



---

**Universidad de Valladolid**



# **MODELO *IN VITRO* DE INFLAMACIÓN CORNEAL CAUSADA POR LENTES DE CONTACTO**

---

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

Realizado por:

**Mario Crespo Moral**

Tutora:

**Dra. Yolanda Diebold Luque**

*Valladolid, 6 de Septiembre 2012*







## **AGRADECIMIENTOS:**

Al grupo de Superficie Ocular del IOBA, especialmente a la tutora de este trabajo, la Dra. Yolanda Diebold, y a los miembros más cercanos de mi grupo, Antonio López, Isabel Arranz, Laura Soriano y Laura Garcia; por todo.

A todos los compañeros del IOBA, por su disposición en todo momento a ayudarme con sus conocimientos y experiencia.

## **FINANCIACIÓN:**

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la siguiente financiación:

- Proyecto “Combinación de hidrogeles biomiméticos y nanopartículas como plataformas terapéuticas avanzadas para enfermedades oculares”. Ministerio de Ciencia e Innovación, CICYT MAT-2010-20452-C03-01. Investigador responsable: Dra. Yolanda Diebold Luque. Duración: desde 01/01/2011 hasta 31/12/2013
- Proyecto “Identificación de dianas terapéuticas para la reparación de la barrera corneal: diseño de una nueva terapia antiinflamatoria”. Junta de Castilla y León, Consejería de Educación, Subvención del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación VA132A11-2. Investigador responsable: Dra. Yolanda Diebold Luque. Duración: desde 30/03/2011 hasta 29/03/2013.



## ÍNDICE:

INTRODUCCIÓN	9
JUSTIFICACIÓN	13
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	15
1. Hipótesis	15
2. Objetivos	15
2. MATERIAL Y MÉTODOS	17
1. Materiales	17
1.1 Reactivos	17
1.2 Equipos	18
2. Línea celular	20
3. Colocación de la lente de contacto (LC) sobre las células y condiciones de los cultivos	20
4. Medida de la viabilidad celular	22
5. Medida de la proliferación celular	23
6. Medida de la expresión de marcadores inflamatorios	24
6.1 En sobrenadantes de cultivos mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	24
6.2 En extractos de proteínas mediante electroforesis y Western blotting	25
7. Estadística	27
3. RESULTADOS	29
1. Estudio de la viabilidad celular	29
2. Estudio de la proliferación celular	30
3. Secreción de la IL-6	33
4. Secreción del sCD44	35
5. Detección de la IL-6 mediante electroforesis y Western blotting	38
6. Detección del CD44 mediante electroforesis y Western blotting	39
4. DISCUSIÓN	43

5. CONCLUSIONES PRELIMINARES Y TRABAJO FUTURO	47
6. BIBLIOGRAFÍA	49

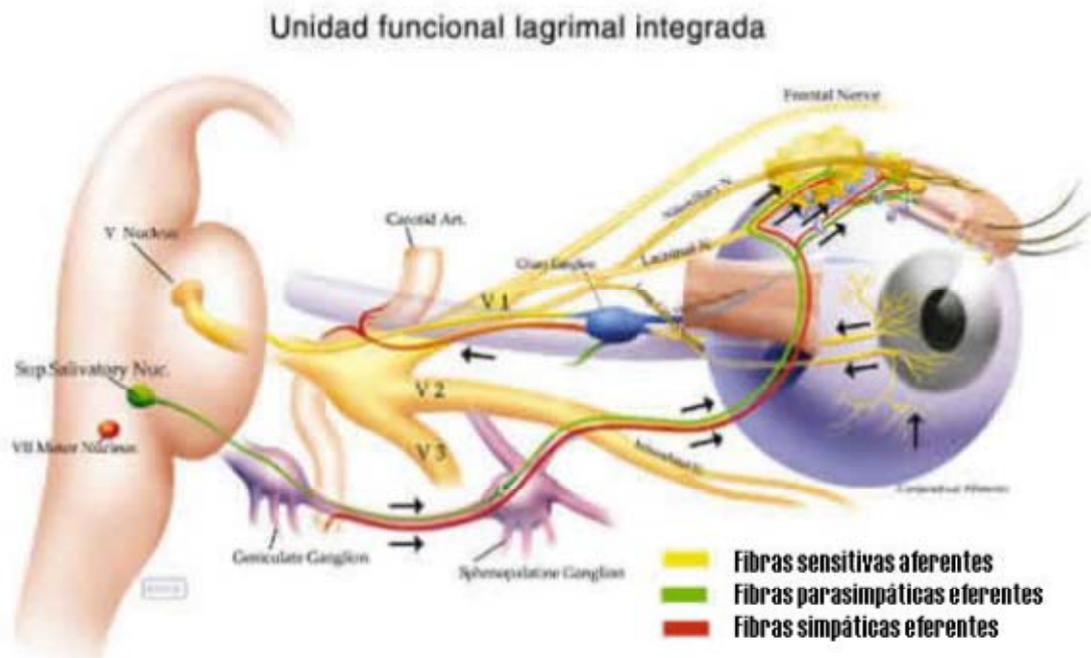
## INTRODUCCIÓN:

Denominamos superficie ocular a la parte anterior del ojo, que está compuesta por la película lagrimal, la córnea, el limbo y la conjuntiva (Toft et al, 1979). Todas estas estructuras son las encargadas de que la luz que llega a nuestro ojo y las atraviesa mantenga una dirección adecuada, para lo cual cada parte cumple con un determinado papel. La película lagrimal es una bicapa compuesta por una capa muco-acuosa tipo gel y otra lipídica que evita la evaporación. En conjunto, además de humectar la superficie ocular se encarga de mantener una superficie lisa y regular el paso de la luz, siendo a su vez el sustento nutricional de las células de la córnea. La córnea es un tejido muy especializado, transparente, avascular y muy innervado. Junto con la película lagrimal forman el primer dioptrio ocular, el cual es el responsable de aportar la mayor parte de la potencia del sistema óptico total. Esto es de vital importancia ya que cualquier irregularidad en esta unidad degenerará de forma muy importante la calidad visual. El limbo es la zona de transición existente entre la córnea y la conjuntiva, y en ella encontramos las células madre encargadas del recambio del epitelio corneal. La conjuntiva, por su parte, es una membrana mucosa que cubre toda la zona anterior del ojo, tapizando el ojo desde el borde de la córnea hasta el de los párpados. Es un tejido complejo, más de lo que se pensaba el siglo pasado, que realiza múltiples funciones de apoyo, entre las que destacan la secreción de ciertos componentes de la película lagrimal y la protección inmune de las estructuras de la superficie ocular.

Posteriormente a esta descripción, se ha englobado a la superficie ocular en la denominada Unidad Funcional Lagrimal (UFL) (Figura 1) que, aparte de las estructuras ya mencionadas, comprende también a las glándulas lacrimales (principales y accesorias) y a todos los circuitos nerviosos, hormonales e inmunológicos que regulan la producción y secreción de los distintos componentes de la lágrima (Stern et al, 1998).

Cualquier fallo en el funcionamiento de la UFL puede dar lugar a una gran cantidad de manifestaciones clínicas en el sujeto afecto, que van desde la irritación ocular hasta graves problemas oftalmológicos que pueden derivar en pérdida visual (Stern et al, 2004). Una de las principales causas de la disfunción de la UFL son los procesos inflamatorios, los cuales pueden ser agudos o crónicos. La inflamación es uno de los mecanismos que posee nuestro cuerpo para combatir las agresiones de agentes externos. Se trata de una respuesta inespecífica generada por los agentes inflamatorios que surge con el fin de aislar y destruir el agente extraño. El mayor problema que surge de la inflamación es que la defensa se dirige tanto hacia

agentes externos perjudiciales como inocuos, pudiendo provocar daño en tejidos sanos si no se resuelve adecuadamente. Un proceso inflamatorio mal resuelto da lugar a una autoperpetuación del estado inflamatorio cada vez de mayor intensidad, que afecta a todos los elementos que la integran, lo que constituye un serio problema oftalmológico.



**Figura 1:** Representación esquemática de la unidad funcional lagrimal. Adaptada de Stern et al, 1998.

La inflamación de la superficie ocular está mediada por diversas moléculas inflamatorias como son las citoquinas y las quimioquinas (Enriquez-de-Salamanca et al, 2008). Ciertas citoquinas, que se encuentran sobreexpresadas en determinadas patologías oculares inflamatorias, pueden ser utilizadas como marcadores de inflamación (Solomon et al, 2001; Lam et al, 2009; Enriquez de Salamanca et al, 2010). Ese es el caso de la interleuquina 6 (IL-6), que es una citoquina que se encuentra muy involucrada en la fase aguda de los procesos inflamatorios oculares (Mc Dermott et al, 2005). Así lo demuestran sus altos niveles de expresión en síndromes de naturaleza inflamatoria, como son los síndromes graves de ojo seco, de Sjögren, o de Stevens-Johnson (Yoon et al, 2007; Lam et al, 2009; Stern et al, 2010).

Otra molécula que cada vez está siendo más estudiada es el ácido hialurónico (Jonhson et al, 2009; Menezes et al, 2009), que es un mucopolisacárido ácido que participa en la regeneración del epitelio corneal, la cicatrización y la migración epitelial (Gomes et al, 2003). Para realizar dichas acciones interactúa con una serie de receptores celulares, entre los cuales se encuentra el CD44, que es el principal receptor de ácido hialurónico. Se trata de una glicoproteína transmembrana monopaso, cuya función es la unión del ácido hialurónico, así como de otras moléculas. El CD44 se expresa en muchos tipos celulares y está implicado en varios procesos celulares, como las interacciones célula-célula, la adhesión celular y la migración. Su expresión y su capacidad de unir ácido hialurónico están fuertemente reguladas, pudiendo existir este receptor en forma activa o inactiva (Isacke et al, 2002). Se ha demostrado que la expresión de este receptor se ve alterada en condiciones inflamatorias, lo cual podría implicar que esté involucrado en la inflamación de la superficie ocular (García-Posadas et al, 2012).

Los problemas inflamatorios que son causados por una lente de contacto (LC) pueden variar en gravedad yendo desde los infiltrados corneales estériles, a la hiperemia ocular aguda y pudiendo llegar hasta la úlcera periférica por lente de contacto (UPLC). La aparición de estas enfermedades depende en gran medida del régimen de uso de LC que se utilice. Así, la hiperemia ocular aguda y la UPLC se asocian fundamentalmente al uso prolongado, mientras que los infiltrados estériles pueden aparecer en cualquier régimen de utilización. La incidencia de estos problemas puede variar desde un 2 % en el caso de las UPLC (Sankuridurg et al, 1996), hasta un 12 % en el caso de la hiperemia ocular aguda (Sankuridurg et al, 1999). Estos problemas oculares van en aumento en los últimos años debido principalmente al número creciente de usuarios de LC en nuestro país y los países de su entorno.

Distintas pruebas con varias clases de LC y diferentes tipos de líquidos de mantenimiento, llevadas a cabo en sujetos sanos, han demostrado que existen ciertas combinaciones que producen o predisponen a sufrir determinadas alteraciones en la superficie ocular (Pisella et al, 2001; Andrasko et al, 2008; Diec et al, 2012; Carnt et al, 2012). Este hecho, en combinación con el desarrollo de un sistema in vitro que nos permite exponer un cultivo celular a una LC (Maltseva et al, 2007; Gorbet et al, 2010), nos podría facilitar el investigar qué tipo de alteraciones inflamatorias pueden ocurrir en las células de la córnea al encontrarse expuestas a la LC y el líquido de mantenimiento, y poder ayudar a interpretar los resultados de los trabajos clínicos.



## JUSTIFICACIÓN:

El uso de LC ha ido acompañado en muchas ocasiones de problemas en la superficie ocular. Estos problemas han ido evolucionando a la vez que lo hacían los materiales de los cuales estaban compuestas dichas lentes. Desde las primeras LC que se comenzaron a comercializar de forma más extendida, que estaban fabricadas en polimetilmetacrilato (PMMA), pasando por las lentes de hidrogel convencionales, hasta las más novedosas LC de hidrogel de silicona, se ha comprobado que pueden surgir efectos indeseados. Las LC de PMMA eran bastante molestas al comienzo de la adaptación y podían causar daños en la córnea debido a la rigidez que las caracterizaba, con las LC de hidrogel convencionales podían surgir problemas en la superficie ocular causados por la falta de oxígeno en la superficie ocular o incluso posibles infecciones, mientras que con las lentes de hidrogel de silicona aparecieron posibles interacciones entre los distintos líquidos de mantenimiento multipropósito y el material de la LC que dan lugar a un daño corneal.

El grupo de Superficie Ocular del IOBA está muy implicado en el estudio de los problemas inflamatorios que pueden afectar a la superficie ocular y desarrolla desde hace años una línea de investigación centrada en el estudio de los procesos inflamatorios desde distintos puntos de vista, y en el desarrollo de alternativas terapéuticas para su resolución.

Los problemas que puede causar una superficie ocular inflamada pueden variar ampliamente según el sujeto, desde una situación completamente asintomática hasta incluso casos en los que se desarrollen síndromes de insuficiencia límbica (SIL), los cuales son muy difíciles y costosos de tratar, y suponen una prueba muy dura para el paciente porque afectan gravemente a la visión.

Las interacciones entre los líquidos de mantenimiento, la LC y la superficie ocular actualmente sólo pueden ser evaluadas en aquellos usuarios de LC que hayan experimentado un malestar en dicha situación. Por ello, en este estudio se plantea el uso de una línea celular humana de epitelio corneal normal (HCE) para conseguir desarrollar un modelo de inflamación inducido por el contacto con una LC. De conseguirlo, la ventaja que ofrecería sería la posibilidad de testar la interacción entre los distintos tipos de LC, los diferentes líquidos de mantenimiento existentes y la línea celular humana en diferentes combinaciones que se nos planteen, y decidir cuáles pueden causar problemas en los usuarios y cuales son inicialmente seguras para nuestro epitelio corneal.



## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:

### *Hipótesis:*

Es posible desarrollar un modelo de inflamación *in vitro* causado por exposición a una LC, que permita realizar las medidas necesarias para determinar el grado de inflamación bajo distintas condiciones experimentales.

### *Objetivos:*

- Objetivo general:  
Conseguir valorar la expresión de IL-6 y CD44 en una línea celular de células de epitelio corneal humano (HCE), usados como marcadores de inflamación, y comprobar si hay diferencias en sus niveles de expresión entre aquellos casos en los que las células han estado en contacto con una LC y aquellos que han estado en condiciones control.
  
- Objetivos específicos:
  1. Poner a punto la técnica para mantener una LC sobre células HCE en cultivos a distintos tiempos.
  2. Evaluar si el mantenimiento de la LC a distintos tiempos y en diferentes condiciones sobre células HCE en cultivo produce alteraciones en la viabilidad o en la morfología de dichas células.
  3. Evaluar si el mantenimiento de la LC a distintos tiempos y en diferentes condiciones sobre células HCE en cultivo altera la tasa de proliferación celular.
  4. Determinar los niveles de expresión de IL-6 y CD44 en las células HCE expuestas a LC a distintos tiempos y en diferentes condiciones experimentales.



## MATERIAL Y MÉTODOS:

### 1. Materiales

#### 1.1 Reactivos

El medio de cultivo DMEM/F12 con GlutaMAX®, el tampón fosfato salino (PBS), el medio sin rojo fenol RPMI 1640, el suero fetal bovino (FBS), la insulina, la penicilina, la estreptomicina y la tripsina se obtuvieron de Invitrogen-GIBCO (Inchinnan, Reino Unido).

El colorante azul Tripán al 0,4 %, el reactivo XTT®, el cloruro de benzalconio (BAC), el buffer Laemmli, el suero de burro, el TWEEN20, los reactivos utilizados para preparar el tampón RIPA (Tris HCl, cloruro sódico, ácido desoxicólico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), dodecilsulfatosódico (SDS) y Tritón® X-100), el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), el ortovanadato sódico (NA<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) y la aprotinina se obtuvieron de Sigma-Aldrich Company (St Louis, MO, Estados Unidos).

El antibiótico antimicoplasma y el reactivo alamarBlue® se obtuvieron de AbD Serotec (Oxford, Reino Unido).

Los kits de ELISA que han sido utilizados para cuantificar la IL-6 humana en los cultivos fueron de Gen-Probe Diaclone (Besançon Cedex, Francia).

Los kits de ELISA utilizados para cuantificar la fracción soluble del CD44 (sCD44) (*eBioscience® Human sCD44std instant ELISA*) fueron de Bender MedSystems GmbH (Viena, Austria).

El kit utilizado para la cuantificación de proteína (*Pierce® BCA Protein Assay Kit*) fueron de Thermo Scientific (Rockford, IL, Estados Unidos).

El marcador de peso molecular *Precision Dual Color*, la membrana de nitrocelulosa, el Buffer TBS, el *Immun-Star™ HRP Peroxide Buffer* y el revelador *Immun-Star™ HRP Luminol/Enhancer*, utilizados para la electroforesis y el Western blotting fueron de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, Estados Unidos).

El anticuerpo primario Anti-CD44 Rat mAb A020 fue de Calbiochem (Darmstadt, Alemania), el anticuerpo primario Anti-IL-6 ab66231 fue de Abcam (Cambridge, Reino Unido) y el anticuerpo primario Anti-GAPDH sc-51905 fue de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, Estados Unidos).

El anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de rata conjugado con peroxidasa (112-035-167) y el anticuerpo secundario de burro anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (715-035-150) fueron de Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. (West Grove, PA, Estados Unidos).

Las placas de cultivo de células fueron de Corning (Costar, NY, Estados Unidos).

Las lentes de contacto (LC) Soflens®38 (polymacon) (Figura 2A) de -3.00 D de potencia, diámetro de 14 mm, con curva base 8,4 y 38,6 % de contenido acuoso e inmersas en buffer fosfato salino con 0,1 % de polyvinyl alcohol se obtuvieron de Bausch & Lomb (Rochester, NY, Estados Unidos).

El líquido de mantenimiento para lentes de contacto blandas *All clean® soft comfort+* (Figura 2B) fue de Avizor, S.A. (Madrid, España).



**Figura 2:** A) Lente de contacto hidrófila Soflens®38. B) Líquido de mantenimiento *All clean® soft comfort+* y envase de las LC.

## 1.2 Equipos

Para el cultivo de células se utilizó la cabina de flujo laminar de seguridad tipo II, Gelaire BSB 4A (Figura 3) de ICN Biomedicals, Flow Laboratories (Sidney, Australia) y el incubador de CO<sub>2</sub> Touch 190S de LEEC (Nottingham, Reino Unido).



**Figura 3:** Cabina de flujo laminar Gelaire BSB 4A.

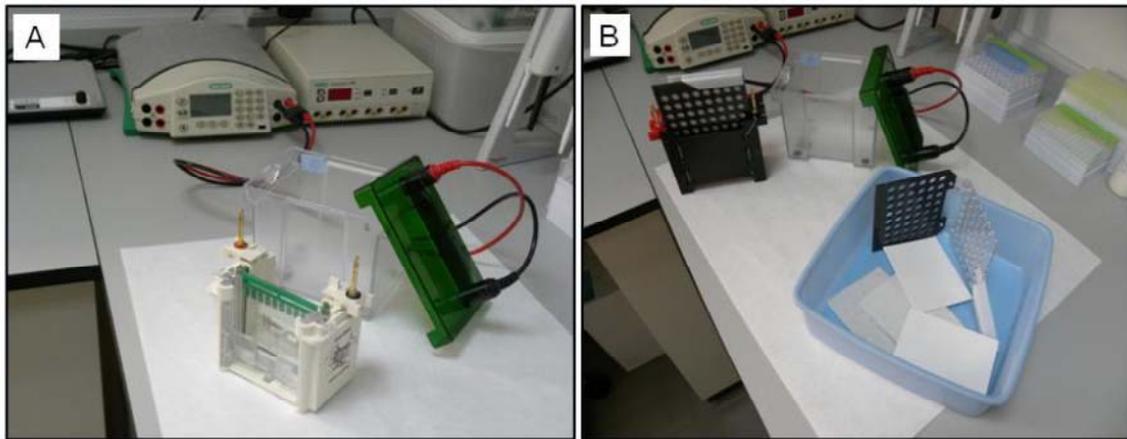
El microscopio óptico de contraste de fases usado fue el Nikon Eclipse TS 100 de Nikon Corporation (Tokio, Japón).

El multilector de placas empleado fue el SpectraMax® M5 (Figura 4) de Molecular Devices Corporation (CA, Estados Unidos), que usa el software SoftMaxPro.



**Figura 4:** Equipo multilector de placas SpectraMax® M5 con su ordenador asociado.

Para realizar la electroforesis y el Western blotting, se utilizó la fuente de electroforesis Power Pac 200 (Figura 5), así como el sistema de documentación de geles Chemi-Doc®, con el software Quantity One de Bio-Rad Laboratories, (Hercules, CA, Estados Unidos).



**Figura 5:** A) Imagen de la fuente Power Pac 200 y de la cubeta utilizada para electroforesis. B) Imagen de la fuente Power Pac 200 y del material utilizado para realizar la transferencia.

## 2. Línea celular HCE

Se empleó la línea celular de epitelio de córnea humano HCE ([Araki-Sasaki et al, 1995](#)) entre los pases 42 y 50.

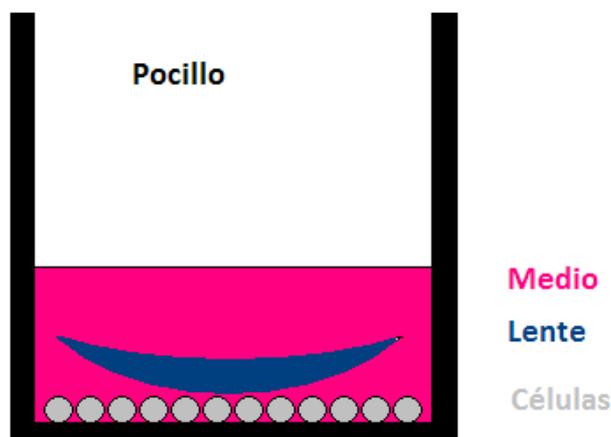
Se cultivaron las células en lo que se denominó Medio Completo, compuesto de medio de cultivo DMEM/F-12 con GlutaMAX®, suplementado con 15 % de FBS, 10 ng/mL de EGF, 4 mg/mL de insulina, una mezcla de penicilina (100 U/mL)-estreptomicina (0,1 mg/mL) y 0,5 µg/mL de antimicoplasma. Las células se incubaron a 37 °C bajo condiciones de 5 % CO<sub>2</sub> y 95 % de humedad.

Las células se subcultivaron mediante una solución de tripsina al 0,25 % tras dos lavados con PBS. Se contaron y se evaluó su viabilidad en una cámara Neubauer, empleando azul Tripán al 0,4 %. Sólo las células que mostraron en este punto una viabilidad superior al 90 % se sembraron en la concentración adecuada en placas de poliestireno de 24 pocillos. Se adecuó el número de células y la cantidad de medio de cultivo por pocillo dependiendo del ensayo a realizar.

## 3. Colocación de la lente de contacto (LC) sobre las células y condiciones de los cultivos

Las LC utilizadas en este estudio fueron seleccionadas basándonos en los 2 únicos trabajos previos existentes de este tipo ([Maltseva et al, 2007](#); [Gorbet et al, 2010](#)). Para su manejo dentro de la cabina de flujo laminar se utilizaron unas pinzas estériles de Bausch & Lomb para evitar cualquier contaminación. Las LC se pusieron

en contacto con los cultivos colocando la cara convexa hacia el cultivo para que existiera un contacto LC-monocapa de células.



**Figura 6:** Esquema ilustrativo de la situación de la LC puesta sobre las células HCE adheridas a la superficie del pocillo de cultivo.

Se estudió el efecto de 3 tipos de lavados de las LC para diferenciar las interacciones que pudieran darse entre las células y la LC y entre las células y el líquido de mantenimiento. Previo a la colocación de la LC en el cultivo se realizaron dos lavados de 10 minutos con los líquidos seleccionados (Tabla 1), que fueron PBS, líquido de mantenimiento All clean® o el propio líquido del estuche donde se envía la LC. En este último caso, la LC se puso directamente desde el estuche inmediatamente después de su apertura. Posteriormente, se realizó un último lavado de arrastre para limpiar la superficie de la lente.

**Tabla 1:** Líquidos utilizados para lavar las LC y su composición.

Líquido de lavado de la LC	Composición
PBS	Buffer fosfato salino
Líquido de mantenimiento All clean®	Buffer isotónico con poloxamer, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), polivinilpirrolidona (PVP), polyhexanide al 0,0002 % y agente antidepósito de proteínas
Líquido de embalaje	Buffer fosfato salino con alcohol polivinílico al 0,1 %

Los experimentos se realizaron a diferentes tiempos de exposición de las células a la LC (24, 48 y 72 h) para poder observar la evolución del cultivo. En todos los casos se incluyen controles con células no expuestas a LC para poder comparar resultados. Transcurrido el tiempo de contacto con las LC éstas se retiraron del cultivo y se realizaron los diferentes análisis.

#### 4. Medida de la viabilidad celular

Se midió la viabilidad celular con el test XTT para observar si se producía un daño celular en las distintas situaciones en estudio transcurridas 24 h de la colocación de la lente en contacto con las células.

El test de viabilidad celular empleado se basa en la reducción de la sal de sodio 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil)-2H-tetrazolio-5-carboxianilida (XTT) por las deshidrogenasas mitocondriales, que formarán cristales de formazán, modificando el color inicial de la solución si las células son viables. Este hecho puede ser observado mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm, con una longitud de onda de referencia de 620 nm (Figura 7).



**Figura 7:** Placa de 24 pocillos que muestra el degradado de color de la prueba según la viabilidad celular, de tal forma que el color más intenso indica mayor viabilidad.

Para realizar el test se sembraron placas de 24 pocillos con 30.000 células por pocillo y se dejaron en medio completo (suplementado) durante 48 h en el incubador. Tras ese tiempo las células alcanzaron un grado de confluencia del 90-95 %. Pasadas esas 48 h, se retiró el medio completo y se incubaron las células durante otras 24 h con medio puro (sin ningún suplemento). A continuación, los cultivos se lavaron con PBS, se les añadió medio sin ningún suplemento nuevo y se procedió a la colocación de las LC en las diferentes condiciones, dejándose en contacto durante 24 h en el incubador.

El reactivo XTT<sup>®</sup> se diluyó en medio de cultivo RPMI 1640 sin rojo fenol al 20 %. Para obtener la medida de la viabilidad celular, después de la exposición de las células a las diferentes condiciones en estudio, se realizó un lavado con PBS, se añadió el reactivo XTT<sup>®</sup> diluido a los pocillos y se incubó la placa a 37 °C durante 17 h. A continuación, se leyó la placa en el espectrofotómetro mediante la utilización del software Softmax Pro.

Se emplearon células sin ningún tratamiento como control negativo de toxicidad (100 % viables) y células expuestas a una solución al 0,05 % de cloruro de benzalconio (BAC) como control positivo de toxicidad (viabilidad siempre inferior al 10 %). n = 3, por triplicado.

## 5. Medida de la proliferación celular

Se midió la tasa de proliferación de las células HCE para comprobar si se producían variaciones en ésta causadas por las distintas condiciones en estudio transcurridas 24, 48 y 72 h de exposición de las células a la LC. Para ello se utilizó el ensayo del alamarBlue<sup>®</sup>.

El alamarBlue<sup>®</sup> tiene como componente principal el resazurin, un compuesto no tóxico y permeable para las células que, al entrar en el interior de las células viables, es reducido a resarufin, un compuesto que emite fluorescencia. Este reactivo se diluyó al 10 % en medio puro. Tras 4 h en contacto con las células a 37 °C, se procedió a la lectura del resultado transfiriendo el medio a placas de 96 pocillos. Se detectó el valor de cada pocillo midiendo la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 560 nm y de emisión de 590 nm.

Para la realización de esta prueba fue necesario tener preparadas placas independientes para cada condición y cada tiempo en estudio, ya que se comprobó que las LC absorben en su matriz el reactivo alamarBlue<sup>®</sup>. Esto imposibilita la realización de la prueba de la forma correcta, que sería el mantenimiento de la LC en el pocillo durante las 72 h del estudio, añadiendo el reactivo alamarBlue<sup>®</sup> al mismo en los tiempos de lectura de la prueba sin retirar la LC.

Para realizar el test se sembraron placas de 24 pocillos con 25.000 células por pocillo y se incubaron en medio completo durante 48 h para que alcanzasen un 70-75 % de confluencia. Se retiró en ese momento el medio de cultivo, se colocaron todas las LC en las distintas condiciones en las placas y se realizó el ensayo de alamarBlue<sup>®</sup> en los controles sin LC. A los datos de proliferación obtenidos se los consideró T0. Tras 24, 48 ó 72 h de incubación fueron retiradas las LC de las placas

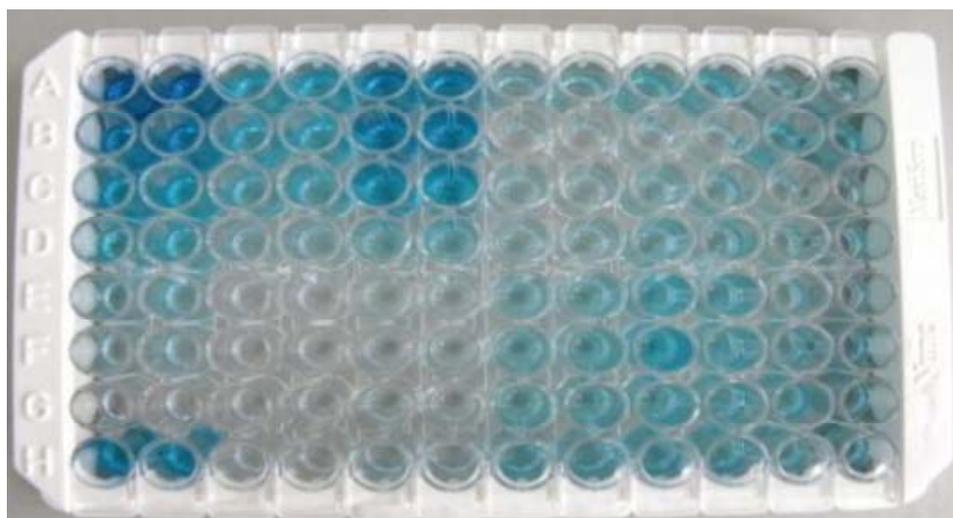
de cultivo y se realizaron las lecturas de alamarBlue® secuencialmente. n = 3, por triplicado.

## 6. Medida de la expresión de marcadores inflamatorios

Como marcadores de inflamación se seleccionaron la IL-6 y el receptor de ácido hialurónico CD44, además de su fracción soluble (sCD44). Para cuantificar el efecto inflamatorio ejercido por las LC sobre las células HCE en las distintas condiciones en estudio, se analizaron extractos celulares y los sobrenadantes de los cultivos recogidos a los diferentes tiempos (24, 48 y 72 h). De esta forma se pretendía obtener información sobre la variación en la expresión de IL-6, CD44 y sCD44 a nivel de proteína y de secreción respectivamente. n = 2, triplicado.

### 6.1 En sobrenadantes de cultivos mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Para las determinaciones se siguieron las indicaciones del fabricante de los kits comerciales. El método de análisis cuantitativo fue una curva patrón utilizando diluciones seriadas de IL-6, en un caso, y de sCD44 en otro, de concentración conocida, incluido en el kit. Los valores obtenidos se normalizaron con los valores de los controles.



**Figura 8:** Placa de 96 pocillos que identifica los niveles de IL-6 secretados mediante el degradado de color, indicando una mayor presencia de IL-6 a mayor intensidad de color.

## 6.2 En extractos de proteínas mediante electroforesis y Western blotting

Se realizó la extracción de proteína total de las células HCE expuestas a las LC en las distintas condiciones en estudio. Se lavaron las células con PBS frío y se añadió tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) suplementado con 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  PMSF, 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de 100 mM de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , y 6  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de aprotinina, que son inhibidores de proteasas. Esta mezcla permite la lisis celular y la disolución de las proteínas, evitando la degradación de las mismas. Se rascó cada pocillo con una punta de pipeta para levantar las células de este, romper las uniones entre ellas y obtener una solución. Se realizó un *pool* con los extractos de los triplicados de cada condición para obtener una cantidad suficiente de proteína. Se incubaron las soluciones durante 30 minutos en hielo y posteriormente se centrifugaron a 14.000 rpm y 4 °C durante 30 minutos. Se recogieron los sobrenadantes y se guardaron en los ultra congeladores a -80°C. Para la determinación de proteínas se utilizó el kit *Pierce® BCA Protein Assay Kit*, siguiendo las instrucciones del fabricante. La determinación se realizó mediante un método de absorción colorimétrica en el multilector de placas, a una longitud de onda de 562 nm y una longitud de onda de referencia de 450 nm. El método de análisis cuantitativo fue una curva patrón utilizando diluciones seriadas de albúmina bovina de concentración conocida.

Para la identificación de proteínas mediante electroforesis y Western blotting se utilizaron alícuotas de las muestras cuya cantidad de proteína total se había determinado previamente y se mezclaron 1x1 con el reactivo Laemmli. Este reactivo indicará el frente de migración proteica durante la electroforesis, ya que contiene azul de bromofenol, una molécula coloreada de bajo peso molecular que avanza rápidamente actuando como marcador del frente de electroforesis, y aumentará la densidad de la muestra para que quede en los pocillos sin dispersarse, ya que contiene glicerol o sacarosa. Otro componente es el 2-mercaptoetanol o el ditioneitol (DTT), que romperá los enlaces intra o inter catenarios. Tras realizar la mezcla las muestras se cocieron a 110°C durante 5 minutos para romper todos los enlaces y desnaturalizar las proteínas.

Una vez cocidas las muestras se mantuvieron en hielo hasta realizar la electroforesis. Para ello se prepararon geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). El detergente SDS recubre el polipéptido, ya desnaturalizado, de cargas negativas, haciendo despreciables las cargas de la propia estructura aminoacídica de la proteína. Así, todas las proteínas tienen una densidad de carga uniforme, provocando la separación proteica según el peso molecular.

El tamaño de poro de un gel está determinado por la concentración total de

acrilamida presente. Para detectar el receptor de ácido hialurónico CD44 se empleó un tamaño de poro mayor (10 %T) que para detectar la IL-6 (12 %T). Esto se debe al distinto peso molecular de las proteínas de estudio, de modo que a mayor peso molecular de la proteína de interés, menor %T será necesario para una buena separación electroforética y su posterior detección.

Se cargaron 15 µg de proteína por pocillo, añadiendo un pocillo con un marcador de peso molecular. Los tiempos y parámetros empleados para la electroforesis fueron de 15 minutos a 70 V seguido de 1 h a 120 V.

Para la fase de transferencia, en la cual las proteínas, ya separadas por su peso molecular, son transferidas a una membrana de nitrocelulosa para su inmunodetección, se empleó un amperaje de 350 mA durante 1 hora y media, manteniendo la cubeta siempre en frío.

Para la inmunodetección de las proteínas de interés, se incubaron las membranas con tampón de bloqueo, previamente, y con distintos anticuerpos primarios y secundarios posteriormente (Tabla 2), siempre con 3 lavados de TBS-T entre ellos, de 15 minutos cada uno. La concentración final de cada anticuerpo se fijó según las recomendaciones de la casa comercial. El revelado de las membranas se realizó por quimioluminiscencia. Para ello, se mezclaron previamente y a partes iguales el Buffer Immun-Star™ HRP Peroxide Buffer y el Revelador Immun-Star™ HRP Luminol/Enhancer. La detección se realizó mediante un sistema de documentación de geles en el ChemiDoc®.

**Tabla 2:** Condiciones y anticuerpos utilizados para la inmunodetección de proteínas mediante electroforesis y Western blotting.

	<b>IL-6</b>	<b>CD44</b>	<b>GAPDH</b>
<b>Tampón de bloqueo</b>	5 % leche en polvo + 4 % de suero de burro en TBS-T	5 % leche en polvo + 4 % de suero fetal bovino en TBS-T	5 % leche en polvo + 4 % de suero de burro en TBS-T
<b>Ac primario</b>	Dilución 1:400	Dilución 1:800	Dilución 1:1000
<b>Ac secundario</b>	Dilución 1:5000	Dilución 1:2000	Dilución 1:5000

Para la cuantificación del receptor de ácido hialurónico CD44 y de la IL-6, los valores obtenidos tras el análisis volumétrico de las bandas correspondientes se normalizaron con los valores de la proteína GAPDH obtenidos simultáneamente mediante el mismo análisis. n=2, duplicado.

## 7. Estadística

Los datos se presentan para cada conjunto de muestras como la media  $\pm$  el error estándar de la media o SEM.

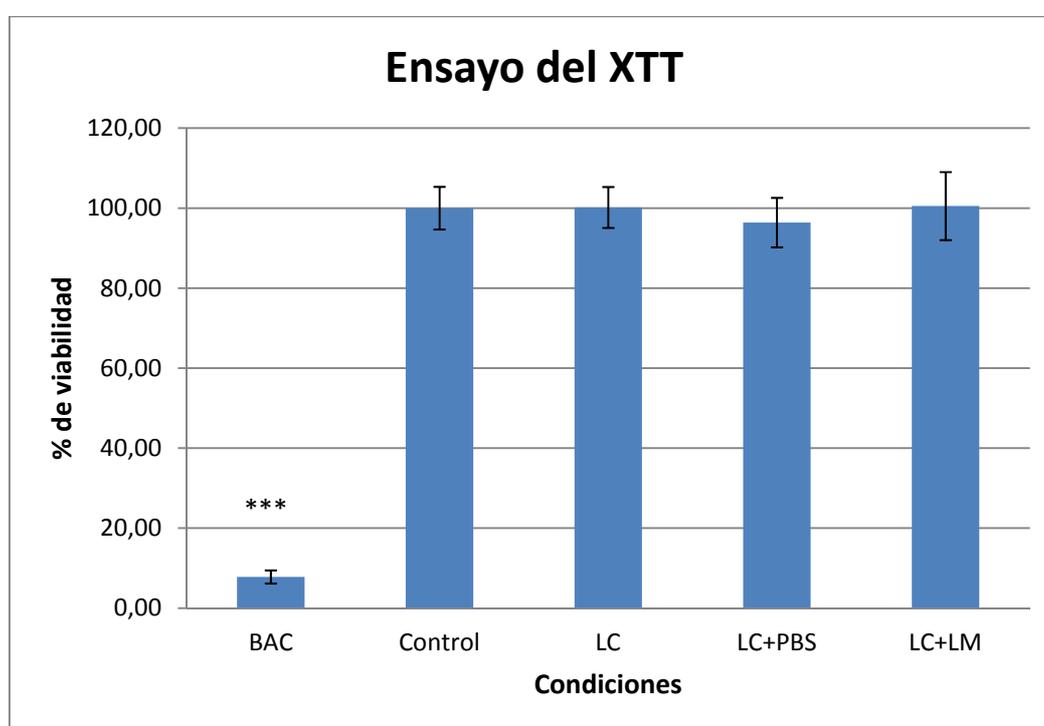
Para determinar si las diferencias fueron estadísticamente significativas o no, se empleó la prueba t de Student, de dos colas estableciendo el nivel de significación en  $p \leq 0,05$ . En todos los casos se consideró que las varianzas entre grupos eran diferentes.



## RESULTADOS:

### 1. Estudio de la viabilidad celular

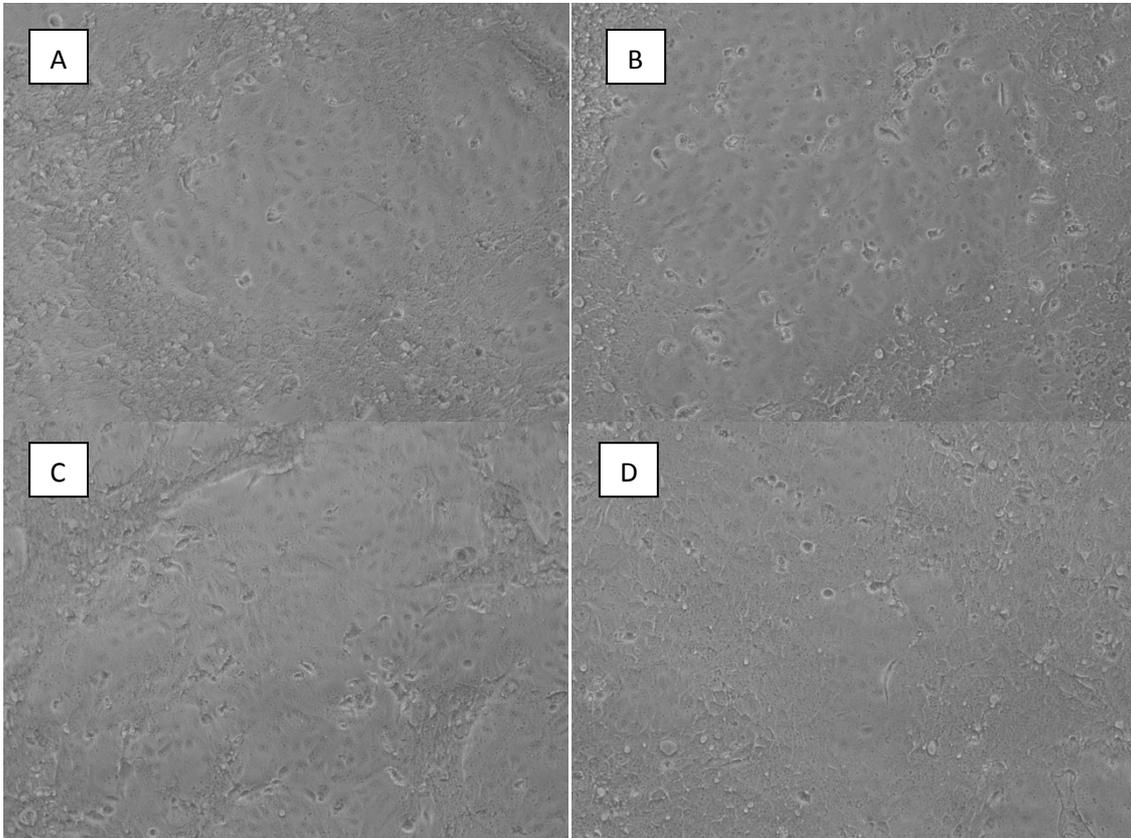
El control positivo de toxicidad, el BAC, indujo un porcentaje de viabilidad siempre inferior al 10 %, como se esperaba, mientras que el valor del control negativo de toxicidad se tomó como referencia para determinar el 100 % de viabilidad. La viabilidad de las células HCE tras permanecer 24 h en contacto con las LC en las distintas condiciones del estudio se mantuvo siempre por encima del 95 % (Figura 9).



**Figura 9:** Porcentajes de viabilidad obtenidos en el ensayo tras poner en contacto las células HCE con las distintas condiciones experimentales, donde BAC es cloruro de benzalconio, LC es lente directamente del blister, LC+LM es lente lavada en líquido de mantenimiento y LC+PBS es lente lavada con PBS.  $n = 3$ , por triplicado. \*\*\* $p < 0.001$  entre el control y las condiciones indicadas.

En la figura 9, se puede observar que los diferentes cultivos de células HCE en contacto con lentes lavadas en líquido de embalaje (LC), con lentes lavadas en PBS (LC+PBS) y con lentes lavadas en líquido de mantenimiento (LC+LM) mantuvieron una viabilidad prácticamente inalterada respecto del control y muy parecida en todos los casos. Esto indicaría que, al menos tras 24 h de contacto, las LC no inducen ningún efecto nocivo para las células HCE.

La evaluación morfológica de los cultivos con el microscopio de contraste de fases confirmó los resultados anteriores. El aspecto de las células antes y después de estar 24 h en contacto con las lentes lavadas en las tres condiciones en estudio fue similar.



**Figura 10:** Imágenes obtenidas con el microscopio invertido de contraste de fases, en las que podemos observar la morfología de las células tras 24 h de exposición a la LC según las distintas condiciones de lavado, donde A es el control sin lente de contacto, B es lente de contacto directamente del blíster, C es lente de contacto lavada con líquido de mantenimiento y D es lente de contacto lavada con PBS.

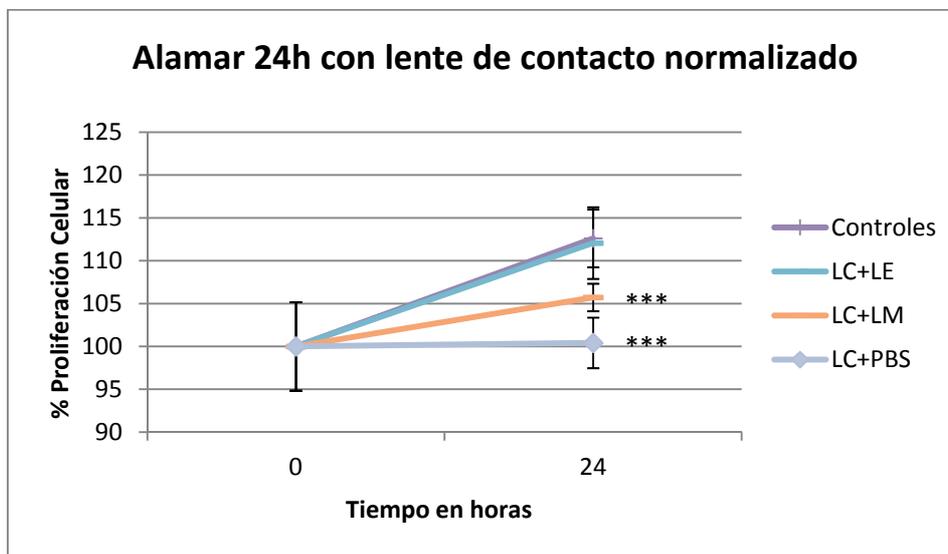
## 2. Estudio de la proliferación celular

El primer resultado que se obtuvo fue la comprobación de la interacción del reactivo alamarBlue® con las LC. Al realizar la técnica con la LC colocada sobre las células se observó que parte del reactivo se incorporaba a la lente, con lo que al realizar la técnica en días consecutivos sobre el mismo pocillo la lente cada vez estaba más coloreada y la cantidad de reactivo disponible para determinar la proliferación variaba, haciendo que los datos no fueran fiables. Por lo tanto, se decidió realizar el estudio en placas independientes para cada tiempo seleccionado. Es por ello que se presentan los resultados del estudio de los

cambios en la proliferación celular de la línea HCE en respuesta al contacto con las LC durante 24, 48 y 72 h en gráficas independientes.

En todos los casos se obtuvo una disminución en la tasa de proliferación de las células HCE expuestas a las tres condiciones del estudio comparado con la de las células control no expuestas a LC (Figuras 11-13).

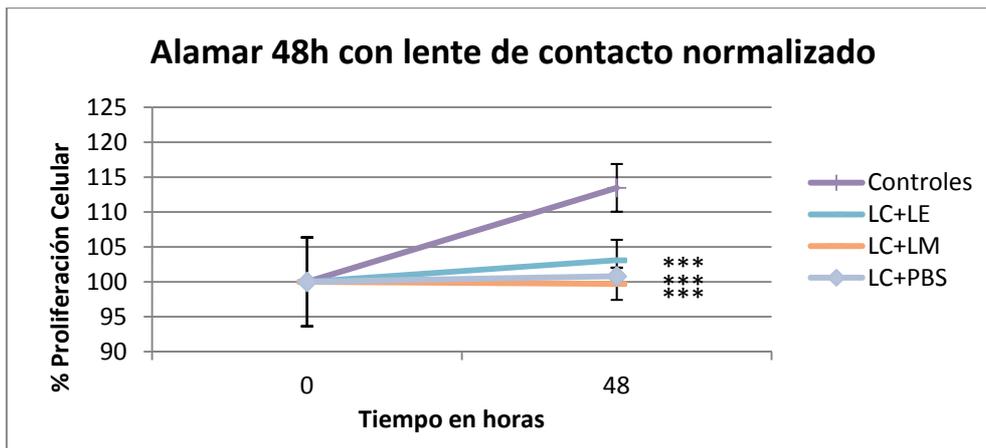
En la medida de la proliferación a 24 h (Figura 11) se encontró que, todas las condiciones tienen un valor inferior a los controles, las diferencias fueron estadísticamente significativas en las condiciones en las que se lavaron las LC con PBS y con líquido de mantenimiento.



**Figura 11:** Gráfica de proliferación de las células HCE obtenida según las distintas condiciones de lavado de la LC tras 24 h de exposición a ésta, donde LC+LE es lente de contacto directamente del blister, LC+LM es lente de contacto lavada en líquido de mantenimiento y LC+PBS es lente de contacto lavada con PBS. n = 3, por triplicado.

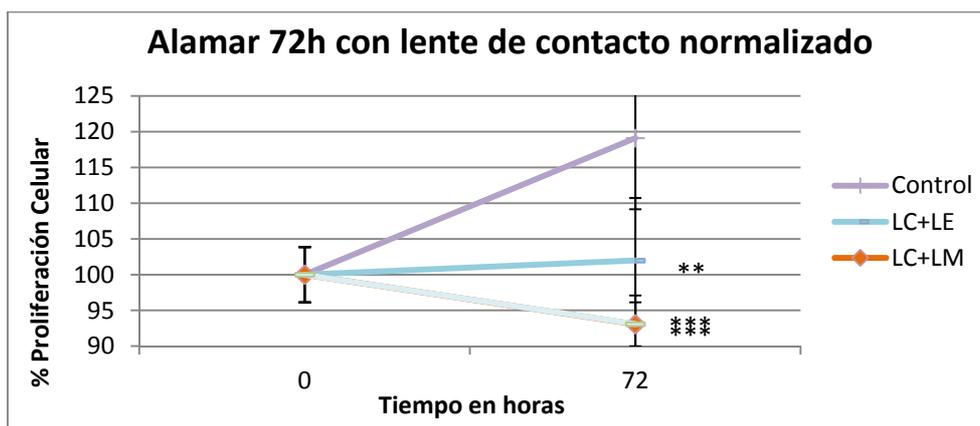
\*\*\* $p < 0.001$  entre el control y las condiciones indicadas.

Cuando la medida de la proliferación se llevó a cabo trascurridas 48 h desde que se puso la LC (Figura 12) se vio que todas las condiciones obtenían valores muy próximos entre ellas, pero alejados en torno a un 10 % al de los controles. Se comprobó que estas diferencias eran estadísticamente significativas para las tres condiciones que se estudiaron.



**Figura 12:** Gráfica de proliferación de las células HCE obtenida según las distintas condiciones de lavado de la LC tras 48 h de exposición a ésta, donde LC+LE es lente de contacto directamente del blister, LC+LM es lente de contacto lavada en líquido de mantenimiento y LC+PBS es lente de contacto lavada con PBS. n = 3, por triplicado. \*\*\* $p < 0.001$  entre el control y las condiciones indicadas.

Por último, en la medida realizada tras 72 h de contacto (Figura 13) se vio que las diferencias aumentaban entre las condiciones y los controles, llegando a obtenerse valores de proliferación inferiores a los obtenidos a las 48 h en los casos de LC+LM y LC+PBS, lo que podría estar indicando que no sólo éstas condiciones reducen el ritmo de la proliferación normal de las células, sino que también puede estar dándose una pérdida de células. Se comprobó que estas diferencias eran estadísticamente significativas para las tres condiciones que se estudiaron.

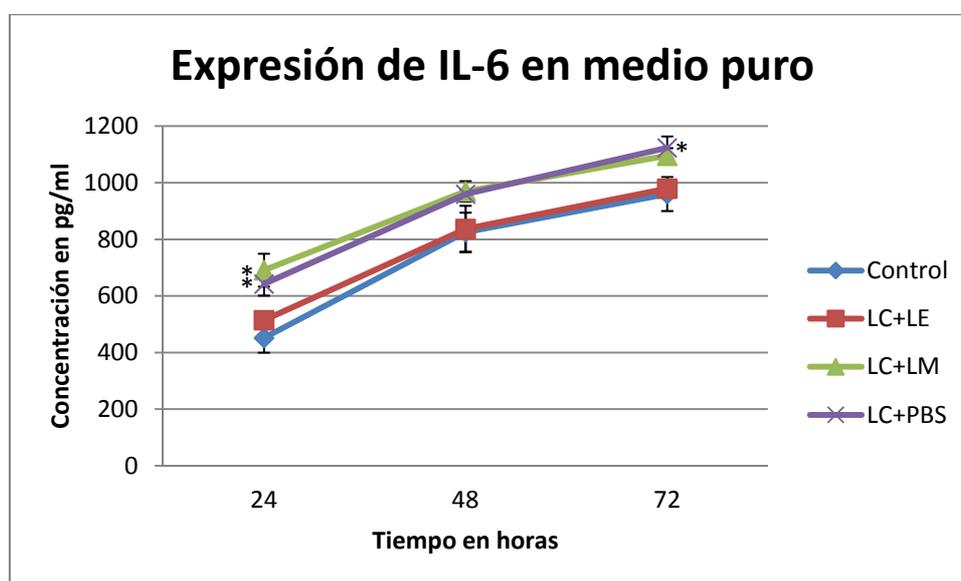


**Figura 13:** Gráfica de proliferación de las células HCE obtenida según las distintas condiciones de lavado de la LC tras 72 h de exposición a ésta, donde LC+LE es lente de contacto directamente del blister, LC+LM es lente de contacto lavada en líquido de mantenimiento y LC+PBS es lente de contacto lavada con PBS. n = 3, por triplicado. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  entre el control y las condiciones indicadas.

### 3. Secreción de la IL-6

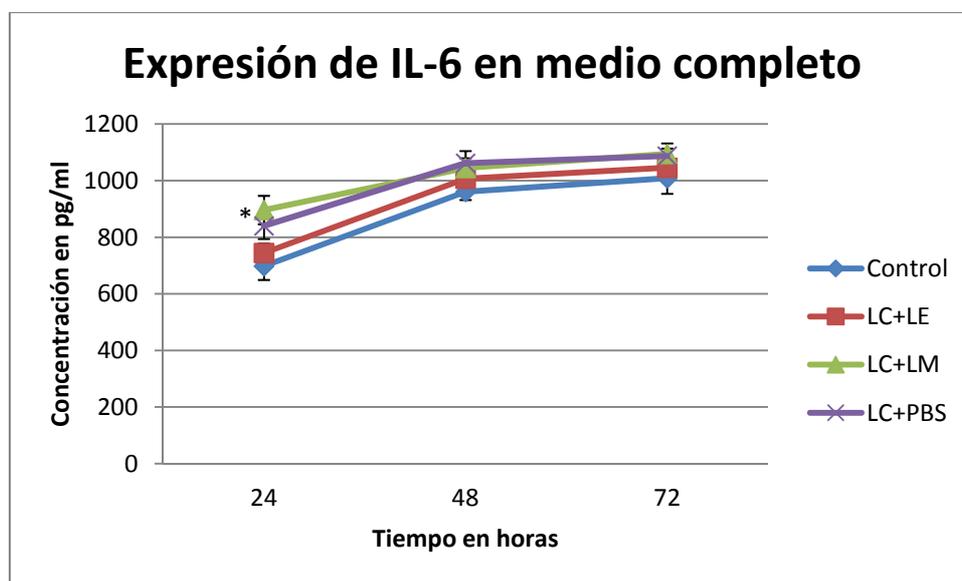
Nuestro grupo ya había comprobado previamente que las células HCE expresan IL-6 en condiciones basales (sin estimular) y que los niveles se incrementan en respuesta a un estímulo inflamatorio, como es el TNF $\alpha$ . Igualmente, se había comprobado la secreción de la fracción soluble de CD44 en condiciones basales y su disminución bajo diversos estímulos inflamatorios, como son la exposición a TGF $\beta$  o a IL13 (ambas citoquinas proinflamatorias). Se evaluó, por tanto, la variación en los niveles de expresión de estas dos moléculas bajo las distintas condiciones de este estudio a las 24, 48 y 72 h.

En la figura 14 se puede observar un aumento progresivo en la concentración de IL-6 desde el momento en el que se produce el cambio de medio al T0 (tras 24 h), hasta las 72 h. Se observa que las condiciones en las que la LC fue lavada con líquido de mantenimiento y con PBS tienen una secreción mayor de IL-6 frente a los controles, esta diferencia fue estadísticamente significativa tras 24 h de exposición para ambas condiciones y tras 72 h cuando la LC fue lavada con PBS. En este caso los experimentos se realizaron manteniendo a las células con medio puro en todo momento.



**Figura 14:** Gráfica que muestra la expresión de IL-6 obtenida en medio sin suplementos según las distintas condiciones de lavado de la LC tras 24, 48 y 72 h de exposición a ésta, donde LC+LE es lente de contacto directamente del blister, LC+LM es lente de contacto lavada en líquido de mantenimiento y LC+PBS es lente de contacto lavada con PBS. n = 2, por triplicado. \* $p < 0.05$  entre el control y las condiciones indicadas.

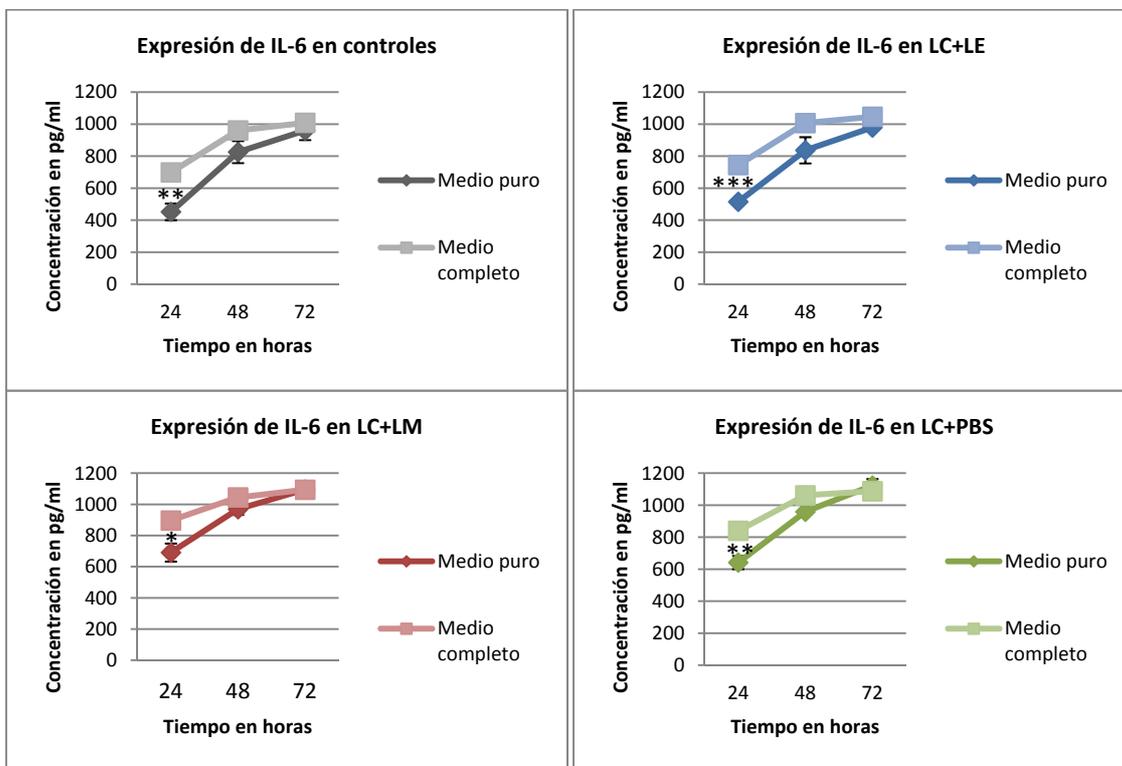
En la figura 15 se muestra la expresión de IL-6 cuando las células se mantienen en medio suplementado. Durante las primeras 24 h las células secretan la mayor cantidad de IL-6, ralentizándose su secreción hasta las 48 h y prácticamente deteniéndose llegadas las 72 h. En la gráfica también se puede observar que la secreción tanto para los controles como para las condiciones en estudio fue muy similar. Se comprobó también que, si bien se producía un aumento de la secreción de IL-6 en todos los casos, las diferencias entre las condiciones en estudio fue mucho menor que en el caso del medio sin suplementos. Además, había una secreción inicial a 24 h superior a la medida cuando el medio no tenía suplementos, pero a las 72 h se llegaba aproximadamente a los mismos niveles.



**Figura 15:** Gráfica que muestra la expresión de IL-6 obtenida en medio suplementado según las distintas condiciones de lavado de la LC tras 24 h, 48 h y 72 h de exposición a ésta, donde LC+LE es lente de contacto directamente del blister, LC+LM es lente de contacto lavada en líquido de mantenimiento y LC+PBS es lente de contacto lavada con PBS. n = 2, por triplicado. \* $p < 0.05$  entre el control y las condiciones indicadas.

Como resumen, si se comparan los niveles de secreción de IL-6 en las distintas condiciones de forma individual, comparando los resultados obtenidos utilizando medio puro (sin suplementos) o con medio suplementado (Figura 16), se observa cómo la producción de IL-6 es mayor en el caso de utilizar medio completo transcurridas 24 h, mientras que a las 72 h la secreción total es prácticamente la misma. Además, las diferencias observadas a las 24 h van desapareciendo y a las 72 h los niveles de IL-6 son equiparables en los controles sin LC y las células con LC. Todo esto indicaría, por una parte, una influencia de los suplementos del medio en

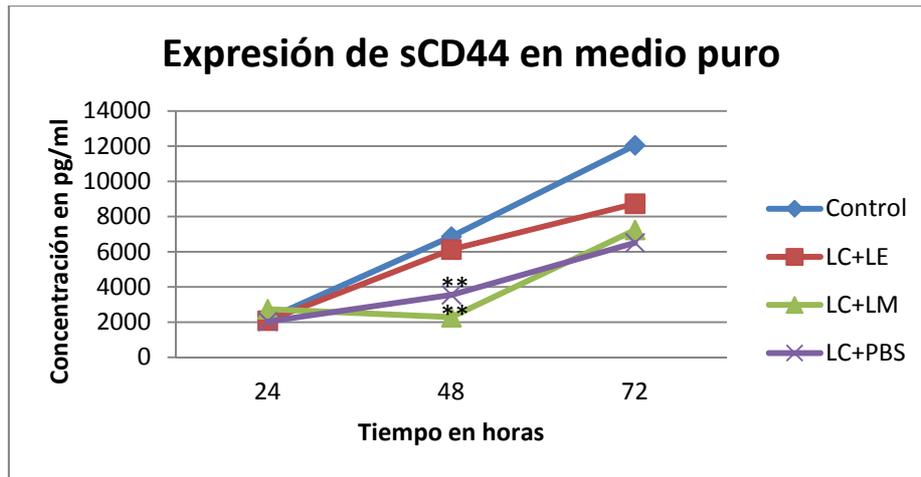
los resultados y por otra, que el aumento en los niveles de IL-6 observados en los casos experimentales con respecto al control a las 24 h parecen transitorios.



**Figura 16:** Conjunto de gráficas en las que se compara la expresión de IL-6 en medio suplementado y medio sin suplementar agrupada según las distintas condiciones de lavado de la LC tras 24, 48 y 72 h de exposición a ésta, donde LC+LE es lente de contacto directamente del blister, LC+LM es lente de contacto lavada en líquido de mantenimiento y LC+PBS es lente de contacto lavada con PBS.  $n = 2$ , por triplicado. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  entre el medio puro y el medio completo de cada condición en el tiempo determinado.

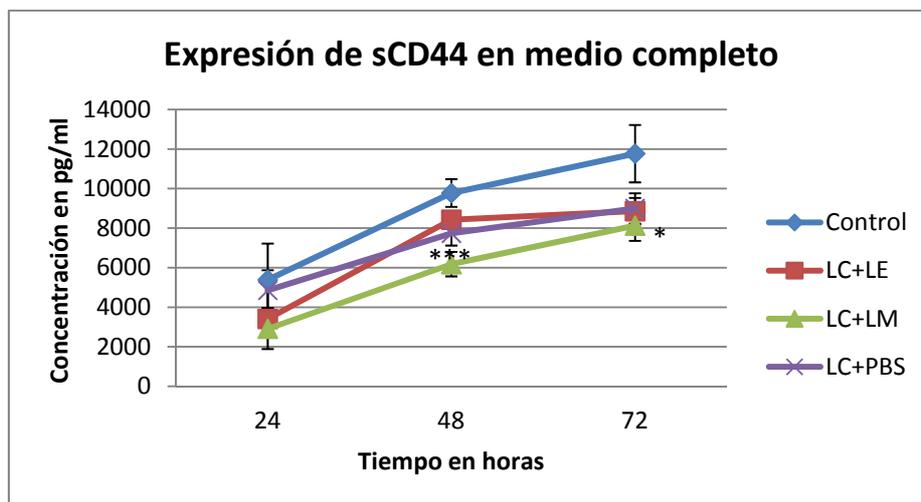
#### 4. Secreción de sCD44

En la figura 17 se puede ver que, si bien transcurridas 24 h de poner la LC la detección de sCD44 es prácticamente idéntica en las distintas condiciones y los controles, al final del experimento, tras 72 h apreciamos una disminución de la cantidad detectada en las condiciones experimentales frente a los controles. Las tres condiciones dan lugar a un valor bastante próximo entre ellas transcurridas 72 h, pero el patrón de secreción a lo largo del tiempo se ve que no es el mismo; se observa que las condiciones LC+LM y LC+PBS dan lugar a una secreción más tardía que la condición LC+LE y el control.



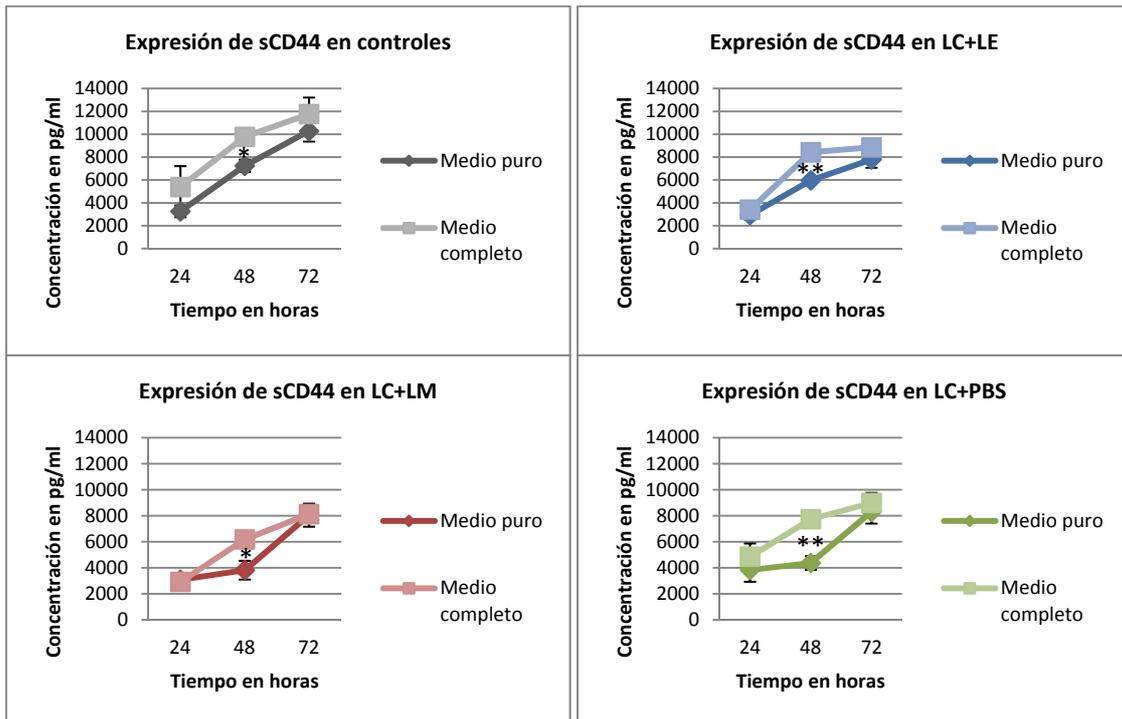
**Figura 17:** Gráfica que muestra la expresión de sCD44 obtenida en medio sin suplementos según las distintas condiciones de lavado de la LC tras 24, 48 y 72 h de exposición a ésta, donde LC+LE es lente de contacto directamente del blister, LC+LM es lente de contacto lavada en líquido de mantenimiento y LC+PBS es lente de contacto lavada con PBS. n = 2, por triplicado.  $^{***}p < 0.01$  entre el control y las condiciones indicadas.

En la figura 18 se ve que tras 24 h de contacto con la LC la expresión de sCD44 en medio suplementado es prácticamente idéntica en las condiciones y los controles, mientras que al final del estudio pasadas 72 h se aprecia una disminución de la cantidad detectada en las condiciones frente a los controles.



**Figura 18:** Gráfica que muestra la expresión de sCD44 obtenida en medio suplementado según las distintas condiciones de lavado de la LC tras 24, 48 y 72 h de exposición a ésta, donde LC+LE es lente de contacto directamente del blister, LC+LM es lente de contacto lavada en líquido de mantenimiento y LC+PBS es lente de contacto lavada con PBS. n = 2, por triplicado.  $^{***}p < 0.01$ ,  $^{*}p < 0.05$  entre el control y las condiciones indicadas.

Como en el caso de la IL-6, se observa una influencia de los suplementos del medio de cultivo en las medidas experimentales. En la figura 19 se puede ver que la mayor producción de sCD44 en medio completo se produjo entre las 24 h y las 48 h tras poner la LC, mientras que cuando se usó el medio puro el tiempo de mayor producción ocurre entre las 48 y las 72 h. Este hecho se traduce en una diferencia estadísticamente significativa en la detección transcurridas 48 h, mientras que la detección es muy similar una vez se alcanzan las 72 h.

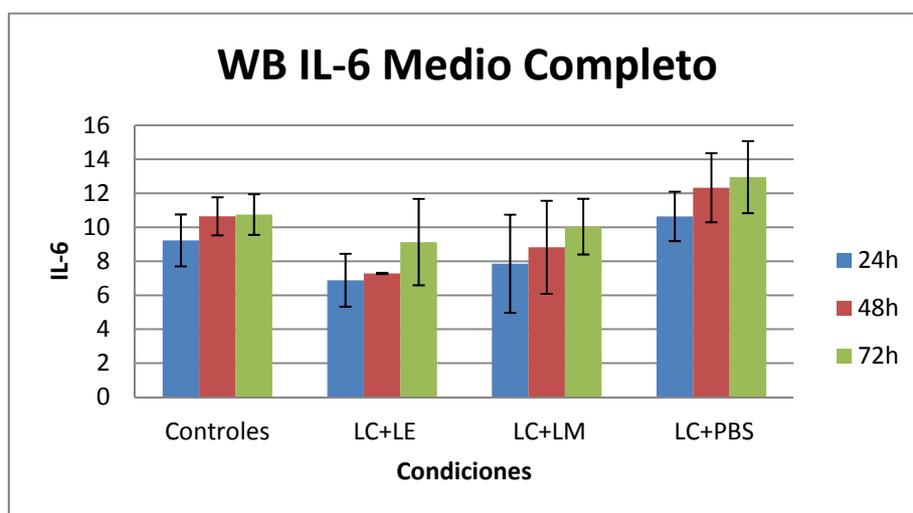


**Figura 19:** Conjunto de gráficas en las que se compara la expresión de sCD44 en medio suplementado y medio sin suplementar agrupada según las distintas condiciones de lavado de la LC tras 24, 48 y 72 h de exposición a ésta, donde LC+LE es lente de contacto directamente del blister, LC+LM es lente de contacto lavada en líquido de mantenimiento y LC+PBS es lente de contacto lavada con PBS.  $n = 2$ , por triplicado. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  entre el medio puro y el medio completo de cada condición en el tiempo determinado.

En resumen, aparte de la influencia de los suplementos del medio en los niveles de sCD44, se da una disminución en la secreción de esta molécula por parte de las células expuestas a las tres condiciones experimentales al cabo de 72 h.

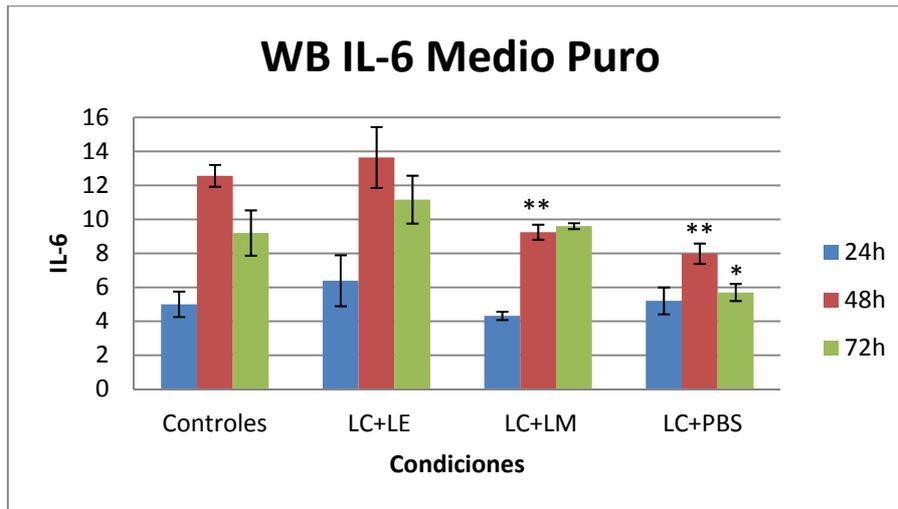
## 5. Detección de la IL-6 mediante electroforesis y Western blotting

Se evaluó la expresión de IL-6 utilizando la electroforesis y el Western blotting. Como se puede observar en la figura 20 la producción de IL-6 en medio suplementado se ve aumentada a lo largo del tiempo independientemente de las condiciones en las que centremos nuestra atención.



**Figura 20:** Gráfica que muestra la expresión de IL-6 obtenida en medio suplementado según las distintas condiciones de lavado de la LC tras 24, 48 y 72 h de exposición a ésta, donde LC+LE es lente de contacto directamente del blister, LC+LM es lente de contacto lavada en líquido de mantenimiento y LC+PBS es lente de contacto lavada con PBS. n = 2.

En la figura 21 se puede ver como todas las condiciones en medio sin suplementar tienen un mismo patrón de producción de IL-6, se observa un aumento tras 48 h que va acompañado de una disminución transcurridas 72 h de exposición a la LC. Se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar con los controles los resultados obtenidos para las condiciones LC+LM tras 48 h de exposición y LC+PBS tras 48 y 72h de exposición.



**Figura 21:** Gráfica que muestra la expresión de IL-6 obtenida en medio sin suplementar según las distintas condiciones de lavado de la LC tras 24, 48 y 72 h de exposición a ésta, donde LC+LE es lente de contacto directamente del blister, LC+LM es lente de contacto lavada en líquido de mantenimiento y LC+PBS es lente de contacto lavada con PBS.  $n = 2$ . \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  entre el control y las condiciones indicadas.

Parece, por lo tanto, que de nuevo los suplementos del medio afectan a la medida de la IL-6, obteniéndose valores contradictorios.

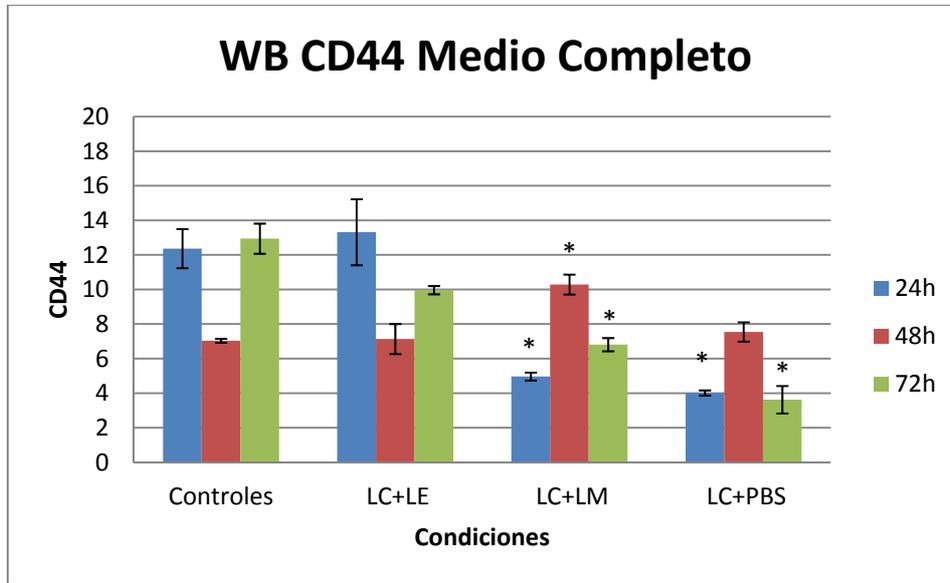
	C 24h	C 48h	C 72h	LC 24h	LC 48h	LC 72h	LM 24h	LM 48h	LM 72h	PBS 24h	PBS 48h	PBS 72h
<b>IL-6</b> ≈50kDa												
<b>GAPDH</b> ≈37kDa												

**Figura 22:** Evaluación de la expresión de IL-6 y GAPDH mediante electroforesis y Western blotting según las distintas condiciones de lavado de la LC tras 24, 48 y 72 h de exposición a ésta, donde C son los controles, LC es lente de contacto directamente del blister, LM es lente de contacto lavada en líquido de mantenimiento y PBS es lente de contacto lavada con PBS.  $n=2$ .

## 6. Detección de CD44 mediante electroforesis y Western blotting

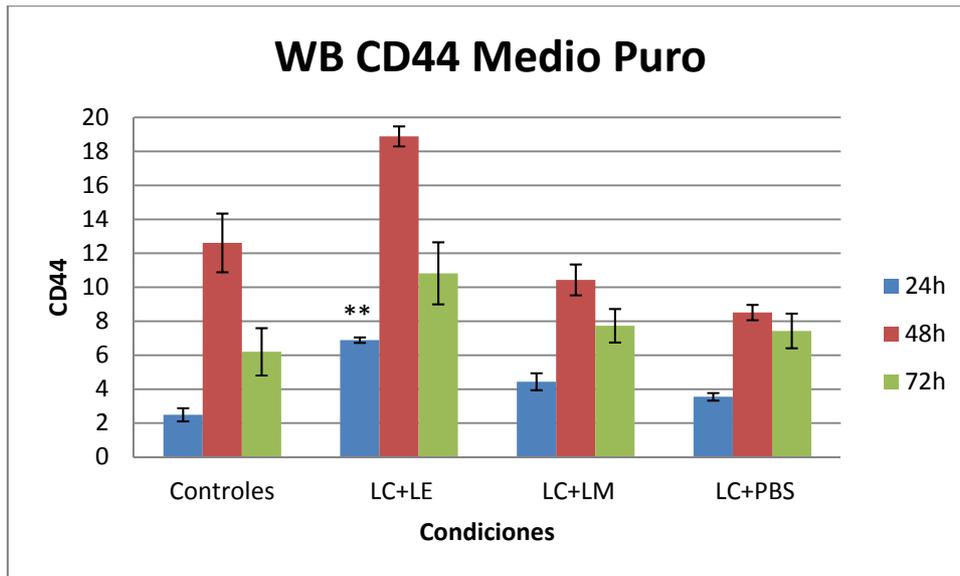
Se evaluó la expresión de IL-6 utilizando la electroforesis y el Western blotting. Como se puede observar en la figura 20 la producción de CD44 en medio suplementado tiene dos patrones diferenciados, uno en el que observamos una disminución entre las 24 h y las 48 h de exposición a LC, seguido de un aumento a las 72 h de contacto en el caso de los controles y en la condición en la que se coloca

la LC directamente desde el blíster, y otro patrón en el que se ve un aumento de la producción entre las 24 h y las 48 h seguido de una disminución a las 72 h de exposición. Se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar con los controles los resultados obtenidos para las condiciones LC+LM tras 24, 48 y 72 h de exposición y LC+PBS tras 24 y 72h de exposición.



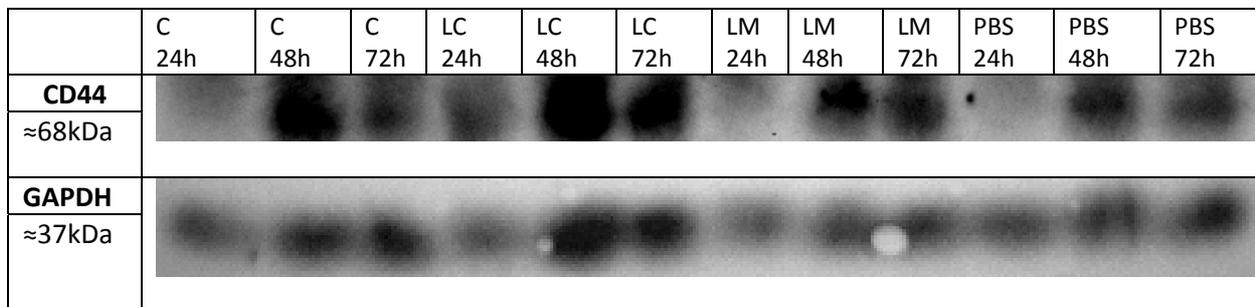
**Figura 23:** Gráfica que muestra la expresión de CD44 obtenida en medio suplementado según las distintas condiciones de lavado de la LC tras 24, 48 y 72 h de exposición a ésta, donde LC+LE es lente de contacto directamente del blister, LC+LM es lente de contacto lavada en líquido de mantenimiento y LC+PBS es lente de contacto lavada con PBS. n = 2. \* $p < 0.05$  entre el control y las condiciones indicadas.

En la figura 23 se puede ver como todas las condiciones en medio sin suplementar tienen un mismo patrón de producción de CD44, se observa un aumento tras 48 h que va acompañado de una disminución transcurridas 72 h de exposición a la LC. Se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar con los controles los resultados obtenidos para la condición LC+LE tras 24 h de exposición.



**Figura 24:** Gráfica que muestra la expresión de CD44 obtenida en medio sin suplementar según las distintas condiciones de lavado de la LC tras 24, 48 y 72 h de exposición a ésta, donde LC+LE es lente de contacto directamente del blister, LC+LM es lente de contacto lavada en líquido de mantenimiento y LC+PBS es lente de contacto lavada con PBS. n = 2. \*\* $p < 0.01$  entre el control y las condiciones indicadas.

Parece, por lo tanto, que una vez más los suplementos del medio afectan a la medida del CD44, obteniéndose valores contradictorios.



**Figura 25:** Evaluación de la expresión de CD44 y GAPDH mediante electroforesis y Western blotting según las distintas condiciones de lavado de la LC tras 24, 48 y 72 h de exposición a ésta, donde C son los controles, LC es lente de contacto directamente del blister, LM es lente de contacto lavada en líquido de mantenimiento y PBS es lente de contacto lavada con PBS. n=2.



## DISCUSIÓN:

El estudio realizado demuestra que es posible utilizar el modelo descrito para poner en contacto una LC y un cultivo celular para evaluar parámetros como la viabilidad y la proliferación celular y para medir la expresión de moléculas relacionadas con la inflamación. Además, se ha conseguido mantener el modelo durante más tiempo que el descrito en trabajos anteriores ([Maltseva et al, 2007](#); [Gorbet et al, 2010](#)), en los cuales las células HCE eran expuestas a la LC como máximo durante 24 h. Sin embargo en este estudio hemos comprobado que las células se mantenían hasta 72 h en contacto con la LC. Si bien los resultados de viabilidad celular tras 24 h son muy positivos, sería necesario evaluar la ausencia de efectos nocivos a más largo plazo. Esa comprobación permitiría diseñar experimentos *in vitro* simulando un uso de LC prolongado. Se ha confirmado que la LC usada en este trabajo (Softlens®38) en las diferentes condiciones experimentales no genera una toxicidad en el cultivo de HCE que disminuya de forma significativa la viabilidad de estas.

En cuanto a la tasa de proliferación de las células HCE expuestas a las LC, en todos los casos se vio que se reducía con respecto al control sin lente, especialmente al cabo de 72 h. Destaca la reducción observada cuando la lente se había lavado con LM o con PBS, lo que apunta a una posible influencia negativa de estos tampones en la proliferación celular a tiempos largos. Es necesario mencionar también que el diseño del estudio no ha sido el óptimo por la interacción del reactivo alamarBlue® con la lente. Una opción sería hacer otro tipo de técnica para medir la proliferación con reactivos que no interfieran con la LC.

La técnica descrita para realizar sobre una misma placa la recogida de sobrenadantes y la extracción de proteína ha permitido determinar de dos formas diferentes sobre los mismos cultivos las variaciones en la producción de nuestras proteínas de interés. En los datos obtenidos de IL-6 medidos mediante el ELISA, se observó que las diferencias entre las tres condiciones y los controles son inapreciables transcurridas 72 h de contacto en medio completo. Sin embargo, si hubo diferencias en los niveles de sCD44 detectados, que fueron siempre menores que en los controles pero sin diferencias entre las tres condiciones en estudio. De los datos observados en las figuras 16 y 19 se puede observar que el medio suplementado en una primera medida a 24 h aumenta la cantidad secretada tanto de IL-6 como de sCD44 con respecto al medio sin suplementos, si bien transcurridas 48h de contacto en el caso de la IL-6 y 72 h en el caso del sCD44 esta situación se resuelve y observamos que los niveles de expresión se mantienen muy similares indistintamente del medio que utilizemos.

Centrándonos en los datos obtenidos mediante la técnica de Western blotting, se observa que son muy similares a los obtenidos mediante la técnica ELISA en el caso de la IL-6 con medio suplementado, mientras que en el caso en el que se utilizó medio sin suplementar los datos difieren ligeramente apareciendo una disminución en la detección a 72 h en los datos de Western blotting. Es decir, las lentes parecen influir poco en la expresión de IL-6 y no se puede decir que induzcan un incremento significativo, al menos en las condiciones estudiadas. En relación a los datos obtenidos para CD44, y los observamos con respecto a los que se obtuvieron para el sCD44 vemos que los patrones de detección son diferentes, ya que la detección del sCD44 sigue una tendencia más o menos lineal creciente tanto con medio suplementado como con medio sin suplementar, mientras que el CD44 tiene un patrón de producción más irregular, con un incremento en los datos obtenidos tras 48 h de exposición a LC en medio sin suplementar y una disminución tras 72 h de exposición a la LC. En el caso en el que se utilizó medio completo se ven dos situaciones diferentes, una para los controles y los casos que se expusieron a LC directamente desde el blíster, en la que se aprecia una disminución de la detección tras 48 h de exposición a LC con respecto a 24 h de exposición, seguida de un aumento entre 48 y 72 h de exposición, y otra para los casos en los que se expusieron las células HCE a LC lavada con líquido de mantenimiento (LM) y LC lavada con PBS, los cuales experimentaron una disminución en la detección de CD44 entre la exposición a LC durante 24 y 48 h, seguido de un aumento en la detección entre los casos expuestos durante 48 y 72 h. Por lo tanto, en el caso del CD44 y su fracción soluble, si parece detectarse una influencia de la lente en su expresión. Hay muy pocos estudios sobre CD44 y sCD44 en la superficie ocular. De hecho miembros del Grupo de Superficie Ocular del IOBA han sido los primeros en identificar la presencia de sCD44 en la lágrima humana ([García-Posadas et al, 2012](#)) y no conocemos estudios realizados con usuarios de LC, pero, sería interesante realizarlos.

Otro aspecto que ha puesto de manifiesto este estudio es la importancia de los suplementos del medio de cultivo en las medidas realizadas. Se ha comprobado que la presencia o no de los suplementos influye en las determinaciones de IL-6 así como de CD44 o sCD44, tanto a nivel de expresión de la proteína como de su secreción, pudiéndose obtener, incluso, resultados contradictorios. Este hecho incide en la importancia de un buen diseño experimental que tenga en cuenta el mayor número de variables posible. Sorprende que en los trabajos de [Maltseva et al \(2007\)](#) y de [Gorbet et al \(2010\)](#), en los que ponían LC sobre células HCE para realizar diferentes experimentos y determinaciones no mencionen en

qué condiciones realizan los experimentos (medio con o sin suplementos).

Mediante este estudio se pretendía determinar si era posible medir la inflamación que sufren *in vitro*, las células del epitelio corneal de los usuarios de LC mediante una aproximación utilizando la línea celular HCE y el sistema descrito por [Matselva et al \(2007\)](#) para exponer las células a una LC. Una vez que se han realizado los experimentos y se han analizado los datos se ha visto que esto se puede realizar, que para conseguir un auténtico modelo de inflamación es necesario analizar un mayor número de condiciones, ya que la expresión de los marcadores seleccionados no sufre variaciones significativas con respecto a los controles. Esto se puede deber bien a que los marcadores seleccionados no hayan sido los idóneos, o a que las combinaciones seleccionadas de LC más los distintos tipos de lavados realizados no estén afectando a las células HCE en cultivo como era esperado. Éste hecho se podría solventar realizando lavados con líquidos de mantenimiento que ya hubieran demostrado su toxicidad en contacto con cultivos de células HCE ([MC Canna et al, 2008](#)), y un número mayor de tipos de LC, lo cual nos aportaría una visión más general.

También, se debería intentar extender el tiempo de exposición a LC de las células HCE más allá de 72 h para conseguir datos que se acercasen aún más a los tiempos de utilización de una LC en régimen de uso prolongado. Este hecho se ve dificultado por el ritmo crecimiento del cultivo ya que para realizar los experimentos se requiere que las células hayan formado una monocapa lisa sobre la superficie del cultivo, lo cual hace que transcurridas 72 h del comienzo del experimento las células comiencen a formar acúmulos.

En definitiva, si bien no se ha conseguido desarrollar como tal un modelo *in vitro* de inflamación corneal causada por exposición a LC, este estudio ha permitido mostrar que se pueden medir cambios. Pensamos que tras el replanteamiento del diseño experimental se puede conseguir.



## CONCLUSIONES PRELIMINARES Y TRABAJO FUTURO:

Tras la realización de este trabajo, se presentan las siguientes conclusiones preliminares:

1. Se ha conseguido desarrollar un modelo de trabajo *in vitro*, colocando una LC sobre una línea celular epitelial de córnea y manteniéndola hasta 72 h, que permite medir diversos parámetros biológicos sin dañar las células.
2. El modelo ha permitido determinar que la exposición de las células HCE a la lente Softlens®38 durante 72 h ocasiona una reducción en la tasa de proliferación celular, que resulta más acusado cuando se ha lavado con LM o PBS.
3. Este modelo ha permitido medir también los cambios tanto en la producción de IL-6 como de CD44 al exponer las células corneales a la lente Soflens®38 embebida en los distintos líquidos (líquido de embalaje, líquido de mantenimiento, PBS).

Los siguientes pasos a seguir tras la realización de este trabajo son los siguientes:

- Se va a intentar optimizar la medida de la proliferación celular con otros tipos de ensayos para comprobar si, efectivamente, la exposición a LC reduce la tasa de proliferación del epitelio corneal.
- Se pretenden realizar las mismas pruebas que se han llevado a cabo en este trabajo con distintos tipos de LC y distintos líquidos de mantenimiento y observar las variaciones que encontremos en la producción de IL-6, CD44 y sCD44.
- Si se encontraran diferencias significativas según la LC utilizada y el líquido de mantenimiento, comparar los resultados obtenidos con los datos clínicos existentes e intentar establecer una correlación que nos permita utilizar este modelo *in vitro* para testar distintas combinaciones de lente de contacto y líquido de mantenimiento, que puedan ser utilizadas en la práctica clínica.
- Se intentará desarrollar una forma de simular el parpadeo *in vitro* que permita evaluar la influencia del movimiento de la lente de contacto en el modelo.



## BIBLIOGRAFÍA:

Andrasko G, Ryen K. Corneal staining and confort observed with traditional and silicone hidrogel lenses and multipurpose solution combinations. *Optometry* 2008;79:444-454.

Araki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T, Hayashi K, Watanabe H, Tano Y, Handa H. An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:614-21.

Carnt NA, Evans VE, Naduvilath TJ, Willcox MD, Papas EB, Frick KD, Holden BA. Contact lens-related adverse events and silicone hydrogel lenses and daily wear care system used. *Arch Ophtalmol* 2009;127:1616-1623.

Diec J, Evans VE, Tilia D, Naduvilath T, Holden BA, Lazon de la Jara P. Comparison of oclar confort, visión, and SICS during silicone hidrogel contact lens daily wear. *Eye Contact Lens* 2012;38:2-6.

Enríquez-de-Salamanca A, Calder V, Gao J, Galatowicz G, García-Vázquez C, Fernández I, Stern ME, Diebold Y, Calonge M. Cytokine responses by conjunctival epithelial cells: an *in vitro* model of ocular inflammation. *Cytokine* 2008;44:160-7.

Enríquez-de-Salamanca A, Castellanos E, Stern ME, Fernández I, Carreño E, García-Vázquez C, Herreras JM, Calonge M. Tear cytokine and chemokine analysis and clinical correlations in evaporative-type dry eye disease. *Mol Vis* 2010;16:862-73.

García-Posadas L, Contreras-Ruiz L, López-García A, Álvarez SV, Maldonado MJ, Diebold Y. Hyaluronan receptors in the human ocular surface: a descriptive and comparative study of RHAMM and CD44 in tissues, cell lines and freshly collected samples. *Histochem Cell Biol* 2012;137:165-176.

Gorbet MB, Tanti NC, Jones L, Sheardown H. Corneal epithelial cell biocompatibility to silicone hidrogel and conventional hidrogel contact lens packaging solutions. *Mol Vis* 2010;16:272-282.

Johnson P, Ruffel B. CD44 and its role in inflammation and inflammator diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2009;8:208-220.

Isacke CM, Yarwood H. The hyaluronan receptor, CD44. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002;34:718-721.

Lam H, Bleiden L, De Paiva CS, Farley W, Stern ME, Pflugfelder SC. Tear cytokine profiles in dysfunctional tear syndrome. *Am J Ophthalmol* 2009;147:198-205.

McCanna Dj, Harrington KL, Driot JY, Ward KW, Tchao R. Use of human corneal epithelial cell line for screening the safety of contact lens care solutions in vitro. *Eye Contact Lens* 2008;34:6-12.

Maltseva IA, Fleiszig SMJ, Evans DJ, Kerr S, Sidhu SS, McNamara NA, Basbaum C. Exposure of human corneal epithelial cells to contact lenses *in vitro* suppresses the upregulation of human  $\beta$ -defensin-2 in response to antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. *Exp Eye Res* 2007;85:142-153.

McDermott AM, Perez V, Huang AJW, Pflugfelder SC, Stern ME, Baudouin C, Beuerman RW, Burns AR, Calder VL, Calonge M, Chodosh J, Coster DJ, Dana R, Hazlett LD, Jones DB, Kim SK, Knop E, Li D-Q, Mitchell BM, Niederkorn JY, Pearlman E, Wilhelmus KR. Pathways of Corneal and Ocular Surface Inflammation: A Perspective from the Cullen Symposium. *Ocular Surf* 2005;3:S131-S138.

Menezes GB, McAvoy EF, Kubes P. Hyaluronan, platelets and monocytes. A novel pro-inflammatory triad. *Am J Pathol* 2009;174:1993-1995.

Pisella PJ, Malet F, Lejeune S, Brignole F, Debbasch C, Bara J, Rat P, Colin J, Baudouin C. Ocular surface changes induced by contact lens wear. *Cornea* 2001;20:820-825.

Sankaridurg PR, Sweeney DF, Sharma S, Gora R, Naduvilath T, Ramachandran L, Holden BA, Rao GN. Adverse events with extended wear of disposable hydrogels: results for the first 13 months of lens wear. *Ophthalmology* 1999;106:1671-1680.

Sankaridurg PR, Willcox MD, Sharma S, Gopinathan U, Janakiraman D, Hickson S, Vuppala N, Sweeney DF, Rao GN, Holden BA. Haemophilus influenzae adherent to contact lenses associated with production of acute ocular inflammation. *J Clin Microbiol* 1996;34:2426-2431.

Solomon A, Dursun D, Liu Z, Xie Y, Macri A, Pflugfelder SC. Pro- and anti-inflammatory forms of interleukin-1 in the tear fluid and conjunctiva of patients with dry-eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2283-92.

Stern ME, Beuerman RW, Fox RI, Gao J, Mircheff AK, Pflugfelder SC. The pathology of dry eye: the interaction between the ocular surface and the lacrimal gland. *Cornea* 1998;17:584-589.

Stern ME, Gao J, Siemasko KF, Beuerman RW, Pflugfelder SC. The role of the lacrimal functional unit in the pathophysiology of dry eye. *Exp Eye Res* 2004;78:409-416.

Stern ME, Schaumburg CS, Dana R, Calonge M, Niederkorn JY, Pflugfelder SC. Autoimmunity at the ocular surface: pathogenesis and regulation. *Mucosal Immunol* 2010;3:425-42.

Thoft, RA and Friend, J. (eds). *The ocular surface. International Ophthalmology Clinics*. 1979 Vol. 19. Little, Brown and Company, Boston.

Yoon KC, Jeong IY, Park YG, Yang SY. Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels in tears of patients with dry eye syndrome. *Cornea* 2007;26:431-7.