EXPOSICIÓN PÚBLICA DEL TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

*(Art. 6.2 del Reglamento de la UVA sobre la Elaboración y Evaluación del Trabajo Fin de Máster)*

Dra. Yolanda Diebold Luque  
en calidad de Tutor/a del alumno/a

D. /Dña. Lorena Jiménez Hernández  
del Máster en: Investigación en Ciencias de la Visión

Curso académico: 2014/2015

CERTIFICA haber leído la memoria del Trabajo de Fin de Máster titulado “Cultivo y caracterización de células epiteliales en la conjuntiva porcina”  
y estar de acuerdo con su exposición pública en la convocatoria de Julio

En Valladolid a 30 de Junio de 2015

Vº Bº

Fdo.: Dra. Yolanda Diebold Luque  
El/La Tutor/a





## **APROBACIÓN DEL TRABAJO**

Este trabajo fue aprobado para su realización por la Comisión de Investigación del IOBA en su reunión del 22 de febrero de 2015, con número de registro 03/2015.

## **FINANCIACIÓN**

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la financiación del proyecto “Desarrollo de aproximaciones terapéuticas basadas en plataformas nanotecnológicas avanzadas diseñadas específicamente para combatir la ceguera corneal (NanoCorneal)”. Ministerio de Economía y Competitividad, MAT2013-47501-C2-1R. Entidades: IOBA de la Universidad de Valladolid y Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Santiago de Compostela. Investigador responsable: Dra. Yolanda Diebold Luque, Coordinadora. Duración: desde 01-01-2014 hasta 31-12-2017.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi tutora, la Dra. Yolanda Diebold Luque, por su atención, su dedicación y paciencia, y el apoyo tanto académico como moral en los momentos más difíciles.

Al Grupo de Superficie Ocular del IOBA, en especial a Antonio López, Mario Crespo, Laura Soriano, Laura García y Javier Calles por su ayuda y disponibilidad en el laboratorio.



## ÍNDICE

Resumen.....	7
1. Introducción.....	9
2. Justificación.....	13
3. Hipótesis.....	15
4. Objetivos.....	15
5. Material y métodos.....	17
5.1. Obtención de tejidos.....	17
5.2. Medios de transporte, de lavado y de cultivo utilizados.....	17
5.3. Procedimiento para el cultivo de los explantes epiteliales.....	20
5.4. Caracterización de los cultivos primarios.....	22
5.5. Análisis y fotografía.....	23
6. Resultados.....	25
6.1. Dificultades encontradas en la obtención de los cultivos.....	25
6.2. Medios seleccionados.....	26
6.3. Éxito de los explantes.....	27
6.4. Proliferación celular.....	30
6.5. Caracterización del cultivo.....	31
7. Discusión.....	33
8. Conclusiones.....	37
9. Bibliografía.....	39





## RESUMEN

La conjuntiva, tejido poco estudiado hasta el momento, está cobrando cada vez más protagonismo en el ámbito de estudio de las enfermedades de superficie ocular. Existen algunos modelos de conjuntiva humana para su uso en investigación fundamentalmente. Sin embargo, la dificultad para disponer de este tipo de tejido ha hecho que, en los últimos años, aumente el interés por el desarrollo de nuevos modelos a partir de tejidos animales.

El objetivo de este trabajo es el desarrollo y la puesta a punto de un protocolo para la obtención de cultivos primarios de células epiteliales a partir de explantes de conjuntiva ocular porcina, y su posterior caracterización con ayuda de marcadores de linaje celular.

Para conseguirlo, se utilizaron globos oculares porcinos cedidos por un matadero de Valladolid. Los globos fueron desinfectados y tratados con antibióticos y antifúngicos. Se plantaron explantes de tejido conjuntival y se obtuvo crecimiento de células primarias. Se utilizó la tripsinización diferencial para obtener un cultivo lo más puro posible de células epiteliales. La caracterización se llevó a cabo utilizando Ki67 como marcador de proliferación, Vimentina para los fibroblastos y E-cadherina y Citoqueratina 7 para la identificación de células epiteliales.

Los resultados mostraron en torno a un 55% de éxito en el total de explantes utilizados. Un 52% de las células se encontraban en fase proliferativa en pase 0. En cuanto a la caracterización por inmunofluorescencia, la vimentina estuvo presente en todas las muestras indicando, por lo tanto, que no se consiguió un cultivo puro sin contaminación de fibroblastos. En el pase 1 se observó marcaje positivo de algunas células para Ck7 y E-cadherina, ambos marcadores de células epiteliales.

Aunque con el presente estudio no se haya conseguido obtener una monocapa de células epiteliales pura, se han puesto las bases para futuras investigaciones sobre el desarrollo de cultivos de conjuntiva porcina.



## 1. INTRODUCCIÓN

Las superficies apicales de la córnea y la conjuntiva forman una barrera protectora que evita el paso de antígenos, alérgenos y sustancias irritantes, pero que permite un intercambio selectivo de moléculas con el entorno. Por lo tanto, la ruptura de esta barrera, tanto de forma aguda como crónica, puede conducir a una serie de trastornos de la superficie ocular, tales como ojo seco, alergias o infecciones [1].

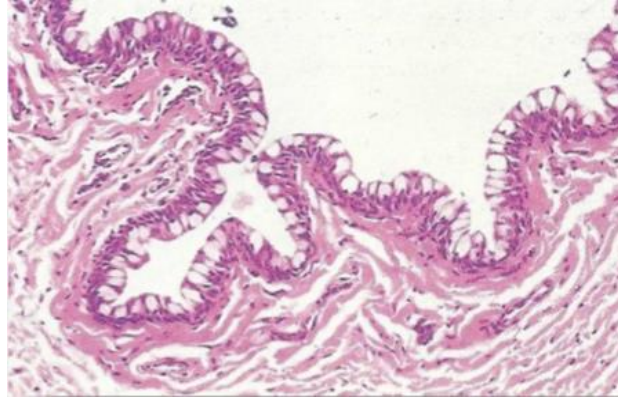
La córnea y la conjuntiva poseen un epitelio estratificado, escamoso y no queratinizado, con una solución de continuidad morfofuncional. A pesar de ello, existen grandes diferencias epiteliales y estromales: la conjuntiva posee células caliciformes mucosecretoras especializadas, [2] lo que hace que este epitelio se diferencie del de la córnea por la expresión genética de diferentes citoqueratinas, mucinas y los componentes del glucocalix [3].

Anatómicamente, la conjuntiva es la membrana mucosa que cubre la superficie ocular desde el limbo y la cara interna de los párpados hasta la unión mucocutánea. Histológicamente está formada por dos capas: el epitelio y el estroma (figura 1).

El epitelio, que es no queratinizado y estratificado, descansa sobre una membrana basal que lo separa del estroma. Las células epiteliales conjuntivales varían en la conjuntiva bulbar y en la palpebral, siendo el primero un epitelio pavimentoso estratificado de 5-8 capas y el segundo, de tipo mucoso cilíndrico de un espesor de dos células [4].

El epitelio conjuntival es autorrenovable, sus células madre se van diferenciando en células epiteliales a lo largo de la vida. Aunque aún no está completamente claro, parece que dichas células madre se localizarían en el fórnix y en la conjuntiva bulbar, y darían lugar tanto a células no caliciformes como a las caliciformes [5]. Estas células caliciformes se disponen en la superficie conjuntival o en pequeños espacios del epitelio, llamados criptas mucosas de Henle [6]. Se encargan, principalmente, de producir la mucina MUC5AC.

El estroma tiene dos capas: una profunda, gruesa, por la que discurren vasos y nervios, y otra más superficial, de un espesor igual al del epitelio. La mayor parte del estroma está formada por fibras colágenas y elásticas, y en su espesor hay linfocitos, histiocitos y plasmocitos [4].



**Figura 1. Histología de la conjuntiva.** Tejido humano. Epitelio estratificado con células caliciformes en la parte más superficial. Debajo del epitelio se sitúa el estroma.

Tomado de: Burkitt, HG., et al. Histología Funcional Wheater. 1997.

En cualquier patología que afecte a la superficie ocular es crucial evaluar el compromiso de los epitelios corneal y conjuntival, ya que ayudará con el pronóstico de recuperación de cada paciente. De ahí nace la importancia de poseer una caracterización fisiopatológica completa de dichos epitelios [7].

La mayoría de estudios *in vitro* sobre la conjuntiva se han realizado utilizando líneas celulares establecidas, como son la línea de células conjuntivales de Chang [8] y las Wong-Kilbourne, derivadas de la línea de Chang (American Type Culture Collection 20.2, Manassas, VA), la línea celular IOBA-normal human conjunctiva (NHC) [9] y la línea celular ConjEp-1/p53DD/cdk4R/TERT (HCjE) [10]. Aunque estas líneas celulares presentan muchas ventajas, como en la fácil disponibilidad y la homogeneización de resultados, son células aneuploides y, por ello, en muchos casos no representan fielmente al tejido del que provienen, sino que están condicionadas por mutaciones en el ADN que las distancian funcionalmente del tejido de origen. Y es ahí donde radica la importancia de utilizar cultivos primarios en los estudios *in vitro*. Estos se obtienen de una pequeña biopsia de tejido humano o animal, mantienen el cariotipo original y están formados por células más similares a las del tejido originario.

En el Grupo de Superficie Ocular del IOBA, el equipo de la Dra. Diebold investiga el desarrollo de modelos de estudios *in vitro* de aspectos fisiológicos y patológicos que representen la superficie ocular [11,12]. Actualmente, con la tesis doctoral de Laura García

Posadas, se ha desarrollado un modelo de conjuntiva tridimensional humana a partir de cultivos primarios [13].

Pese a que el procedimiento idóneo sería realizar estudios *in vitro* con biopsias humanas, lo cierto es que, en la actualidad, es muy difícil disponer de dicho tejido para la experimentación en las primeras fases de un estudio, a pesar de seguir la Declaración de Helsinki, la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y de obtener los permisos pertinentes.

La principal dificultad es su escasez. Es por ello que también se busca obtener cultivos primarios de tejidos animales. Se han establecido cultivos primarios de conjuntiva en varias especies, tales como rata [14], conejo [15], ratón y mono [16]. Es importante contar con distintos modelos animales, ya que estos, en ocasiones, tienen características diferentes a las de la especie humana. Es por ello que se debe elegir el modelo más apropiado para utilizar en cada investigación según el fin que se persiga.

En los últimos años, el uso de tejidos animales provenientes de mataderos o destinados a la alimentación se está incrementando como medida de reducción del uso de animales en investigación. Así lo contempla la legislación española sobre el uso de animales en experimentación, cuya última actuación fue el Real Decreto 53/2013 de 1 de Febrero. En él se potencia la aplicación del concepto de las “las 3Rs” referido a la reducción, el refinamiento y el reemplazo en el uso de animales de experimentación [17].

El cerdo es un animal muy utilizado en la investigación en ciencias de la visión. Además de por las ventajas que presenta la fácil adquisición de sus tejidos en mataderos, la principal razón es su gran similitud con el ser humano. El globo ocular porcino ha sido utilizado en estudios de enfermedades neuroretinianas [18], como modelo validado de glaucoma [19], en la cirugía de catarata [20] y en estudios de propiedades ópticas del ojo [21]. A pesar de existir diversos artículos que describen los parámetros morfológicos generales del globo ocular porcino [22], no hemos encontrado en la bibliografía ningún estudio que caracterice específicamente la conjuntiva de dicho animal.



## 2. JUSTIFICACIÓN

La conjuntiva es un tejido mucoso que cubre la superficie posterior de los párpados y se extiende hasta el limbo corneal. Pese al elevado número de enfermedades que afectan a este tejido, es uno de los menos estudiados a nivel ocular. Quizá este hecho se pueda explicar parcialmente por el gran salto que hay que dar entre los estudios *in vitro* e *in vivo*, ya que los modelos que hay disponibles actualmente de conjuntiva son líneas celulares que difieren bastante de las células de un tejido normal.

Los cultivos primarios se sitúan un escalón por encima de las líneas celulares conservando las características propias del tejido del que se extraen. Estos cultivos tienen un papel muy importante en el diseño de órganos y tejidos tridimensionales, forman un paso intermedio entre los estudios *in vitro* e *in vivo*, con gran repercusión en las fases iniciales de los proyectos de investigación.

En este campo, el Equipo de la Dra. Diebold tiene experiencia en el diseño de nuevos modelos *in vitro* para la experimentación. Durante los últimos años, ha desarrollado un modelo de conjuntiva tridimensional humana y, para ello, han depurado técnicas y conseguido aislar diferentes tipos celulares a partir de cultivos primarios.

Debido al gran valor de los tejidos humanos, existen numerosas dificultades, tanto administrativas como éticas, para su obtención y el consiguiente uso en investigación. Como alternativa al uso de material humano surgen los modelos *in vitro* de experimentación preparados a partir de tejido animal.

El uso de animales para la investigación también está regulado estrictamente y se busca seguir la regla de las 3Rs: Reemplazar los experimentos con animales siempre que sea posible, Reducir el número de animales necesarios en cada experimento y Refinar los procedimientos experimentales así como los cuidados de los animales.

Cada vez es más frecuente el uso de tejido porcino en experimentación, por su fácil adquisición, la disminución del sacrificio animal exclusivo para uso en investigación y la gran similitud que tienen muchas de sus estructuras con las del ser humano. En el caso concreto de las ciencias de la visión, este modelo se está utilizando bastante en los últimos años.

Por todo esto, creemos que sería de gran utilidad el desarrollo de un protocolo para el cultivo primario células epiteliales de conjuntiva porcina y la caracterización de las mismas.



Consideramos que dicho protocolo puede adquirir una gran importancia en numerosas aplicaciones, tanto en investigaciones futuras como en el desarrollo de modelos tridimensionales más complejos y realistas, siguiendo la trayectoria del Grupo de Superficie Ocular del IOBA.

### **3. HIPÓTESIS**

Es posible obtener una monocapa de células epiteliales a partir de cultivos primarios de conjuntiva porcina y caracterizarla con marcadores de linaje celular, de la misma forma que está descrito con tejido conjuntival humano.

### **4. OBJETIVOS**

#### **Objetivos generales**

- Desarrollo de un protocolo de cultivo para la obtención de una monocapa de células epiteliales a partir de explantes de conjuntiva porcina.

#### **Objetivos específicos**

- Poner a punto los medios de transporte, de lavado y de cultivo de los globos oculares y biopsias conjuntivales.
- Depurar el cultivo para obtener una monocapa de células epiteliales de conjuntiva porcina.
- Determinar el éxito de los explantes así como la capacidad proliferativa de las células.
- Caracterizar el cultivo mediante inmunofluorescencia utilizando marcadores que funcionan en epitelio humano, tales como, E-Cadherina, Vimentina y Citoqueratina 7.



## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1. Obtención de tejidos.

Para la realización de este trabajo se utilizaron explantes de conjuntiva porcina de globos oculares de animales recién sacrificados. Los globos oculares porcinos se obtuvieron del matadero local Justino Gutiérrez S.L., que tiene firmado un convenio con el IOBA.

Se han utilizado un total de 40 globos oculares, distribuidos por semanas (dos globos oculares cada semana).

Los globos oculares fueron transportados a los laboratorios del IOBA en un medio de transporte (ver punto 5.2). Allí, fueron limpiados y desinfectados para, posteriormente, extraer la conjuntiva y preparar los explantes.

### 5.2. Medios de transporte, de lavado y de cultivo utilizados.

Aunque se contaba con medios ya establecidos y probados en el Instituto, el hecho de que el órgano se obtuviera en un matadero, unido a que la conjuntiva es un tejido con flora bacteriana propia, hizo presente la aparición de contaminación en los cultivos.

Para evitar dicha contaminación se probaron diferentes combinaciones de medio de transporte, de lavados y de cultivo.

- Medio de transporte: utilizado para transportar los globos oculares desde el matadero hasta el laboratorio. La tabla 1 resume todas las condiciones del medio de transporte probado. Este medio llevaba antibióticos, penicilina/estreptomicina (Invitrogen-GIBCO, Inchinnigan, Reino Unido) y el antimicótico, Fungizona (Invitrogen-GIBCO).

Además se probaron dos condiciones añadiendo Gentamicina al 1% (Invitrogen-GIBCO), antibiótico más potente cuyo uso sólo está indicado cuando han fallado los demás, y Antimycoplasma (Mycoplasma Removal Agent, AbD Serotec, Oxford, Reino Unido), para tratar el *Mycoplasma*.

**Tabla 1. Medios de transporte probados.** Componentes de las condiciones utilizadas en el medio de transporte desde el matadero. En azul las modificaciones con respecto a la condición inicial.

MEDIOS DE TRANSPORTE PROBADOS		
Condición 1	Condición 2	Condición 3
Medio DMEM + Glutamax 1,5% penicilina (5.000 IU/ml)/ estreptomicina (5.000 µg/ml) 1% Fungizona	Medio DMEM + Glutamax 1,5% penicilina (5.000 IU/ml)/ estreptomicina (5.000 µg/ml) 1% Fungizona <b>1% Gentamicina</b>	Medio DMEM + Glutamax 1,5% penicilina (5.000 IU/ml)/ estreptomicina (5.000 µg/ml) 1% Fungizona <b>0,1% Antimycoplasma</b>

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium (Invitrogen-GIBCO).

- **Lavados:** se realizaron varios lavados ya en el laboratorio para desinfectar la muestra. La tabla 2 resume todas las condiciones de lavados probadas. En otros estudios llevados a cabo por el grupo con globos oculares porcinos se realizaban tres lavados, uno con una solución de Betadine y dos con una solución de antibiótico y antimicótico, que se corresponde con la condición 1 de la tabla 2. Sin embargo, la aparición de contaminación microbiana en los cultivos hizo que se probasen diferentes combinaciones, añadiendo, en algunos casos, un cuarto lavado y disoluciones con Gentamicina y Antimycoplasma.

**Tabla 2. Condiciones de lavado probadas.** Se muestran distintas composiciones de las soluciones de lavado. En azul las diferencias con respecto a la condición 1.

	CONDICIONES DE LAVADO PROBADAS				
	Condición 1	Condición 2	Condición 3	Condición 4	Condición 5
1 <sup>er</sup> Lavado	PBS 2% Betadine	PBS 2% Betadine	PBS 2% Betadine	PBS 2% Betadine	PBS 2% Betadine
2 <sup>o</sup> Lavado	PBS 1% Anti-Anti	PBS 1% Anti-Anti	<b>PBS</b> <b>2% Betadine</b>	PBS 1% Anti-Anti	PBS 1% Anti-Anti <b>0,1% Anti-M</b>
3 <sup>o</sup> Lavado	PBS 1% Anti-Anti	PBS 1% Anti-Anti	PBS 1% Anti-Anti	PBS 1% Anti-Anti	PBS 1% Anti-Anti <b>0,1% Anti-M</b>
4 <sup>o</sup> Lavado		<b>PBS</b> <b>1% Anti-Anti</b>	PBS 1% Anti-Anti	<b>PBS</b> <b>1% Gentamicina</b>	

**PBS:** solución salina tamponada con fosfato, **Anti-anti:** Antibiótico-Antimicótico,

**Anti-M:** Antimycoplasma

- **Medio de cultivo:** se añadió para mantener los explantes en cultivo en las mejores condiciones (tabla 3). Se incorporó, en algunas condiciones, Gentamicina, antibiótico citado anteriormente, y también Antimycoplasma. En este caso, se añadió, además, medio condicionado de células madre mesenquimales (compuesto por DMEM + Glutamax, Gibco, FBS al 2% y penicilina/estreptomicina al 2%). Este medio había estado en contacto por lo menos 2 días con este tipo de células y tiene, según se cita en la literatura, propiedades bactericidas [23]. Se recogía el medio, se centrifugaba a 1.200 rpm y se congelaba a - 80°C.

**Tabla 3. Medios de cultivo probados.** En azul los cambios realizados con respecto a la composición del medio de cultivo inicial (Medio I).

<b>MEDIOS DE CULTIVO PROBADOS</b>	
Medio I	RPMI 10% FBS 2mM L-glutamina 100µg/ml penicilina/estreptomicina
Medio II	RPMI 10% FBS 2mM L-glutamina 100µg/ml penicilina/estreptomicina <b>10µg/ml Gentamicina</b>
Medio III	RPMI 10% FBS 2mM L-glutamina 100µg/ml penicilina/estreptomicina <b>300µl Medio condicionado</b>
Medio IV	RPMI 10% FBS 2mM L-glutamina 100µg/ml penicilina/estreptomicina <b>200µl Medio condicionado</b>
Medio V	RPMI 10% FBS 2mM L-glutamina 100µg/ml penicilina/estreptomicina <b>0,1% Antimycoplasma</b>
Medio VI	RPMI 10% FBS 2mM L-glutamina 100µg/ml penicilina/estreptomicina <b>10µg/ml Gentamicina</b> <b>0,1% Antimycoplasma</b>

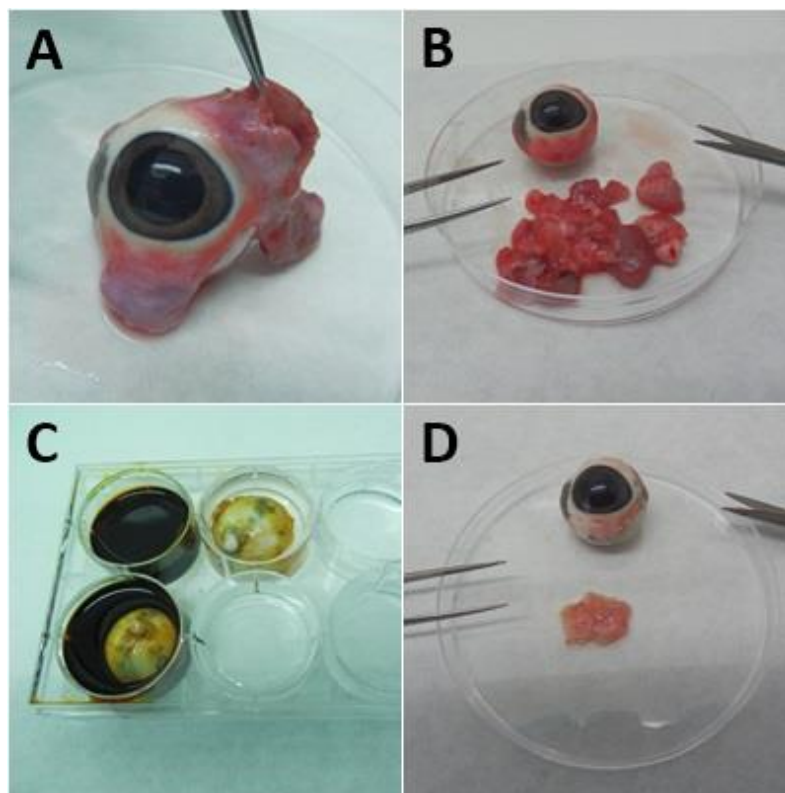
**RPMI:** Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (Invitrogen-GIBCO); **FBS:** Suero fetal bovino (Invitrogen-GIBCO)

### 5.3. Procedimiento para el cultivo de los explantes epiteliales.

Los globos oculares fueron transportados a los laboratorios del IOBA desde el matadero en los diversos medios citados anteriormente (tabla 1) generalmente de dos en dos. Una vez en el laboratorio, fueron limpiados, utilizando tijeras y pinzas (figura 2) A y B). En este proceso se retiró la grasa orbitaria, los músculos, los párpados y toda la materia sobrante del tejido, dejando únicamente el globo ocular y la conjuntiva bulbar. Una vez hecho esto, se introducía el globo en el primer pocillo de una placa de 6 durante 5 min para empezar la desinfección. Este pocillo contenía una disolución de Betadine en PBS al 2% (figura 2C).

Pasado ese tiempo, el globo se trasladó al pocillo contiguo para realizar el segundo lavado, cuya composición dependió de la condición que se estuviese probando en cada momento (tabla 2), durante 5 min.

Se situó el órgano sobre una placa de Petri y se retiró la conjuntiva (figura 2D). El tercer lavado y, en los casos en los que había un cuarto, se hizo sólo del tejido conjuntival.



**Figura 2. Procesamiento del globo ocular.** A) Globo ocular sin tratar. B) Retirada de tejidos sobrantes. C) Segundo lavado del globo ocular situado arriba y primero para el de la parte inferior. D) Extracción de la conjuntiva.

Tras esto, el tejido fue llevado al Laboratorio de Cultivos Celulares y se trabajó en campana de flujo laminar vertical de seguridad tipo II Gelaire BSB 4ª de ICN Biomedicals, Flow Laboratories (Sidney, Australia). La conjuntiva se puso en una placa de Petri con medio de cultivo. Todo el material que se empleó fue estéril y los medios estaban atemperados previamente. Con la ayuda de bisturí y pinzas de precisión se cortaron los explantes de 1mm<sup>2</sup> aproximadamente. Estos se colocaron en placas de 6 y 12 pocillos y en multichamber de 8 pocillos. Todos los soportes llevaban unas líneas realizadas con el bisturí para facilitar la adhesión de las células.

En el caso de las placas de 6 pocillos se pusieron cuatro explantes por pocillo, en las de 12 tres explantes por pocillo y en los multichamber 1 ó 2 explantes por pocillo.

Como el tamaño de los pocillos es diferente en los distintos soportes, la cantidad de medio de cultivo también varió: 650µl en placa de 6, 350µl en la de 12 y 100µl en los multichamber. Esta era la cantidad de medio de cultivo mínima para cubrir los explantes y, de esta forma, facilitar su fijación en el fondo de la placa.

Aunque todo esto se realizó en las mejores condiciones de esterilidad posibles, en dos ocasiones, con objeto de identificar mejor el epitelio conjuntival, los explantes se pusieron fuera de la campana con ayuda de una lupa Nikon 140959, Japan.

Las placas de cultivo se mantuvieron en condiciones normales (5% de CO<sub>2</sub> y 37°C) en un incubador de CO<sub>2</sub> Touch 190S de LEEC (Nottingham, Reino Unido).

El medio de cultivo se cambió cada dos días. El séptimo día se retiraron los explantes para proceder a la tripsinización del crecimiento celular obtenido a partir de ellos.

Para intentar conseguir un cultivo puro de células epiteliales se realizó tripsinización diferencial (5 y 10 min, 5 y 12min, 3 2 y 5 min) con tripsina EDTA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) Está descrito que los fibroblastos se despegan con más facilidad en presencia de tripsina [13].

La viabilidad celular fue evaluada con la solución de Azul Tripán 0,4% (Sigma Aldrich).

Tras realizar el contaje, se sembraron todas las células en multichamber de 8 pocillos y se denominó pase 1. Éste se mantuvo en las mismas condiciones que las placas iniciales, cuyo crecimiento se llamó pase 0.



#### 5.4. Caracterización del cultivo primario.

Para llevar a cabo la caracterización del cultivo fueron utilizados diferentes marcadores de linaje celular:

- Ki67: es una proteína nuclear que se expresa en todas las fases del ciclo celular excepto en la G<sub>0</sub>, por ello se considera buen marcador de proliferación. Realizando un conteo de este marcador se puede calcular el porcentaje de células que se encuentran en fase de proliferación activa.
- Vimentina: es una proteína del citoesqueleto celular utilizada como marcador esencial de fibroblastos. Esta tinción dio información de la contaminación fibroblástica de los cultivos.
- E-cadherina (E-cad): es una proteína de membrana propia de las uniones adherentes de las células epiteliales. La presencia de esta proteína en los cultivos significaría que hay células epiteliales.
- Citoqueratina 7 (CK 7): es una proteína del citoesqueleto de las células epiteliales secretoras. Al igual que la E-cad la presencia de este marcador indicaría presencia de células epiteliales.

Antes de comenzar los marcajes, las células fueron fijadas con etanol frío. Los multichamber de pase 0 contenían explantes, mientras que, los de pase 1 monocapas celulares. Los cultivos fueron fijados en diferentes grados de confluencia: al 20%, al 50% y al 100%.

Para la detección de estos marcadores se utilizó inmunofluorescencia siguiendo el siguiente protocolo. Se realizaron tres lavados en PBS de la muestra y se permeabilizó con PBS y Tritón al 0,3% en el caso de CK7 y Ki67. El siguiente paso fue bloquear el cultivo con PBS + suero de burro al 5% (Sigma Aldrich) en el caso de E-cad, Vimentina y CK7, y PBS + suero de burro al 4%+ Tritón al 0,3% para Ki67. Se añadió el anticuerpo primario (tabla 4), disuelto en el tampón de bloqueo, y se dejó a una temperatura de 4°C toda la noche. Se lavó con PBS y se puso el anticuerpo secundario (tabla 4), disuelto en PBS, durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, tras lavar de nuevo, se llevó a cabo la tinción nuclear con Hoechst 1:1000 (Sigma Aldrich). Este reactivo marca los ácidos nucleicos y es muy utilizado como contratinción en inmunofluorescencia. Además, es útil

para la detección de *Mycoplasma* en los cultivos. Finalmente, se lavaron y montaron las muestras con Fluoromount – G (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) y se visualizaron al microscopio.

**Tabla 4. Anticuerpos utilizados.** La tabla resume las características de los anticuerpos utilizados, las diluciones y las casas comerciales.

		Especie	Dilución	Código	Casa Comercial
<b>Anticuerpos Primarios</b>	Vimentina	Ratón	1:500	SC-6260	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA
	E-cadherina	Ratón	1:100	610181	BD Bioscience, Franklin Lakes, Nj
	CK 7	Ratón	1:100	MS-1352-P0	ThermoScientific, Rockford, IL
	Ki67	Conejo	1:500	GR220199-1	Abcam
<b>Anticuerpos Secundarios</b>	AlexaFluor 448 anti-mouse IgG	Burro	1:200	A21202	Invitrogen
	AlexaFluor 448 anti-rabbit IgG	Burro	1:150	A21206	Invitrogen

## 5.5. Fotografía y Análisis.

Para realizar el análisis del éxito de los explantes se realizó un conteo del número de explantes que habían tenido crecimiento frente al número total puesto por cada ojo.

En el caso de la proliferación, el conteo de células marcadas por el anticuerpo anti-Ki67 se realizó utilizando 9 fotografías de 3 cultivos primarios diferentes derivados de distintos explantes. Los datos se expresan como media del porcentaje de células en proliferación  $\pm$  desviación estándar.

La contaminación microbiana por *Mycoplasma* se determinó utilizando el reactivo Hoechst.

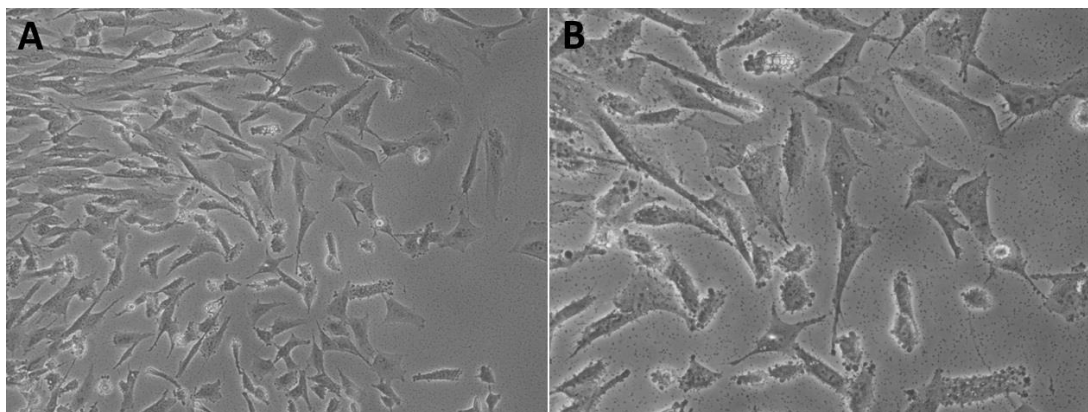
Las fotografías fueron tomadas con el microscopio invertido de fluorescencia Leica CTR600 y el microscopio óptico invertido Nikon Eclipse TS100.



## 6. RESULTADOS

### 6.1. Dificultades encontradas en la obtención de los cultivos

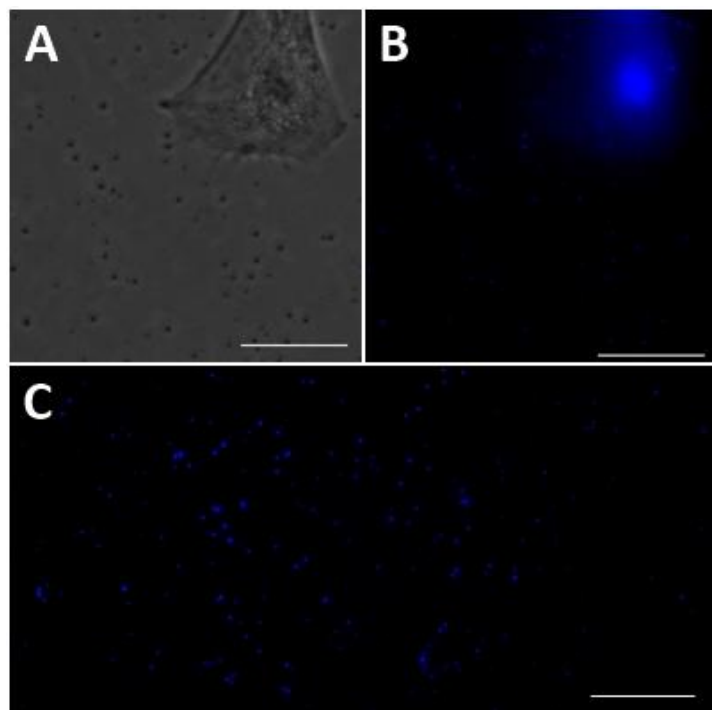
Durante las primeras fases del estudio, la contaminación microbiana fue uno de los mayores problemas para poder conseguir cultivos. La figura 3 muestra cultivos contaminados en los que se puede apreciar el mal estado de las células y el punteado negro que ocupa la mayor parte del espacio.



**Figura 3. Contaminación microbiana.** En ambas fotos se aprecia un punteado negro y se puede observar que las células no están sanas. A) Aumentos 10X. B) Aumentos 20X.

**Figura 4. Identificación del *Mycoplasma* con Hoechst.** A) imagen de contraste de fases que muestra una célula con algún punto negro en el citoplasma y el entorno ocupado por el mismo punteado. B) la misma zona que A pero con la inmunofluorescencia del Hoechst. Se aprecia en azul el núcleo celular y restos en el citoplasma que se corresponde con el punteado de la imagen A. Se observa en azul el punteado en toda la fotografía. C) fotografía de una zona del pocillo sin células en la que solo se identifica en azul el *Mycoplasma*.

Escala = 50  $\mu$ m.



Se determinó el tipo de contaminación. Para ello, se realizaron diferentes cambios en los medios de transporte, lavados y medio de cultivo y la muestra fue teñida con Hoechst (figura 4). Se observaron los puntos negros que se veían en los cultivos teñidos de azul en las imágenes de inmunofluorescencia. El marcaje puso de manifiesto la presencia de *Mycoplasma* en los cultivos y fue determinante a la hora de elegir los medios adecuados para continuar con el estudio.

## 6.2. Medios seleccionados

El problema de la contaminación llevó a la incorporación de distintos antibióticos en los medios. Pero hay que tener precaución con dichas sustancias ya que, además de favorecer la desaparición de los patógenos, pueden impedir el crecimiento normal de las células. Fue necesario realizar varias combinaciones (tablas 1, 2 y 3) para conseguir, con la menor cantidad de antibiótico posible, un cultivo sano.

El primer paso fue jugar con los lavados, realizando un cuarto lavado con la solución de betadine o de la de anti-anti. Pero con ello no se consiguió solucionar el problema.

Se incorporó la Gentamicina, antibiótico de amplio espectro muy utilizado en superficie ocular cuya elección suele darse cuando otros antibióticos han fallado. No se observaron diferencias en los cultivos.

Otra condición fue añadir medio condicionado de células madre mesenquimales en el medio de cultivo, de esta forma se podría favorecer tanto la desaparición de contaminación como la proliferación de las células. De nuevo, no se observaron diferencias en los cultivos.

Por último, la incorporación de Antimycoplasma en todos los medios fue la clave para terminar con el problema.

Como resumen, la tabla 5 recoge el protocolo definitivo de transporte, lavado e inicio del cultivo que se estableció después de observar la proliferación, el crecimiento y el estado de las células en las distintas condiciones probadas para el desarrollo posterior del trabajo.

**Tabla 5.** Resumen de la composición de los medios definitivos utilizados en el estudio.

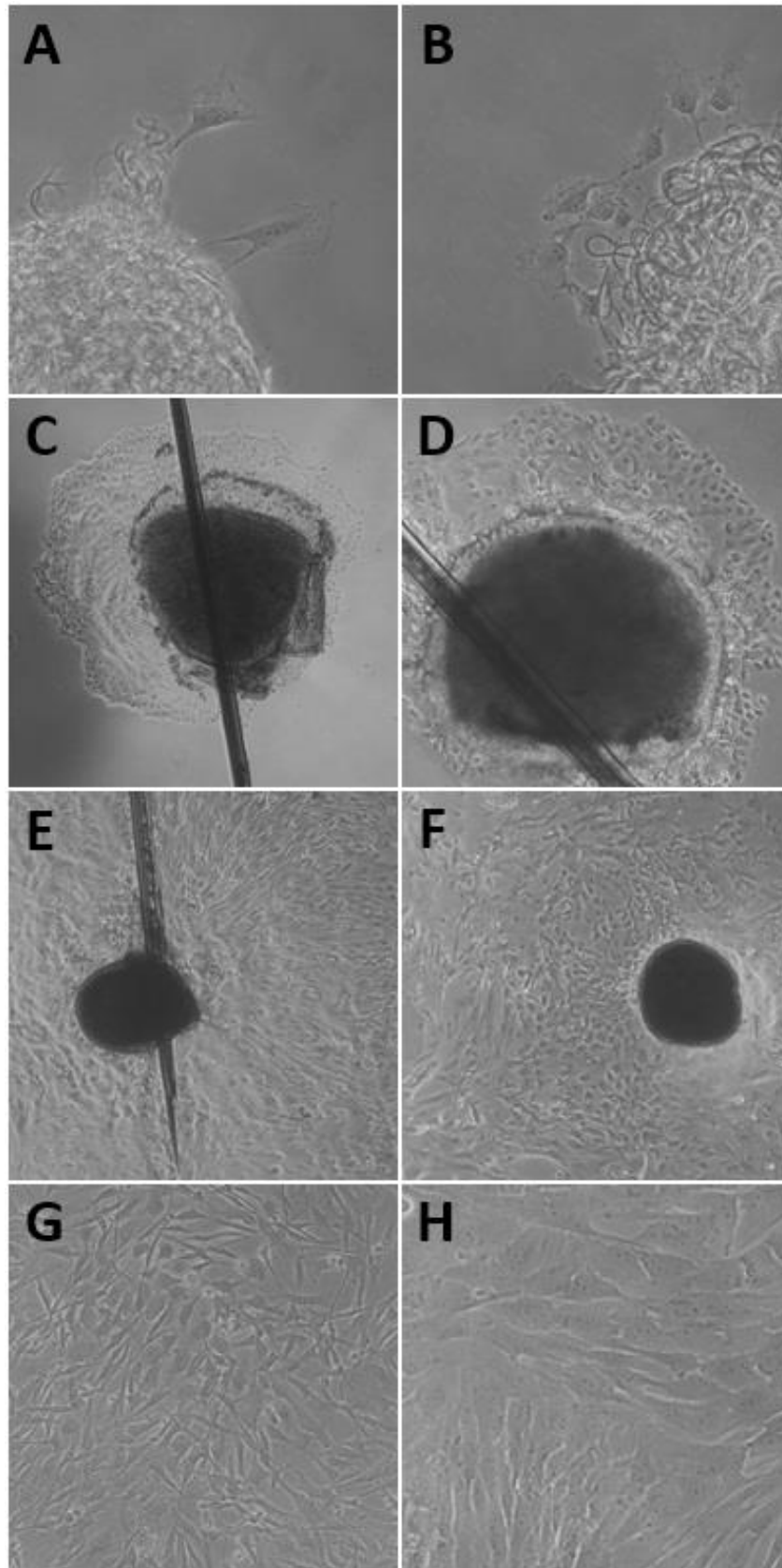
MEDIO DE TRANSPORTE	
Medio DMEM+Glutamax 1,5% penicilina (5.000 IU/ml)/ estreptomicina (5.000 µg/ml) 1% Fungizona 0,1% AntiMycoplasma	
COMPOSICIÓN LAVADOS	
<b>PRIMERO (5 min)</b>	PBS 2% Betadine
<b>SEGUNDO (5 min)</b>	PBS 1% Anti-Anti 0,1% AntiMycoplasma
<b>TERCERO (5 min)</b>	PBS 1% Anti-Anti 0,1% AntiMycoplasma
MEDIO DE CULTIVO	
RPMI 10% FBS 2mM L-Glutamina 100µg/ml penicilina (5.000 IU/ml) /estreptomicina (5.000 µg/ml) 0,1% Antimycoplasma	

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium; **PBS:** solución salina tamponada con fosfato; **Anti-anti:** Antibiótico-Antimicótico; **RPMI:** Roswell Park Memorial Institute; **FBS:** Suero fetal bovino

### 6.3. Éxito de los explantes

Una vez plantados los explantes y mantenidos con el medio de cultivo seleccionado, se pudo observar el crecimiento de las primeras células el primer día (figura 5). Pasados tres días, el crecimiento se observó con claridad en los explantes que habían tenido éxito. Se iba formando una monocapa de células alrededor del tejido y ganaban espacio en el fondo del pocillo. El séptimo día se tripsinizó y las células se sembraron en un pocillo donde crecieron hasta cubrir la superficie, momento en el que se fijaron.

Con la optimización del medio el éxito de los explantes fue aumentando aunque no se llegó a conseguir un 100%. La media del total de los 40 ojos utilizados fue de un 55% (tabla 6). Cabe destacar la curva de aprendizaje de las primeras semanas, que hizo que los porcentajes fueran menores. El éxito de los explantes fue determinante a la hora de plantear los experimentos de caracterización del cultivo. Las semanas en las que el éxito era muy bajo la cantidad de células no fue suficiente para tripsinizar de forma diferencial y conseguir cultivos primarios útiles.



**Figura 5. Crecimiento celular a partir de los explantes de conjuntiva porcina.** A y B) se observa el crecimiento de las primeras células un día después de poner el explante. Aumentos: 20X. C y D) crecimiento a los 3 días. Aumentos: 4X y 10X. E y F) explantes a los 5 días. Aumentos: 10X. G y H) monocapa de células dos días después de tripsinizar, pase 1. Aumentos: 20X y 40X.

**Tabla 6. Éxito de los explantes.** La tabla resume el total de ojos utilizados, el número de explantes que se plantaron por ojo y el éxito de los mismos, tanto de forma absoluta como en forma de porcentaje.

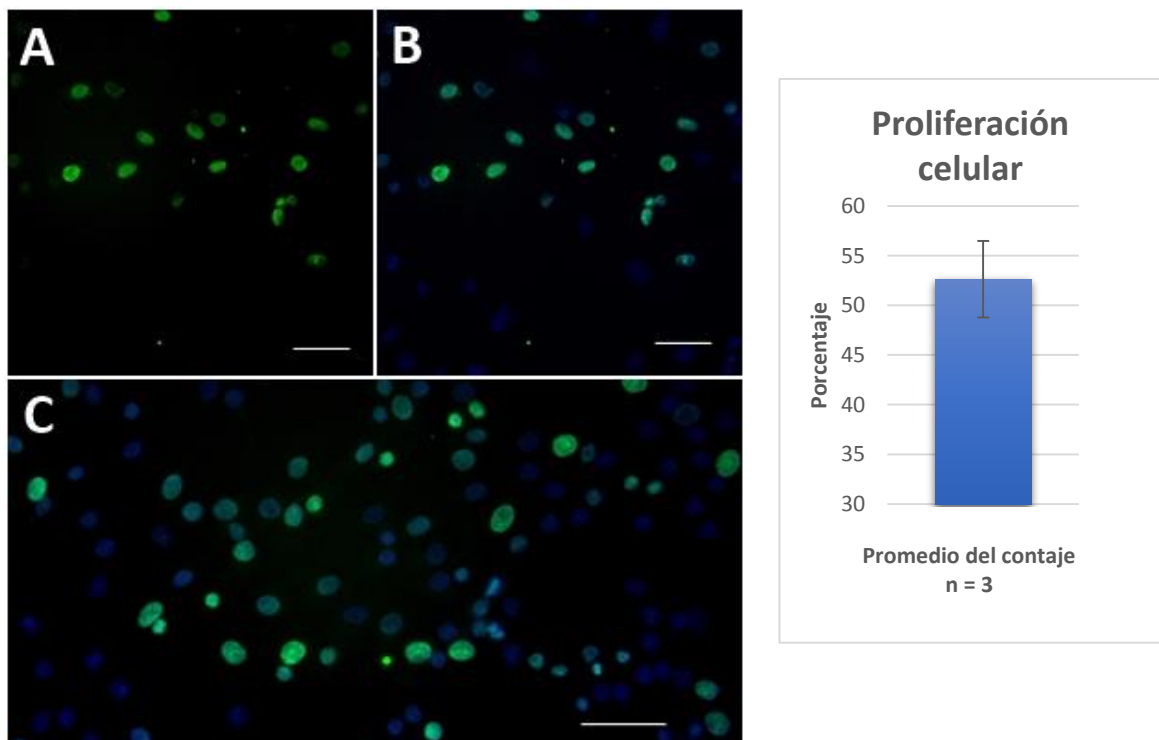
Nº OJO	TOTAL EXPLANTES	EXPLANTES QUE CRECIERON	% ÉXITO
1	18	8	44%
2	18	7	39%
3	12	4	33%
4	12	5	42%
5	12	2	17%
6	18	5	28%
7	18	7	39%
8	12	3	25%
9	12	2	17%
10	24	5	21%
11	24	7	29%
12	24	Avería incubador	0
13	24	Avería incubador	0
14	36	20	56%
15	36	22	60%
16	40	18	45%
17	40	22	55%
18	40	38	95%
19	40	38	95%
20	40	36	90%
21	34	20	59%
22	34	22	65%
23	36	30	83%
24	36	21	58%
25	36	34	94%
26	24	16	67%
27	24	10	42%
28	24	11	46%
29	24	14	58%
30	54	26	48%
31	24	14	58%
32	36	24	67%
33	48	21	44%
34	48	38	79%
35	24	11	46%
36	24	17	71%
37	48	35	73%
38	48	29	60%
39	48	35	73%
40	48	38	79%
<b>ÉXITO TOTAL</b>			<b>55%</b>



#### 6.4. Proliferación celular

La capacidad proliferativa de los cultivos primarios fue determinada con el marcaje de Ki67. Este es un marcador nuclear por lo que la tinción se observó en los núcleos. Para realizar el conteo se tomó como total las células marcadas en azul (Hoechst) y como proliferación las células marcadas en verde (Ki67) (figura 6). Para cuantificar este dato se utilizaron en total 9 fotografías (3 de cada cultivo) tomadas de tres cultivos primarios de pase 0 de distintos globos oculares (n=3).

El promedio de células positivas para Ki67 de los tres fue de un  $52,63\% \pm 3,85\%$  (figura 6), siendo muy similares los porcentajes individuales de cada ojo. Esto indica que algo más de la mitad de las células en cada cultivo estaban en alguna de las fases del ciclo proliferativo.

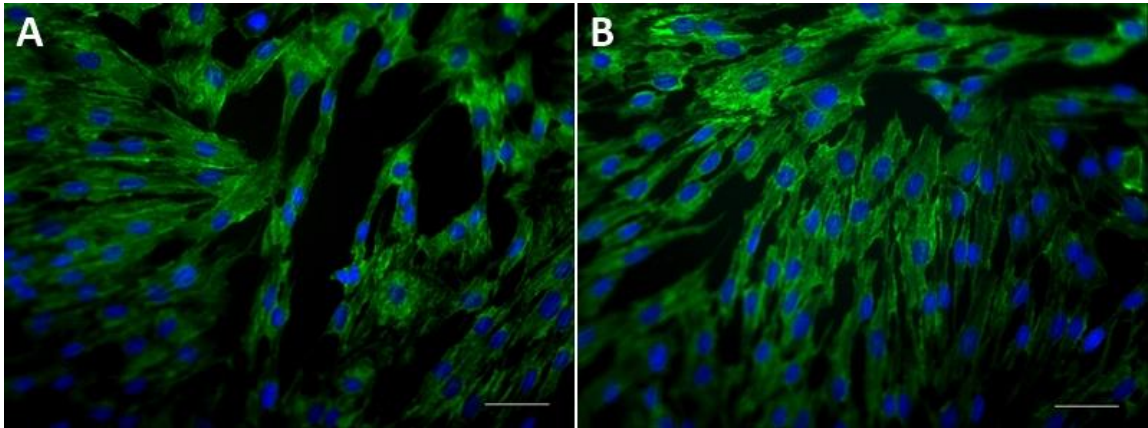


**Figura 6. Identificación y cuantificación de la proliferación celular utilizando el marcador Ki67 en pase 0.** En la imagen de la izquierda se observa: A) en verde, núcleos celulares marcados con Ki67. B) misma foto que en el caso A, todas las células tienen el núcleo marcado con azul, algunas poseen una mezcla entre el verde del Ki67 y el azul de Hoechst. C) en azul marcaje nuclear Hoechst y en verde Ki67. Escala = 50µm.

## 6.5. Caracterización de los cultivos

### - **Fibroblastos:**

La vimentina estuvo presente en todos los cultivos. Su abundancia indicó la presencia de fibroblastos. El marcaje con vimentina fue muy positivo tanto en pases 0 como en pases 1 (figura 7).

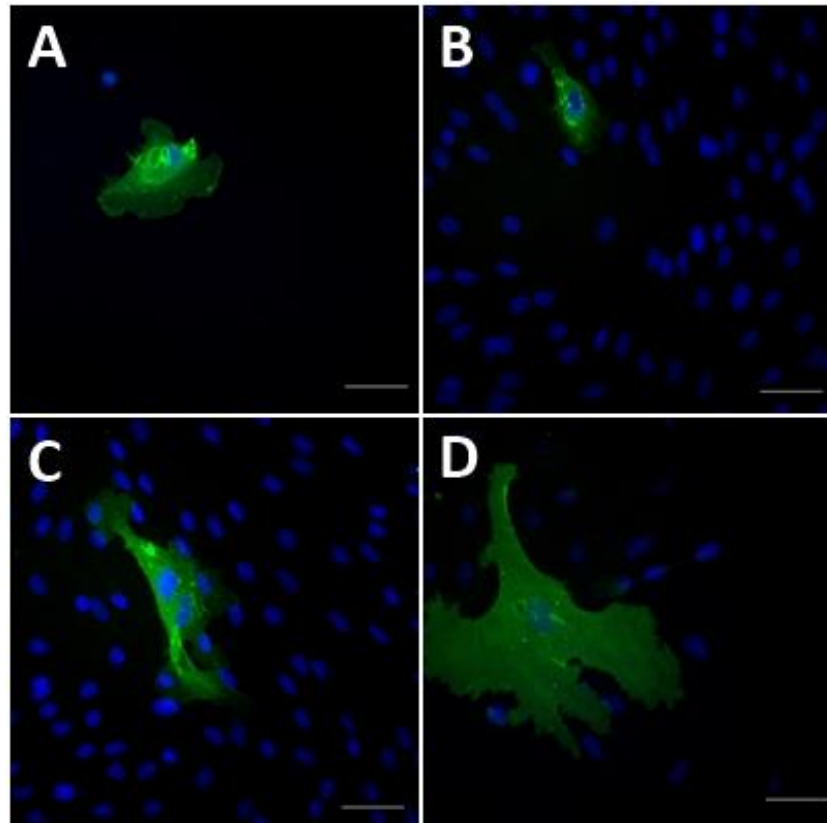


**Figura 7. Identificación de células positivas para Vimentina.** A: pase 0. En azul los núcleos celulares y en verde el citoplasma marcado con vimentina. B: pase 1. En azul los núcleos y en verde los citoplasmas marcados con vimentina. Escala = 50 $\mu$ m.

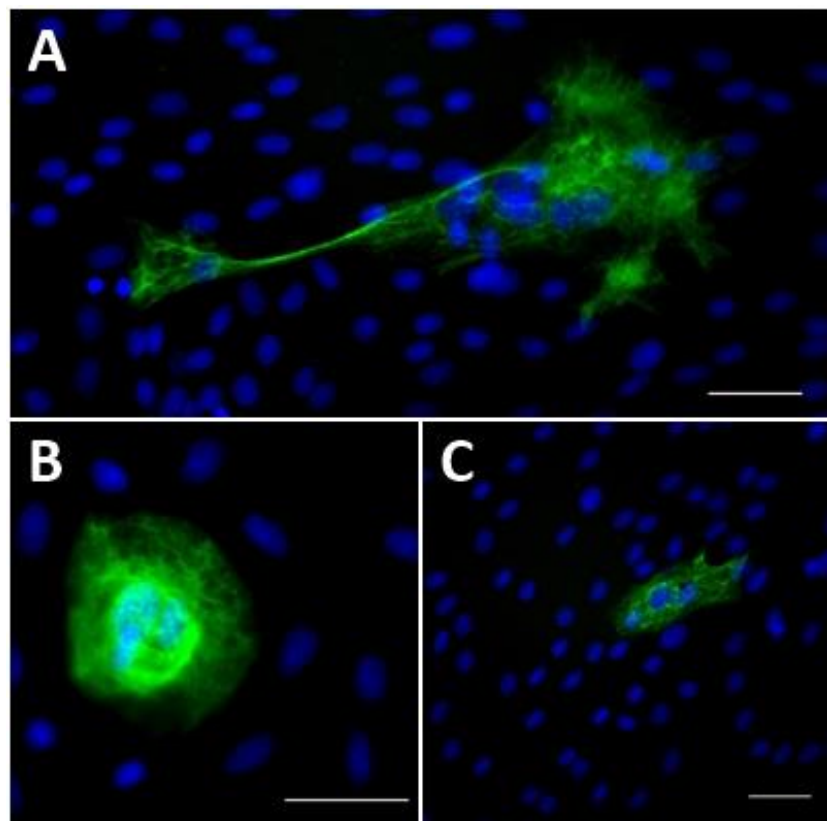
### - **Células epiteliales:**

En los pases 0 no se consiguió observar ninguna célula marcada para E-cadherina ni para Ck7. La gran cantidad de fibroblastos pudo enmascarar el marcaje de una minoría de células epiteliales. Tras realizar la primera tripsinización diferencial se pudieron observar células epiteliales positivas para E-cadherina (figura 8) y Ck7 (figura 9). No obstante, no se consiguió un cultivo puro de dichas células, pues la contaminación por fibroblastos estuvo presente en todas las muestras.

**Figura 8. Identificación de células positivas para E-cad en pase 1.** A) dos núcleos en azul y uno de ellos perteneciente a una célula epitelial positiva para E-cadherina en color verde. B) núcleos en azul y, en verde, célula epitelial en forma de cuello de botella. C) núcleos en azul y positividad en verde que abarca más de una célula. D) gran célula positiva en verde y núcleos en azul. Escala = 50µm.



**Figura 9. Identificación de células positivas para Ck7 en pase 1.** A) varios núcleos en azul y en verde, una agrupación de células epiteliales positivas para Ck7. B) núcleos en azul y tres células epiteliales muestran, en un verde muy saturado, gran positividad para Ck7. C) núcleos en azul y en verde tres células positivas para Ck7. Escala = 50µm.



## 7. DISCUSIÓN

En este trabajo se ha conseguido la optimización de un protocolo de trabajo para el cultivo de células epiteliales a partir de explantes de conjuntiva porcina. Han sido establecidos los medios de transporte, de lavados y de cultivo. Se han probado diversos marcadores de linaje celular y comprobado su positividad en la especie porcina. Si bien, es cierto, que no se ha llegado a obtener una monocapa de células epiteliales pura como se planteaba en la hipótesis.

El estudio ha tenido diversas limitaciones. Por un lado, el problema de la contaminación microbiana durante las primeras semanas de desarrollo del trabajo. En principio se atribuyó a la curva de aprendizaje pero, finalmente, se detectó e identificó el *Mycoplasma* como agente causante. El *Mycoplasma* es muy común en la especie porcina y, por ello, teniendo en cuenta que las condiciones de sacrificio del animal y extracción de los globos no son las de un laboratorio, es comprensible su aparición en este tejido. Además, hay que tener en cuenta la flora bacteriana propia de la conjuntiva que pudo favorecer a la contaminación de algunos cultivos.

Otra limitación está relacionada con el método seleccionado para obtener los cultivos primarios, que fue utilizar explantes de conjuntiva. Se podría haber elegido la técnica de disgregación; sin embargo, ésta ya fue probada por el Establecimiento de Tejidos Clínica San Francisco de León y no consiguieron un cultivo limpio de fibroblastos. Es por ello que se decidió probar con los explantes de tejido conjuntival.

Siguiendo la técnica utilizada en humanos, los explantes se plantaron lo más pequeños posibles pero, no era posible garantizar que fuesen propiamente de epitelio, pues no se disponía de una lupa con la que se pudiese trabajar dentro de la campana de flujo laminar. Se probó en una ocasión utilizando una lupa fuera de la campana y, como era de esperar, los tejidos se contaminaron y no fue posible analizar la morfología de sus células.

A pesar de estas limitaciones, se ha conseguido obtener un éxito en el crecimiento de los explantes superior al 50% y la capacidad proliferativa de las células en fase 0 era de un 52% aproximadamente.

Se usó un procedimiento de tripsinización diferencial, probada con éxito con tejido conjuntival humano, para reducir la contaminación de fibroblastos. El conteo celular mostró

viabilidades entorno al 12%. Este dato podría ser debido al daño que produce la tripsina sobre las células si se mantiene en exceso. Las primeras células se despegaron muy rápido, sin embargo, el segundo tiempo de tripsinización en muchos casos era prolongado por seguirse observando, en el microscopio, células pegadas en el fondo del pocillo. Puede que el tiempo de contacto sea demasiado elevado para las primeras células despegadas es por ello que fue probada la tripsinización en tres tiempos, comprobándose que en el segundo tiempo se pudo identificar alguna célula epitelial. Sería interesante trabajar en esta línea con los tiempos de tripsinización, porque quizá las células porcinas no sigan los mismos patrones que las células humanas. Esta técnica podría ser combinada con el preplantado, también utilizado en cultivos primarios de epitelio conjuntival humano. La limitación en el tiempo de desarrollo de este trabajo ha imposibilitado la realización de más pruebas y combinaciones para conseguir un cultivo puro de células epiteliales.

En cuanto a los marcajes de linaje celular, la vimentina ha puesto de manifiesto la contaminación con fibroblastos en todas las muestras. No obstante, el marcaje positivo de E-cadherina y Citoqueratina 7 en fase 1, apoya la idea de que la tripsinización diferencial es un buen camino para eliminar los fibroblastos y facilitar la proliferación de las células epiteliales.

La E-cadherina es una proteína que marca uniones celulares y cuando se observa en una monocapa se aprecia el contorno celular positivo. Sin embargo, en todas las pruebas realizadas en este trabajo, las células positivas para dicho marcador presentaban todo el citoplasma verde. Este hecho fue atribuido a la presencia de células epiteliales aisladas y no en monocapa, en la que podrían establecer uniones entre sí.

También fue probada la Citoqueratina 19 específica de epitelio conjuntival, positiva en humano, pero no se obtuvo marcaje alguno. No podemos concluir que dicha proteína no se exprese porque no se contaba con la cantidad suficiente de células epiteliales para poder demostrarlo.

Este trabajo ha abierto una línea de investigación en la creación de un sistema *in vitro* derivado de tejido porcino para el estudio de la conjuntiva. En él se han conseguido dar las primeras pinceladas y establecer un método de trabajo para llegar a obtener los cultivos primarios. Sin embargo, queda mucho trabajo hasta llegar a conseguir una monocapa pura de células epiteliales y su completa caracterización. Se podría combinar la tripsinización

diferencial con la técnica de preplantado para que, aprovechando la facilidad de adhesión de los fibroblastos, se consiga eliminar la mayor parte de los fibroblastos al inicio del proceso, pues quedarían adheridos al soporte de cultivo.



## 8. CONCLUSIONES

1. Para evitar la contaminación microbiana de los cultivos es necesario añadir tratamiento antimycoplasma a todos los medios que van a estar en contacto con los tejidos porcinos, además de los antibióticos y antimicóticos convencionales.
2. La caracterización de los cultivos con marcadores específicos de célula epitelial y de fibroblasto ha puesto de manifiesto que la tripsinización diferencial no resulta suficiente para obtener una monocapa de células epiteliales conjuntivales pura sin contaminación con fibroblastos.
3. Se han conseguido cultivos primarios derivados de explantes conjuntivales en el 55% de los ojos empleados, con una capacidad proliferativa de las células en pase 0 del 52,63%. Esos porcentajes seguramente mejoren si se consigue eliminar el crecimiento de fibroblastos con técnicas complementarias.





## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Nichols B, Dawson CR, Togni B. Surface features of the conjunctiva and cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983; 24: 570-576.
2. Chung SH, Lee JH, Yoon JH, Seo KY. Multi-layered culture of primary human conjunctival epithelial cells producing MUC5AC. *Exp Eye Res.* 2007; 85: 226-33.
3. Meller D, Dabul V, Tseng SC. Expansion of conjunctival epithelial progenitor cells on amniotic membrane. *Exp Eye Res.* 2002; 74: 537-45.
4. Gipson IK. Distribution of mucins at the ocular surface. *Exp Eye Res.* 2004; 78: 379-388.
5. Zhi-Gang W, Ren-Long W, Robert M. L and Tung-Tien S. In vitro growth and differentiation of rabbit bulbar, fornix, and palpebral conjunctival epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993; 34: 1814- 1828.
6. Murube J. Clasificación clínica del ojo seco. *Ojo Seco-Dry Eye.* Tecnimedia Editorial. 1997; 39-44.
7. Biber JM, Holland EJ, Neff KD. Management of ocular stem cell disease. *Int Ophtal Clin.* 2010; 48: 298-304.
8. Chang RS. Continuous subcultivation of epithelial-like cells from normal human tissues. *Prov Soc Exp Biol Med.* 1954; 87: 440-443.
9. Diebold Y, Calonge M, Enriquez de Salamanca A, et al. Characterization of a spontaneously immortalized cell line (IOBA-NHC) from normal human conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44: 4263-4274.
10. Diebold Y, Calonge M, Fernández N, Lázaro MC, Callejo S, Herreras JM, et al. Characterization of epithelial primary cultures from human conjunctiva. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1997; 235: 268-76.
11. Diebold Y, Calonge M, Callejo S, Lázaro MC, Bringas R, Herreras JM. Ultrastructural evidence of mucus in human conjunctival epithelial cultures. *Current Eye Research.* 1999; 19; 95-105.
12. Gipson Ik, Spurr-Michaud S, Argueso P, Tisdale A, Ng TF, Russo CI. Mucin gene expression in immortalized human corneal limbal and conjunctival epithelial cell lines. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44: 2496-2506.

13. García L, Arranz I, López A, Soriano L, Diebold Y. A new human primary epithelial cell culture model to study conjunctival inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013; 54: 7143-7152.
14. Ma M, Zhang Z, Niu W, Zheng W, Kelimu J, Ke B. Fibroblast growth factor 10 upregulates the expression of mucins in rat conjunctival epithelial cells. *Mol Vis.* 2011; 17: 2789-2797.
15. Saha P, Kim KJ, Lee VH. A primary culture model of rabbit conjunctival epithelial cells exhibiting tight barrier properties. *Curr Eye Res.* 1996; 15: 1163-1169.
16. Russell WMS, Burch R. *The principles of Humane Experimental Technique.* London; Methuen & Co Ltd; 1959.
17. Langford MP, Stanton GJ. Replication of acute hemorrhagic conjunctivitis viruses in conjunctival-corneal cell cultures of mice, rabbits, and monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1980; 19: 1477-1482.
18. Fernandez-Bueno I, Pastor JC, Gayoso MJ, Alcalde I, Garcia MT. Müller and macrophage-like cell interactions in an organotypic culture of porcine neuroretina. *Mol Vis.* 2008; 14: 2148–2156.
19. Ruiz-Ederra J, García M, Hernández M, Urcola H, Hernández- Barbáchano E, Araiz J, Vecino E. The pig eye as a novel model of glaucoma. *Exp Eye Res.* 2005; 81:561–569.
20. Nishi O, Nishi K, Nishi Y, Chang S. Capsular bag refilling using a new accommodating intraocular lens. *J Cataract Refract Surg.* 2008; 34: 302–309.
21. Acosta E, Vázquez D, Castillo LR. Analysis of the optical properties of crystalline lenses by point-diffraction interferometry. *Ophthalmic Physiol Opt.* 2009; 29: 235–246.
22. Sánchez I, Martín R, Ussa F, Fernández-Bueno I. The Parameters of porcine eyeball. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2011; 249: 475-482.
23. Bermudez MA, Sendon-Lago J, Eiro N, et al. Corneal epithelial wound healing and bactericidal effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015; 56: 983-992.