

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Girish Kumar Srivastava y al Dr. Manuel Garrosa García, tutores de este trabajo de fin de máster.

- Al Grupo de Retina del IOBA y especialmente a las personas que más de cerca han colaborado en este trabajo: a Maite García Gutiérrez, a Salvatore di Lauro, al Dr. Iván Fernández Bueno y a Amar Kumar Singh. A todos, gracias.

FINANCIACIÓN

- La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la siguiente financiación:
 - Proyecto “Terapia celular de la forma seca de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE)”. Instituto de la Salud Carlos III. Ministerio de Ciencia e Innovación, P509/00938. Investigador responsable: Dr Girish Kumar Srivastava.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1. EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA Y DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA EDAD.....	9
1.2 TERAPIAS AVANZADAS.....	11
1.3 CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.....	13
1.4. MODELO DE CULTIVO ORGANOTÍPICO DE NEURORRETINA.....	16
2. JUSTIFICACIÓN.....	19
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	23
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	29
4.2. CULTIVOS CELULARES.....	30
4.2.1. Aislamiento y cultivo de células del EPR porcino.....	31
4.2.2. Experimentos preliminares con células del EPR de cerdo: ensayos de proliferación y viabilidad celular.....	33
4.2.2.1. Ensayo de proliferación celular Alamar Blue®	33
4.2.2.2. Ensayo de viabilidad celular: Kit toxicológico in vitro basado en el MTT®	34
4.2.3. Cultivo celular de AT-MSK.....	35
4.2.4. Experimentos preliminares con AT-MSK: ensayos de proliferación celular y permeabilidad celular.....	36
4.2.4.1. Ensayo de proliferación celular Alamar Blue®	36
4.2.4.2. Ensayo de permeabilidad de la membrana de policarbonato de 0,4 µm de poro, del sistema de cultivo Transwell®	36
4.3. AISLAMIENTO DE LOS EXPLANTES DE NEURORRETINA DE CERDO.....	38

4.4. PUESTA PUNTO DEL COCULTIVO DE AT-MSC Y CÉLULAS DEL EPR PORCINO EN UN MODELO DE CULTIVO ORGANOTÍPICO DE NEURORRETINA DE CERDO.....	40
4.4.1. Siembra de células del EPR de cerdo y tratamiento con peróxido de hidrógeno.....	40
4.4.2. Siembra de AT- MSC.....	40
4.4.3. Ensamblaje del cocultivo de AT-MSC, células del EPR porcino y el cultivo organotípico de neurorretina de cerdo.....	41
4.5. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN Y VIABILIDAD CELULAR DE LAS CÉLULAS DEL EPR DE CERDO	43
4.5.1. Ensayo de proliferación celular Alamar Blue®.....	43
4.5.2. Ensayo de viabilidad celular Viability-citotoxicity assay kit for live & dead cells®	43
4.6. CARACTERIZACIÓN DE LAS AT-MSC MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA.....	44
4.6.1. Recuperación y fijación de las AT-MSC.....	44
4.6.2. Inmunofluorescencia indirecta.....	45
4.7. CARACTERIZACIÓN DE LOS EXPLANTES DE NEURORRETINA DE CERDO MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA.....	46
4.7.1. Procesamiento.....	47
4.7.2. Inmunofluorescencia indirecta.....	48
5. RESULTADOS.....	49
5.1. EVALUACIÓN DEL CULTIVO CELULAR DE EPR DE CERDO PRESENTE EN EL CULTIVO MIXTO OBJETO DE ESTUDIO	51
5.1.1. Caracterización morfológica del cultivo primario de EPR de cerdo mediante su seguimiento por microscopía de contraste de fases.....	51
5.1.2. Selección del medio de cultivo más adecuado para el cultivo mixto objeto de estudio en función de la proliferación y viabilidad celular del cultivo primario de EPR de cerdo.....	52

5.1.3. Determinación de la concentración óptima de peróxido de hidrógeno, para el tratamiento de las células del EPR de cerdo: ensayo de viabilidad celular.....	52
5.1.4. Estudio de proliferación y viabilidad de las células del EPR porcino tras su cocultivo con AT-MSC y un cultivo organotípico de neuroretina de cerdo.....	54
5.2. EVALUACIÓN DEL CULTIVO CELULAR DE AT-MSC PRESENTE EN EL CULTIVO MIXTO OBJETO DE ESTUDIO.....	55
5.2.1. Estudio de la proliferación del cultivo celular de AT-MSC sobre una membrana de policarbonato de 0,4 µm de diámetro de poro.....	60
5.2.2. Estimación de la permeabilidad del cultivo celular de AT-MSC sobre una membrana de policarbonato de 0,4 µm de diámetro.....	61
5.2.3. Caracterización de las AT-MSC tras su cocultivo con células del EPR porcino y un cultivo organotípico de neuroretina de cerdo.....	62
5.2.3.1. Expresión de la proteína α-SMA.....	63
5.2.3.2. Expresión de la proteína Citokeratina 8/18.....	65
5.2.3.3. Expresión de la proteína Nestina.....	67
5.2.3.4. Expresión de la proteína Recoverina.....	71
5.3. CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO ORGANOTÍPICO DE NEURORRETINA DE CERDO PRESENTE EN EL CULTIVO MIXTO OBJETO DE ESTUDIO.....	71
5.3.1. Caracterización del explante de neuroretina tras su aislamiento	
5.3.2. Caracterización de los explantes de neuroretina control a lo largo del cultivo.....	72
5.3.3. Caracterización de los explantes de neuroretina de los diferentes cocultivos durante el tiempo de estudio.....	74
6. DISCUSIÓN.....	79
7. CONCLUSIONES.....	91
8. LIMITACIONES Y ESTUDIOS FUTUROS.....	95
9. BIBLIOGRAFÍA.....	99
10. ANEXO.....	111

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA Y DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA EDAD

Las enfermedades degenerativas de la retina, constituyen una de las principales causas de pérdida de visión e incapacidad visual¹. Entre ellas, la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) está adquiriendo una gran importancia en los países desarrollados debido al envejecimiento de su población.

La DMAE, es una patología multifactorial, entre cuyas causas adquiere una especial relevancia el estrés oxidativo producido por el tabaco, la luz ultravioleta o el asociado a la edad.² Esta patología se caracteriza por una pérdida progresiva de la visión central que finalmente lleva a la ceguera³ y que es consecuencia de la atrofia que se desarrolla en la mácula, provocada por la progresiva degeneración de las distintas capas de la neurorretina que resulta en la muerte y pérdida de los fotorreceptores.⁴ Además de esta progresiva degeneración de las diferentes capas de la neurorretina, una de las principales características de la DMAE es la atrofia del epitelio pigmentario de la retina (EPR).

El EPR es la capa más externa de la retina, está formada por una monocapa de células cúbicas cuya membrana basolateral está localizada hacia la membrana de Bruch y su parte apical hacia los segmentos externos de los fotorreceptores. Este epitelio está polarizado y juega un rol crucial en el mantenimiento y funcionalidad de la neurorretina consecuencia de las propias funciones del EPR, entre las que han sido descritas:⁵

- La absorción de luz, debido a la presencia de pigmento en estas células, que mejora la calidad visual y sirve de protección frente al daño oxidativo causado por la luz ultravioleta.
- El transporte transepitelial de nutrientes desde la circulación coroidea hacia los fotorreceptores.

- El mantenimiento de las concentraciones iónicas adecuadas en el espacio subretiniano que garantizan el correcto funcionamiento de los fotorreceptores.
- La renovación de los segmentos externos de los fotorreceptores mediante su fagocitosis.
- El mantenimiento del ciclo visual.
- La secreción de diferentes factores neurotróficos y de crecimiento, entre los que destacan, el “pigment epithelium-derived factor” (PEDF), el “brain-derived neurotrophic factor” (BDNF) o el “vascular endotelial growth factor” (VEGF).

Todas estas funciones demuestran la estrecha relación que existe entre el estado de conservación del EPR y la supervivencia de los fotorreceptores y por tanto, el importante papel que juega el EPR en el mantenimiento de la funcionalidad y de la homeostasis de la neurorretina.⁶

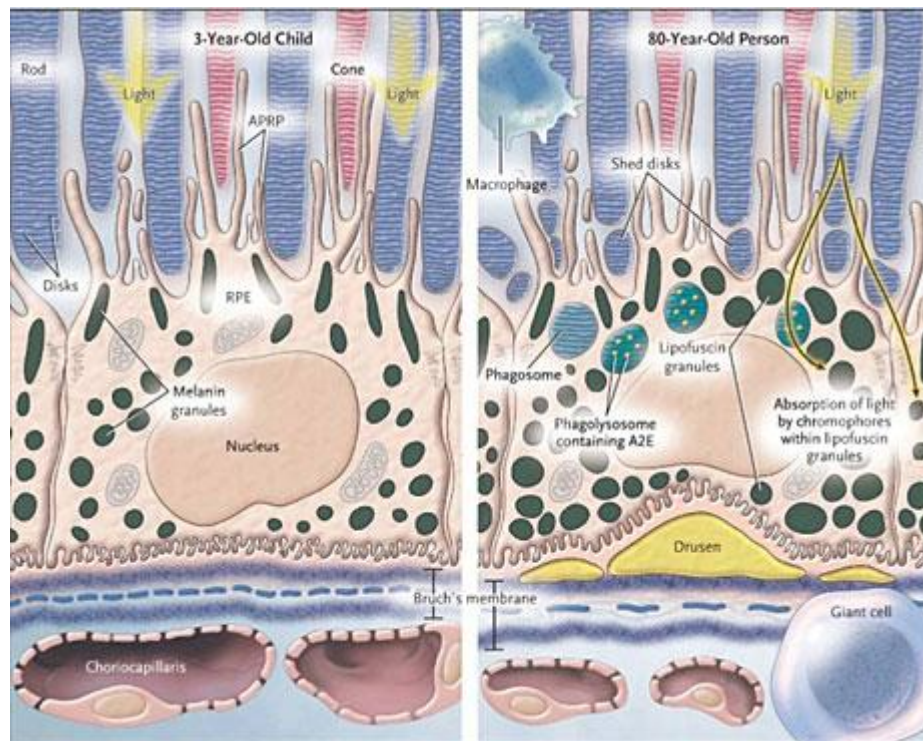


Figura 1: Representación de células del epitelio pigmentario de la retina. Adaptación de David Williams *et al.*

En los últimos años, se han desarrollado tratamientos basados en inyecciones intravítreas de antiangiogénicos (Ranibizumab, Bevacizumab,...) para tratar la forma húmeda o exudativa de la DMAE, con resultados satisfactorios.⁷⁻¹² Sin embargo para la forma seca o atrófica de esta enfermedad no existe en la actualidad ningún tratamiento. La única aproximación terapéutica que hasta el momento ha demostrado cierta eficacia en la ralentización de la progresión de la DMAE seca, ha sido la terapia con agentes antioxidantes, si bien no se ha evidenciado dicha eficacia en etapas avanzadas de la enfermedad.⁷⁻⁹

La ausencia de tratamiento, junto con el hecho de que la DMAE es una enfermedad multifactorial y degenerativa irreversible, así como su alta prevalencia en la población de más de 65 años en los países desarrollados, están dirigiendo los esfuerzos en la investigación de esta enfermedad hacia las terapias avanzadas.¹³

1.2 TERAPIAS AVANZADAS

Según la definición de la European Medicines Agency (EMA), las terapias avanzadas son: “productos médicos de uso humano basados en genes o células, constituyen nuevas estrategias terapéuticas y su desarrollo contribuirá a ofrecer oportunidades para algunas enfermedades que hasta el momento carecen de tratamientos eficaces”¹⁴. Por tanto los productos de terapias avanzadas, son medicamentos y se rigen por la misma legislación que cualquier medicamento tradicional. Pueden clasificarse en tres categorías:

1- Medicamentos de terapia celular: células o tejidos, objeto de manipulación sustancial, o células o tejidos que no se pretendan destinar a la misma función en el receptor y en el donante, cuya finalidad sea la de tratar, prevenir o diagnosticar una

enfermedad mediante la acción farmacológica, inmunológica o metabólica de estas células.

2- Medicamentos de ingeniería tisular: células o tejidos (viables o no, humanos y/o animales, con otros productos o no) manipulados por ingeniería, susceptibles de ser utilizados en el ser humano para reparar, regenerar o reemplazar un tejido.

3- Medicamentos de terapia génica: ácido nucleíco recombinante, utilizado en seres humanos para regular, reparar, sustituir, añadir o eliminar una secuencia génica, con el objetivo de tratar, prevenir o diagnosticar una enfermedad y cuya acción depende directamente de su secuencia.

Dentro de la investigación de las enfermedades degenerativas de la retina, las principales terapias avanzadas que se están utilizando en la actualidad son la terapia celular y la ingeniería tisular, fundamentalmente mediante la utilización de células madre, que son células no especializadas con capacidad de autorrenovarse y de generar uno o más tipos celulares mediante su diferenciación, lo que las convierte en una herramienta muy útil como sistema de reparación, regeneración o reemplazo de un tejido dañado. La capacidad de diferenciación de las células madre puede estar limitada a diferenciarse hacia células del mismo tejido que procede la célula madre (células madre unipotentes), hacia células de varios tejidos del mismo origen embrionario (multipotentes), hacia células de tejidos con orígenes embrionarios diferentes (pluripotentes), o hacia cualquier tipo celular teniendo la capacidad de formar un embrión completo (totipotentes). Además las células madre se pueden clasificar según su origen en: embrionarias (derivadas de un blastocisto), adultas o somáticas (aisladas de un tejido adulto) o células madre pluripotentes inducidas (reprogramadas desde células adultas diferenciadas).¹⁵

A pesar de que existen numerosas publicaciones en las que se ha descrito la utilización de células madre de diferentes tipos y orígenes en el estudio de la DMAE seca (tanto in vitro como en modelos animales), existen pocos ensayos clínicos a los que se haya conseguido trasladar estas investigaciones de terapias avanzadas.

Entre los ensayos clínicos que se desarrollan actualmente en el estudio de la DMAE seca (n=4), y que utilizan células madre dentro del contexto de las terapias avanzadas, cabe destacar por su relevancia el trasplante de células de EPR derivadas de células madre embrionarias humanas (hESC) en el espacio subretiniano de pacientes afectados de DMAE seca avanzada, (en fase II).¹⁶ También posee una gran importancia el ensayo clínico sobre un implante intraocular de células madre mesenquimales (MSC) encapsuladas que liberan CNTF (ciliary neurotrophic factor), en pacientes con DMAE seca avanzada (actualmente en fase II)¹⁷ y que por el momento ha demostrado seguridad y una buena tolerabilidad del implante, así como una ralentización de la progresión de la pérdida de visión en individuos con DMAE seca.

Por otra parte, el reemplazo del EPR dañado por un EPR sano, ha sido a lo largo de la última década una posibilidad muy atractiva como posible solución a las formas avanzadas de DMAE, dando lugar a numerosas publicaciones, algunas con prometedores resultados.^{10,18,19} Estas células pueden ser aisladas del ojo humano o diferenciadas a partir de diferentes tipos celulares,^{20,21} y han dado lugar a varios estudios clínicos.^{10,17} Sin embargo en la actualidad todavía no son una realidad en el tratamiento de esta enfermedad.

1.3 CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Las células madre mesenquimales (MSC) son un tipo celular que por sus características está siendo muy utilizado en investigación en terapias avanzadas. Se trata de células madre adultas y pluripotentes, fácilmente accesibles y que carecen de los problemas éticos que se dan en otros tipos de células madre. Además existe la posibilidad de tratar al paciente de una forma autóloga evitando así una respuesta inmune, aunque

en este caso las MSC han demostrado también una baja inmunogenicidad en trasplantes alogénicos.²²

Las MSC son unas buenas candidatas para la investigación en terapias celulares, ya que son fácilmente accesibles y pueden aislarse con una mínima invasión de un gran número de tejidos adultos, los originados a partir del mesodermo embrionario, como el tejido adiposo, la médula ósea, o del cordón umbilical. Además son fácilmente expandibles in vitro, y ha sido descrita su capacidad de diferenciación hacia otros tipos celulares de diferente origen embrionario, como cartílago, hueso.²³ Además su capacidad para diferenciarse a células neurales y a células de epitelio pigmentario descritas en la literatura, han hecho que sean un objetivo de las terapias avanzadas que investigan las patologías retinianas.^{24,25}

La utilización de estas células en patologías retinianas parece tener dos vertientes. Por una parte se trata de diferenciar in vitro dichas células hacia células del EPR, para su posterior trasplante,^{16,26,27} o la implantación directa de las MSC en la retina con el objetivo de que se diferencien hacia los tipos celulares dañados.^{28,29} Por otra parte, se ha descrito la existencia de un número muy elevado de factores secretados por las MSC, antiapoptóticos, neurotróficos e inmunomoduladores, cuya aplicación podría ser beneficiosa para distintas patologías retinianas (figura 2).³⁰⁻³⁵

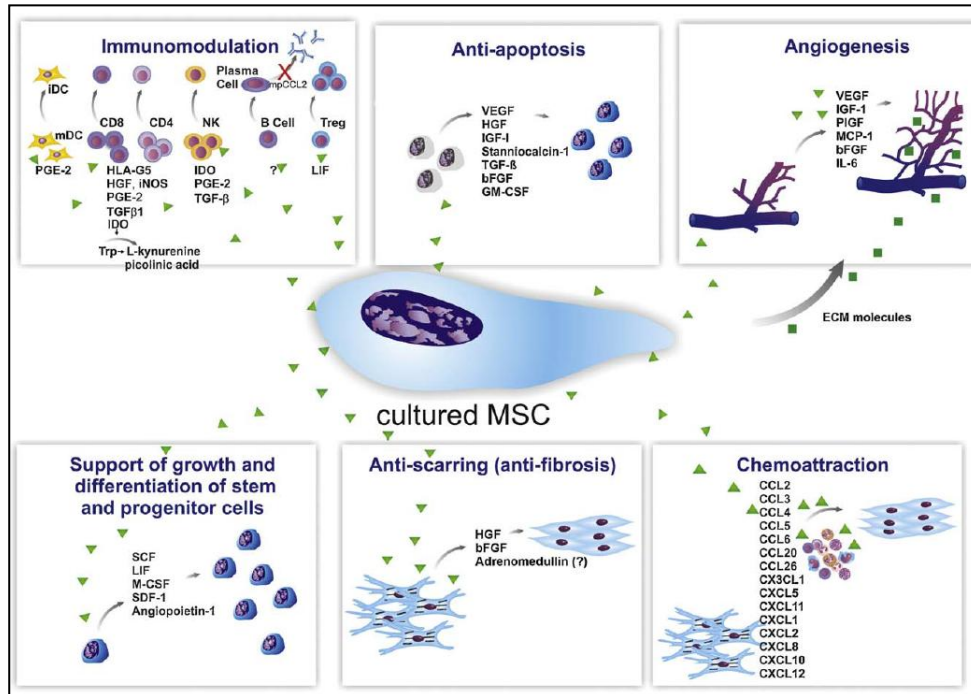


Figura 2: Esquema representativo de los factores secretados por las MSC así como su función. Adaptación de da Silva Meirelles et al., 2009.³⁶

De entre estos factores, los más destacados en cuanto a patología retiniana se refiere, son:

BDNF (Brain-derived neurotrophic factor): ha sido descrito como un neuroprotector de la retina frente a daño oxidativo, en diversos estudios in vitro y modelos de patologías retinianas desarrollados en rata.³⁶⁻³⁹

GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor): cuyo efecto antiapoptótico ha sido descrito en neuronas del sistema nervioso central.^{40,41}

CNTF (Ciliary neurotrophic factor): se ha comprobado su efecto neuroprotector en modelos de degeneración retiniana desarrollados en rata,³⁹⁻⁴² y más concretamente su capacidad para proteger los fotorreceptores en diferentes modelos animales.^{43,44} Además, en el único ensayo clínico que se está desarrollando en la actualidad con MSC en pacientes con DMAE seca avanzada, está directamente implicado el factor CNTF (implante intraocular de MSC encapsuladas que liberan CNTF en pacientes con DMAE seca avanzada).¹⁷

bFGF (Basic fibroblast growth factor): sus efectos angiogénicos y antiapoptóticos han sido descritos tanto in vitro como en modelos animales.^{32,45,46}

1.4. MODELO DE CULTIVO ORGANOTÍPICO DE NEURORRETINA

Un tipo de cultivo in vitro que ha demostrado su eficacia en estudios de terapia celular han sido los cultivos organotípicos de neurorretina.^{47,48}

Estos se llevan realizando desde hace más de 50 años, utilizando principalmente retinas de mamíferos, cultivando sobre membranas de distintos materiales, pero

manteniendo siempre el explante de neurorretina en una interfase medio-aire. La principal innovación que se ha producido en esta técnica fue la colocación de la neurorretina con los fotorreceptores hacia abajo sobre filtros de nitrocelulosa a finales de los años 80.⁴⁹ Estos cultivos organotípicos han sido utilizados en el estudio de enfermedades degenerativas de la retina⁵⁰⁻⁵³ llegando a desarrollarse un modelo de degeneración retiniana mediante el cultivo organotípico de retina humana⁵⁴. Estos modelos también han sido utilizados en el estudio del efecto que distintos factores ejercen sobre las células de la retina.^{47,48}

Finalmente, la bibliografía actual sobre cultivos mixtos compuestos por cultivos organotípicos y más de un cultivo celular es muy escasa, sobre todo si nos referimos a investigación en patologías retinianas, donde no se ha encontrado ninguna referencia a este tipo de cultivo mixto. Por otra parte, si existen publicaciones en las que se han utilizado cocultivos indirectos de dos cultivos celulares o de un cultivo organotípico cocultivado con un solo tipo celular, en el estudio de patologías retinianas degenerativas como la DMAE seca.^{17,50,55,56} Por otra parte, en otros campos de la investigación alejados de las patologías retinianas, si se han desarrollado estas técnicas de cultivo mixto de más de dos tipos celulares para simular barreras epiteliales del tracto urinario o del epitelio alveolar.^{57,58}

2. JUSTIFICACIÓN

La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) está adquiriendo una gran importancia en los países desarrollados debido al envejecimiento de su población, convirtiéndose en la principal causa de ceguera legal en personas mayores de 65 años en dichos países, con una prevalencia en España que llega al 3-4 % de la población mayor de 65 años.⁵⁹⁻⁶¹ Existen dos formas clínicas de la enfermedad, una húmeda o exudativa y una seca o atrófica, y si bien en los últimos años se han desarrollado tratamientos basados en inyecciones intravítreas de antiangiogénicos para tratar las formas húmedas,^{62,63} aún no existe ningún tratamiento para las formas severas de DMAE seca.¹⁷

Por lo tanto, la búsqueda de un tratamiento que prevenga o al menos ralentice la degeneración retiniana, es una de las cuestiones más relevantes actualmente en la investigación sobre esta patología.

El epitelio pigmentario de la retina (EPR), juega un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis y la funcionalidad de la neurorretina,⁶ siendo la atrofia de este epitelio, una de las principales características de la DMAE seca. Esto ha hecho, que numerosas investigaciones en terapias avanzadas tengan como objetivo principal, la preservación de este EPR o su reemplazamiento, siendo la terapia celular mediante la utilización de células madre mesenquimales (MSC) una de las alternativas más prometedoras.¹⁰

Las MSC, están presentes en condiciones normales en tejidos adultos derivados del mesodermo como tejido adiposo y médula ósea, a partir de los cuales pueden ser aisladas. Estas células tienen la capacidad de diferenciarse a otros linajes celulares bajo las condiciones adecuadas, osteocitos, adipocitos o células nerviosas y epiteliales, adoptando no solamente el fenotipo de estas células, sino también sus características bioquímicas y funcionales.^{64,65} Además, son capaces de secretar un gran número de factores con capacidad inmunomoduladora y neuroprotectora, entre los que cabe destacar por su importancia a nivel de la retina, el BDNF, el GDNF, el CNTF, o el bFGF,

que podrían proteger tanto a la neurorretina como al EPR de la degeneración asociada a la DMAE.^{66,67}

A lo largo de los últimos años, numerosos grupos de investigación han utilizado MSC derivadas de tejido adiposo (AT-MSC), en terapia celular. Entre ellos, el grupo de Retina del IOBA posee experiencia concreta a este respecto, y ha publicado varios trabajos de terapia celular en el ámbito de la retina.⁵³⁻⁵⁵ Las MSC tienen la gran ventaja respecto a las derivadas de médula ósea de su mayor accesibilidad, potenciada además por el continuo aumento del número de liposucciones.⁶⁸ Los estudios realizados hasta la fecha con MSC como posible tratamiento para la DMAE seca, se basan fundamentalmente en diferenciar estas células hacia EPR, con el objetivo de realizar un posterior trasplante que reemplace el epitelio dañado^{26,27}. Sin embargo, existen menos estudios en los que los factores secretados por las MSC constituyan por sí mismos, el posible tratamiento de la DMAE.^{17,18}

Así pues, dada la relevancia probada que poseen los factores secretados por las MSC para el mantenimiento del EPR y consecuentemente de la neurorretina, sería de gran interés estudiar *in vitro* los efectos de la presencia de AT-MSC, en un cultivo mixto de células del EPR porcino y un cultivo organotípico de neurorretina de cerdo, ya que de este modo se obtendrían resultados similares a los que se producirían en un hipotético trasplante de AT-MSC *in vivo*. Además, la utilización de un modelo organotípico de neurorretina que simula las modificaciones estructurales que se observan en enfermedades degenerativas de la retina, y que mantiene la dinámica celular y las matrices extracelulares que se pierden en cultivos celulares simples, proporcionaría la información necesaria para valorar adecuadamente el uso terapéutico de las AT-MSC en una patología que actualmente carece de tratamiento, como lo es la DMAE seca, antes de iniciar posibles estudios clínicos.¹⁸⁻²⁰

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Es posible que los factores secretados por las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo tengan un efecto protector sobre las células del epitelio pigmentario de la retina y sobre la neuroretina, las cuales se ven afectadas en pacientes con degeneración macular asociada a la edad seca, por lo que la utilización de estas células puede constituir un posible tratamiento para esta enfermedad.

OBJETIVOS

Objetivo general

Comprobar el efecto protector de los factores secretados por las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo in vitro, mediante un cultivo mixto compuesto por un cultivo organotípico de neuroretina de cerdo y un cultivo celular de epitelio pigmentario de la retina porcino.

Objetivos específicos

- 1- Establecer el cultivo mixto formado por un cultivo organotípico de neuroretina de cerdo, un cultivo celular de epitelio pigmentario de la retina porcino y la adición de un cultivo de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.
- 2- Comprobar la seguridad de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo tanto para el cultivo celular de epitelio pigmentario de la retina como para la neuroretina, mediante la determinación de la viabilidad celular de las células del epitelio pigmentario de la retina y la caracterización morfológica del explante de neuroretina.

3- Comprobar el efecto protector de los factores secretados por las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo, mediante la determinación de la proliferación y viabilidad celular de las células del epitelio pigmentario de la retina, tras su estimulación previa con peróxido de hidrógeno para simular daño oxidativo.

4- Comprobar el estado de diferenciación celular de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo, tras el tiempo de cultivo, mediante el estudio de la expresión de marcadores de distintos tipos celulares.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El principal objetivo de este trabajo ha sido el de evaluar el efecto protector que pueden ejercer los factores secretados por las AT-MSc sobre la retina, tanto a nivel del EPR como de la neurorretina. Para ello se diseñó un estudio in vitro en el que fuese factible poner en contacto simultáneamente células del EPR y AT-MSc, con un cultivo organotípico de retina neural, y evaluar los cambios que se producían en ellos en el transcurso del estudio. Por este motivo se diseñaron los siguientes cocultivos y controles:

Cultivos implicados	Abreviatura	Explante de Neurorretina	AT-MSc	Células del EPR	Exposición previa del EPR a H ₂ O ₂
Cocultivo de AT-MSc, EPR y explante de Neurorretina	NME	X	X	X	-
Cocultivo de AT-MSc, EPR y explante de Neurorretina con exposición previa a H ₂ O ₂	NME+H	X	X	X	X
Cocultivo de EPR y Neurorretina	NE	X	-	X	-
Cocultivo de EPR y Neurorretina con exposición previa a H ₂ O ₂	NE+H	X	-	X	X
Cocultivo de AT-MSc y EPR	ME	-	X	X	-
Cocultivo de AT-MSc y Neurorretina	NM	X	X	-	-
Explante de neurorretina	Control N	X	-	-	-
Cultivo de AT-MSc	Control M	-	X	-	-
Cultivo de EPR	E	X	-	-	-
Cultivo de EPR con exposición previa a H ₂ O ₂	E+H	X	-	-	X
Neurorretina procesada en fresco, inmediatamente tras su aislamiento	Control N a 0 días	-	-	-	-

Tabla 1: Cocultivos y controles empleados en la ejecución del estudio. Los tiempos de cultivo fueron de 3 y 6 días, excepto para el explante de neurorretina en fresco (control N a 0 días).

4.2. CULTIVOS CELULARES

Las técnicas de cultivo celular utilizadas para la realización de este estudio se llevaron a cabo siempre en condiciones de esterilidad y en una campa de flujo laminar (Faster-BH N, 2004, Cultek, Madrid, España).

En cuanto a los medios de cultivo utilizados para el desarrollo de este estudio, estos se resumen en la siguiente tabla:

DMEM	-	penicilina (100 U/ml), streptomicona (100 µg/ml) y anfotericina B (2,5 µg/ml)	-
DMEM completo	10% suero fetal bovino	penicilina (100 U/ml), streptomicona (100 µg/ml) y anfotericina B (2,5 µg/ml)	-
DMEM completo 10% antibiótico/antimicótico	10% suero fetal bovino	penicilina (1000 U/ml), streptomicona (1000 µg/ml) y anfotericina B (25 µg/ml)	-
Neurobasal A	-	penicilina (100 U/ml), streptomicona (100 µg/ml) y anfotericina B (2,5 µg/ml)	2% B-27 1% L-glutamina
Neurobasal A completo	10% suero fetal bovino	penicilina (100 U/ml), streptomicona (100 µg/ml) y anfotericina B (2,5 µg/ml)	2% B-27 1% L-glutamina
1:1 DMEM/Neurobasal completo	10% suero fetal bovino	penicilina (100 U/ml), streptomicona (100 µg/ml) y anfotericina B (2,5 µg/ml)	-
DMEM bajo en glucosa	10% suero fetal bovino	penicilina (100 U/ml), streptomicona (100 µg/ml) y anfotericina B (2,5 µg/ml)	1 g/L Glucosa

Tabla 2: Medios de cultivo utilizados durante la realización del estudio

4.2.1. Aislamiento y cultivo de células del EPR porcino

Para la realización de este estudio se utilizaron células de cultivo primario de EPR porcino, obtenidas tras el aislamiento del EPR de ojos de cerdo (n=4) procedentes del matadero local Justino Gutiérrez S.L. (Laguna de Duero, Valladolid, España). Los ojos fueron transportados hasta el laboratorio de cultivos celulares del IOBA, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Invitrogen, Paisley, UK) suplementado con penicilina (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) y anfotericina B (2,5 µg/ml) (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK) en las 2 primeras horas desde la enucleación, e inmediatamente se comenzó el procedimiento. El protocolo para el aislamiento de las células del EPR porcino fue el mismo utilizado en anteriores estudios publicados por el Grupo de Retina del IOBA.^{69,70}

El material quirúrgico utilizado fue previamente esterilizado y todo el proceso se llevó a cabo en condiciones estériles (figura 3.A). En resumen, el ojo de cerdo se colocó en una placa con medio DMEM y se retiraron los restos de tejidos extraoculares mediante la ayuda de unas tijeras (figura 3.B). El globo ocular libre de restos, se sumergió en etanol al 70% durante 2 minutos y posteriormente se pasó por tres lavados de 5 minutos en medio DMEM limpio, suplementado con penicilina (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) y anfotericina B (2,5 µg/ml) (figura 3.C). Con la ayuda de una aguja de 22G se pinchó el globo ocular a la altura de la ora serrata (figura 3.D). A partir de esta abertura se diseccionó el ojo con unas tijeras, retirando el iris y el cristalino (figura 3.E). A continuación el vítreo se retiró por tacción, con la ayuda de bastoncillos estériles (figura 3.F). El polo posterior obtenido tras la disección se trasladó a una nueva placa de petri con medio DMEM limpio y se desprendió la neuroretina del EPR con la ayuda de un pincel estéril (figura 3.G), cortándose a la altura del nervio óptico. Para despegar el EPR, se añadieron 3 ml de tripsina-EDTA al 0,05%, (Invitrogen, Paisley, UK) y se incubó a 37°C y un 5% de CO₂ durante 30 minutos (figura 3.H). Pasado este tiempo se resuspendieron las células (figura 3.I), se pasaron a un tubo de 15 ml, se añadieron 5 ml de medio DMEM completo, es decir, suplementado con penicilina (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) y anfotericina B (2,5 µg/ml) y un 10 % de suero fetal

bovino(FBS= fetal bovine serum, Gibco, Invitrogen, Paisley, UK) para detener la acción de la tripsina y se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos en una centrifuga (figura 3.J) (Allegra® X-22 Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Finalmente, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el “pellet” (figura 3.J y K) y se sembraron las células obtenidas en frascos de 25 cm² utilizando medio DMEM completo, suplementado en este caso con 1000 U/ml de Penicilina, 1000 µg/ml de Streptomycin y 25 µg/ml de Anfotericina B.

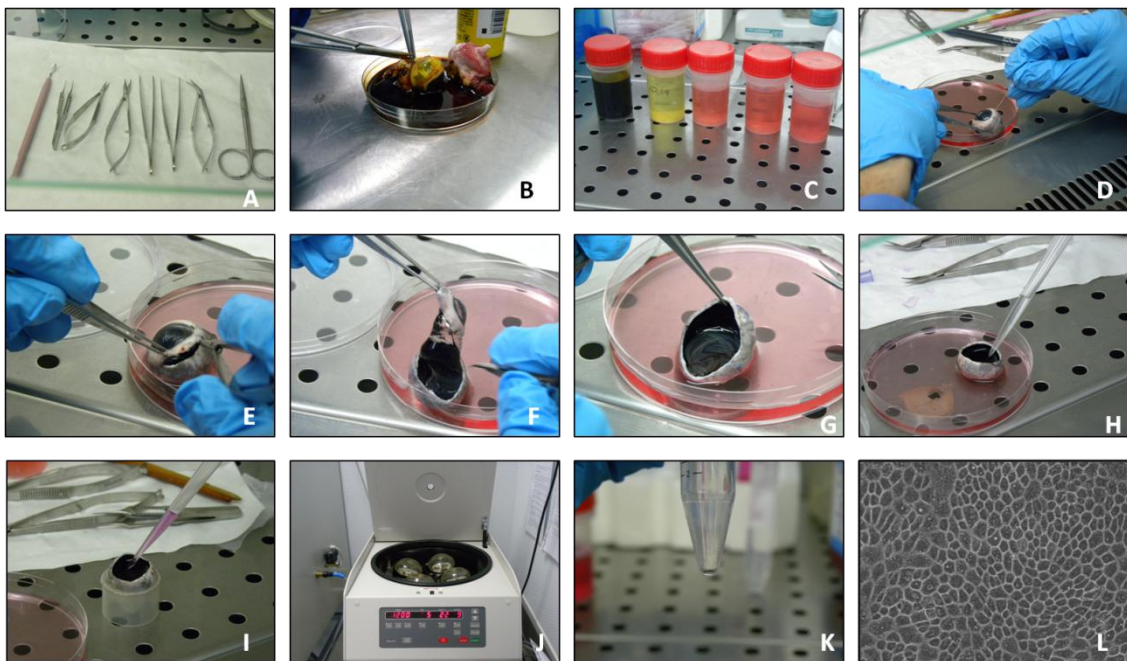


Figura 3: Pasos seguidos para el aislamiento de células de epitelio pigmentario de la retina de un ojo de cerdo. L) Resultado final del cultivo de las células aisladas a los 7 días de cultivo

Una vez adheridas las células, se mantuvieron en cultivo cambiando el medio cada 2 o 3 días, hasta alcanzar un 80-90 % de confluencia, momento en el cual se subcultivaron mediante la utilización de tripsina-EDTA al 0,05% y se trasladaron a un frasco de 75 cm², donde se mantuvo el cultivo hasta la realización de los experimentos, en medio DMEM completo y reduciendo el antibiótico/antimicótico del 10 al 1 %. Las condiciones de mantenimiento del cultivo fueron las estándar de 37°C y un 5% de CO₂. El medio fue renovado cada 2-3 días y las células fueron tripsinizadas al alcanzar un 80% de confluencia. Tanto el conteo celular, como la determinación de la viabilidad

celular previa a la siembra de las células para la realización de los experimentos fueron llevados a cabo en una cámara de Neubauer mediante el ensayo estándar con Tripán Azul (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) con la ayuda de un microscopio óptico (Elipse TS100, Nikon, Tokio, Japón).

4.2.2. Experimentos preliminares con células del EPR de cerdo: ensayos de proliferación y viabilidad celular.

Se realizaron varios experimentos preliminares sobre el cultivo primario de EPR aislado de ojos de cerdo obtenido. Se llevó a cabo un ensayo de viabilidad y proliferación celular con el objetivo de determinar el medio más adecuado para los cocultivos y controles que participan en este trabajo. Además se realizó otro ensayo de viabilidad celular para determinar la concentración óptima de H₂O₂ que se utilizaría como fuente de daño oxidativo.

4.2.2.1. Ensayo de proliferación celular Alamar Blue®

El experimento preliminar de proliferación celular para seleccionar el medio más adecuado fue realizado mediante el ensayo Alamar Blue® (AbD Serotec, Oxford, UK). El modo de acción del Alamar Blue consiste en que este producto es un indicador de oxidación-reducción que emite fluorescencia en respuesta a la reducción química del medio consecuente al crecimiento celular. Esta diferencia de fluorescencia es proporcional a la proliferación celular del cultivo.

Para realizar el ensayo, se sembraron 30.000 células/cm² del EPR de cerdo en placas de 12 pocillos y se incubaron a 37°C y 5 % de CO₂ en 3 tipos distintos de medio de cultivo: a) medio Neurobasal A completo (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK), b) DMEM completo, y c) una dilución 1:1 de ambos medios (tabla 2).

A las 24 horas de incubación, se lavaron las células con PBS (Phosphate Buffer Saline, Gibco, Invitrogen, Paisley, UK) y se añadió medio de cultivo nuevo suplementado con un 10% de Alamar Blue® en un volumen equivalente al 10% del volumen del pocillo, incubándose a 37°C y 5 % de CO₂ durante 4 horas. Tras este tiempo, se recogieron alícuotas de cada medio por triplicado y se leyó la fluorescencia a 560 nm de excitación y 590 nm de emisión mediante la utilización de un espectrofluorómetro (Spectra Max M5, Molecular Devices LLC, CA, US). Esto se repitió a los 3 y 6 días y los resultados obtenidos (en unidades de fluorescencia) se describieron respecto a los obtenidos a día 1.

4.2.2.2. Ensayo de viabilidad celular: Kit toxicológico in vitro basado en el MTT®

El estudio preliminar para determinar la concentración óptima de H₂O₂ que se utilizaría como fuente de daño oxidativo, se realizó mediante el kit toxicológico in vitro basado en el MTT® (Sigma-aldrich Co., Saint Louis, Missouri, USA) cuyo modo de acción se basa en el bromuro de 3-[4,5- dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio o MTT, compuesto de color amarillo. Las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables rompen el anillo tetrazólico del compuesto, reduciendo el MTT a formazan, compuesto de color púrpura que una vez disuelto puede medirse espectrofotométricamente. Esta diferencia en la absorbancia es proporcional a la cantidad de células viables presentes en el cultivo.

Para realizar el ensayo, se sembraron 30.000 células/cm² del EPR de cerdo en placas de 24 pocillos y se incubaron a 37°C y 5 % de CO₂ con el medio 1:1 Neurobasal A completo/ DMEM completo. A las 24 horas se eliminó el medio y las células se mantuvieron en dicho medio sin suero durante 24 horas a 37°C y 5 % de CO₂. Tras este tiempo, las células se expusieron a las distintas concentraciones de H₂O₂, durante 5 horas y a 37°C y 5 % de CO₂. Tras este tiempo se eliminó el H₂O₂ y se lavaron las células

3 veces con PBS antes de volver a incubarlas, con medio nuevo (completo), a 37°C y 5 % de CO₂. A los 3 y 6 días post-exposición se incubaron las células en medio completo sin rojo fenol RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK) y un 10% de MTT a 37°C y 5 % de CO₂ durante 4 horas. Los cristales formados se disolvieron con el buffer de disolución (isopropanol) y se determinó la viabilidad celular mediante la lectura de la absorbancia a 570 y 690 nm, en un espectrofotómetro (Spectra Max M5, Molecular Devices LLC, CA, US).

4.2.3. Cultivo celular de AT-MSC.

Para llevar a cabo este trabajo también se utilizaron células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (AT-MSC) que al igual que las células del EPR de cerdo se mantuvieron en cultivo en frascos de 75 cm², bajo condiciones estándar de 37°C y un 5% de CO₂, hasta la realización de los ensayos. El medio de cultivo apropiado para el mantenimiento de las AT-MSC fue DMEM bajo en glucosa (1 g/L) completo, es decir suplementado con un 10% de suero fetal bovino, penicilina (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) y anfotericina B (2,5 µg/ml) (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK). Al igual que en el caso de las células del EPR de cerdo, el medio fue renovado cada 2-3 días y las células fueron tripsinizadas al alcanzar un 80% de confluencia. Tanto el conteo celular, como la determinación de la viabilidad celular previa a la siembra de las células para la realización de los experimentos fueron llevados a cabo en una cámara de Neubauer mediante el ensayo estándar con Tripán Azul y con la ayuda de un microscopio óptico.

4.2.4. Experimentos preliminares con AT-MSc: ensayos de proliferación celular y permeabilidad celular

4.2.4.1. Ensayo de proliferación celular Alamar Blue®

Debido a la imposibilidad de realizar un seguimiento microscópico apropiado de la adherencia y crecimiento del cultivo celular sobre la superficie donde se cultivarían las AT-MSc durante el transcurso de los experimentos de este trabajo, una membrana de policarbonato de 0,4 μm de tamaño de poro y 24 mm de diámetro del sistema de cultivo Transwell® (Corning Inc., Corning, NY, USA), se realizó un estudio preliminar de la proliferación de estas células sobre dicha membrana.

Para realizar este ensayo, se sembraron 30.000 células/cm² AT-MSc sobre la superficie inferior de la membrana de policarbonato del sistema de cultivo Transwell® colocado en posición invertida, y se incubaron a 37°C y 5 % de CO₂ durante 4 horas, en medio DMEM bajo en glucosa, completo. Una vez adheridas, se colocó el Transwell® con la superficie sembrada hacia abajo dentro de una placa 6 pocillos y se incubó durante 24 horas en medio DMEM bajo en glucosa completo, a 37°C y 5 % de CO₂.

Finalmente tras la incubación se realizó el ensayo Alamar Blue® de la misma forma que en el apartado 4.2.2.1, repitiéndose a los 3 y a los 6 días de cultivo.

4.2.4.2. Ensayo de permeabilidad de la membrana de policarbonato de 0,4 μm de poro, del sistema de cultivo Transwell®

Este estudio se diseñó con el objetivo de comprobar si las AT-MSc cultivadas sobre la membrana de policarbonato podrían llegar a impedir la difusión, a través de dicha membrana, de los factores secretados por los distintos tipos celulares presentes en los posteriores cocultivos realizados en este trabajo, debido a su crecimiento durante 3 y 6 días siguiendo la metodología empleada por otros autores para situaciones similares.⁷¹

Para ello, se sembraron 30.000 AT-MSC por cm^2 sobre la parte inferior de la membrana del sistema de cultivo Transwell®, empleando la misma metodología descrita en el apartado 4.2.4.1 (párrafo tercero).

La determinación de la permeabilidad de la membrana de policarbonato sembrada con AT-MSC, se realizó en términos de alteración de la difusión de conjugados de Tripán Azul y BSA (Albumin, from bovine serum, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) tal como ha sido descrito por Cullen V.C. y colaboradores⁸⁹. A los tiempos de cultivo de 3 y 6 días, se renovó el medio de los compartimentos inferiores del sistema de cultivo Transwell® sustituyendo el medio por RPMI 1640 sin rojo fenol, mientras que la compartimento superior se le añadió una solución al 4% de Tripán azul: BSA. Fue incluido un control sin células sembradas en la membrana de policarbonato. Finalmente, una hora después se midió la absorbancia del compartimento inferior a 590 nm utilizando un espectrofotómetro, y expresando los resultados en función de los obtenidos en el control sin células.

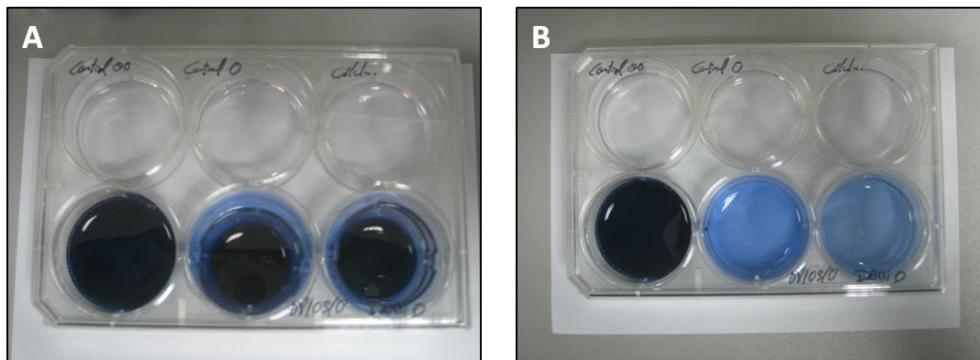


Figura 4: Placa de 6 pocillos empleada para la determinación de la membrana de policarbonato del sistema de cultivo Transwell®. A) Placa con los Transwell dentro de los pocillos, B) Placa lista para ser leída en el espectrofotómetro.

4.3. AISLAMIENTO DE LOS EXPLANTES DE NEURORRETINA DE CERDO

Para llevar a cabo el aislamiento de los explantes de neurorretina necesarios para la realización de este trabajo, se utilizaron retinas que se obtuvieron de ojos de cerdo (n=12) procedentes del matadero local. Los ojos fueron transportados tal y como se describe en el apartado 4.2.1 (primer párrafo).

El protocolo para el aislamiento de la neurorretina de cerdo fue el utilizado en anteriores estudios publicados por el Grupo de Retina del IOBA.⁵⁰ El material quirúrgico fue esterilizado (figura 4.A) y todo el proceso se llevó a cabo en condiciones estériles. En resumen, el ojo de cerdo se colocó en una placa con medio DMEM y se retiraron los restos de tejidos extraoculares mediante la ayuda de unas tijeras (figura 4.B). El globo ocular libre de restos, se sumergió en etanol al 70% durante 2 minutos y posteriormente se pasó por tres lavados de 5 minutos en medio DMEM limpio, suplementado con penicilina (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) y anfotericina B (2,5 µg/ml) (figura 4.C). Con la ayuda de una aguja de 22G se pinchó el globo ocular a la altura de la ora serrata (figura 4. D). A partir de esta abertura se diseccionó el ojo con unas tijeras, retirando el iris y el cristalino (figura 4. E). A continuación el vítreo se retiró con la ayuda de bastoncillos estériles (figura 4.F). El polo posterior obtenido tras la disección se trasladó a una nueva placa de petri con medio DMEM limpio y se desprendió la neurorretina del EPR con la ayuda de un pincel estéril, seccionándose a la altura del nervio óptico (figura 4.G y H). Por último, la neurorretina se extendió sobre una placa de petri con medio Neurobasal A suplementado con penicilina (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) y anfotericina B (2,5 µg/ml), con la capa de fotorreceptores hacia abajo. La neurorretina se cortó con unas tijeras Vannas en explantes de aproximadamente 5 mm x 5 mm, evitando en lo posible la zona periférica (figura 4.I y J).

Parte de los explantes fueron inmediatamente procesados para su análisis morfológico y utilizados como control en fresco para tiempo 0, mientras que el resto se depositó en la parte superior de las membranas de policarbonato de 0,4 µm de poro y 24 mm de

diámetro del sistema de cultivo Transwell®, con la capa de fotorreceptores hacia la membrana. Se añadió 1,6 ml de medio Neurobasal A completo al compartimento inferior del dispositivo Transwell®, suficiente para que el medio contactase con la membrana de policarbonato y nutriese a través de ella al explante, pero sin provocar que éste quedase flotando por encima de la membrana. El medio fue renovado cada 24 horas. Se realizaron 3 experimentos independientes obteniéndose 12 explantes para cada experimento (3 por neurorretina), 6 por cada tiempo de estudio (3 y 6 días), suficientes para ser utilizados en los posteriores cocultivos y controles.

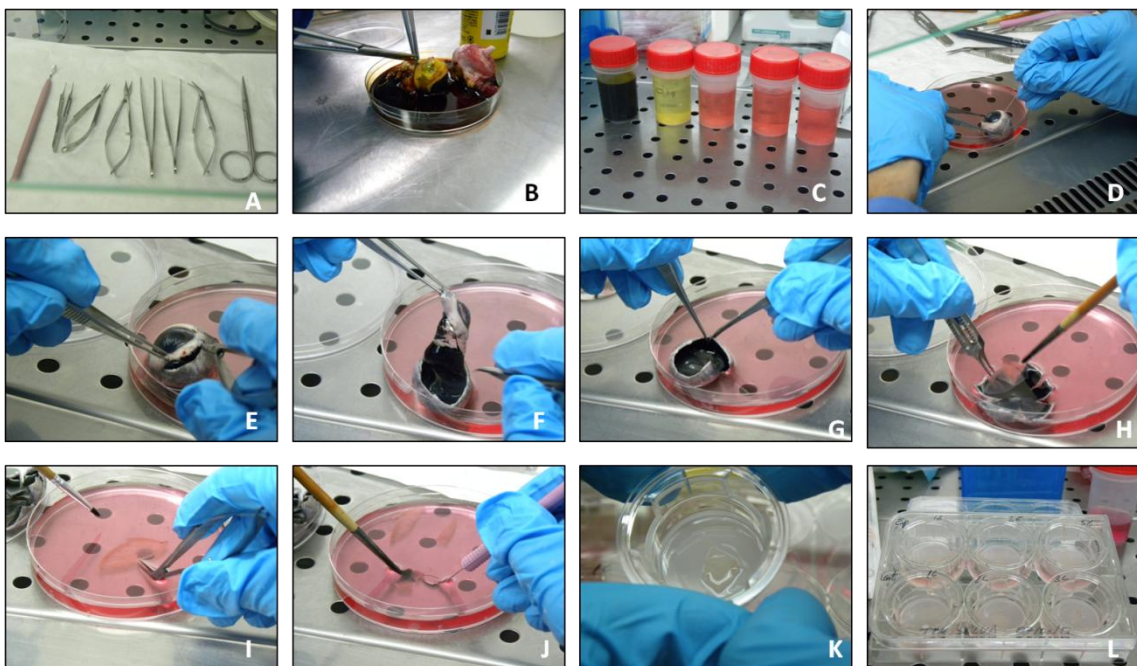


Figura 5: Pasos seguidos para el aislamiento de la neurorretina de un ojo de cerdo. K y L) Resultado final del cultivo de los explantes obtenidos y colocados en el sistema de cultivo Transwell®.

4.4. PUESTA PUNTO DEL COCULTIVO DE AT-MSC Y CÉLULAS DEL EPR PORCINO EN UN MODELO DE CULTIVO ORGANOTÍPICO DE NEURORRETINA DE CERDO.

4.4.1. Siembra de células del EPR de cerdo y tratamiento con peróxido de hidrógeno.

Las células del EPR porcino, fueron cultivadas a una densidad óptima de 30.000 células/cm²,¹⁰ en placas de cultivo de 6 pocillos, e incubadas en condiciones estándar de 37°C y un 5% de CO₂ durante al menos 24 horas en DMEM completo, para permitir su adherencia al poliestireno y la obtención de una adecuada morfología. Tras esas 24 horas las células fueron estimuladas con la adición al medio de H₂O₂ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a una concentración de 400 µM, concentración responsable de la pérdida de al menos un 50 % de viabilidad celular en este tipo celular según algunos estudios publicados⁷² y experimentos preliminares descritos anteriormente en este trabajo, para un tiempo de incubación de 5 horas a 37°C y un 5% de CO₂. Tras este tiempo, los pocillos fueron lavados 3 veces con PBS antes del cocultivo con las AT-MSC y los explantes de neurorretina. Paralelamente, se utilizó otro set de pocillos con células de EPR de cerdo, en los que no se añadió el H₂O₂.

4.4.2. Siembra de AT-MSC

De manera similar a la ya descrita en el apartado 4.2.4.1 (párrafo segundo) de este trabajo, se sembraron 30.000 células/cm² AT-MSC sobre la superficie inferior de la membrana de policarbonato del sistema de cultivo Transwell® colocado en posición invertida^{57,58}, y se incubaron a 37°C y 5 % de CO₂ durante 4 horas, en medio DMEM bajo en glucosa completo. Una vez adheridas, se colocó el Transwell® con la superficie sembrada hacia abajo dentro de una placa de 6 pocillos y se incubó durante al menos 24 horas en medio DMEM bajo en glucosa completo, a 37°C y 5 % de CO₂.



Figura 6: Pasos seguidos en la siembra de AT-MSC sobre la parte inferior de la membrana de policarbonato del sistema Transwell®

4.4.3. Ensamblaje del cocultivo de AT-MSC, células del EPR porcino y el cultivo organotípico de neuroretina de cerdo.

Tras la adhesión celular de las AT-MSC a la parte inferior de la membrana del dispositivo de soporte del sistema Transwell®, dichos dispositivos se introdujeron en placas de 6 pocillos, unas previamente sembradas con células del EPR de cerdo (cocultivos con EPR) y otras sin células (cocultivos sin EPR y controles), cultivándose todas ellas en medio 1:1 Neurobasal A completo/ DMEM completo. En el caso de los cocultivos con células del EPR de cerdo, ambos tipos celulares quedaron situados en el compartimento inferior del sistema de cultivo Transwell®, pero sin que existiese contacto físico entre ellos.

Una vez realizado este ensamblaje, se procedió al aislamiento de la neuroretina de los ojos de cerdo, y la siembra de cada explante de neuroretina de 5 mm x 5 mm sobre la parte superior de cada membrana del sistema Transwell® tal y como ha sido descrito en el apartado 2.3 de esta memoria, formando así los diferentes tipos de cocultivos y controles utilizados en este estudio (tabla 1).

Los cocultivos y controles se mantuvieron en incubación a 37°C y un 5% de CO₂, con el medio de cultivo en contacto con la membrana del dispositivo de soporte. Este medio (1,6 ml) se renovó diariamente durante los tiempos de cultivo del estudio que fueron de 3 y 6 días.

A

3 días			6 días		
NME	NE	N	NME	NE	N
NME+H	NE+H	NM	NME+H	NE+H	NM
3 días			6 días		
E	ME	M	E	ME	M
E+H	ME+H		E+H	ME+H	

B

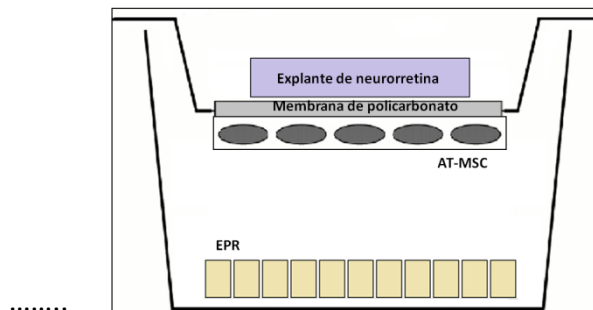


Figura 7: A) Esquema representativo de los cocultivos y controles realizados por experimento, para 3 y 6 días. B) Esquema del ensamblaje de los cocultivos, en este caso concreto representa un cocultivo de neuroretina, células de epitelio pigmentario de la retina y AT-MSC (NME).

4.5. ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN Y VIABILIDAD CELULAR DE LAS CÉLULAS DEL EPR DE CERDO

4.5.1. Ensayo de proliferación celular Alamar Blue®

Se determinó la proliferación celular de las células del EPR de cerdo de los diferentes cocultivos y controles mediante el ensayo Alamar Blue®, de forma similar a la descrita en el apartado 4.2.2.1 (párrafo tercero). Este ensayo se realizó a las 24 horas del ensamblaje de los cocultivos, y se repitió a los 3 y 6 días. Los resultados obtenidos (en unidades de fluorescencia) se describieron respecto a los obtenidos a día 1.

4.5.2. Ensayo de viabilidad celular Viability-citotoxicity assay kit for live & dead cells®

Se evaluó la viabilidad celular de las células del EPR de cerdo de los distintos cocultivos y controles con un segundo método, el Assay Kit for live & dead cells® (Biotium Inc., Hayward, CA, USA), consistente en la adición de calceína (calcein AM) que marca fluorescentemente en verde las células vivas, y el bromuro de etidio homodímero III, (EthD-III) que marcará con fluorescencia roja las células con daños en la membrana celular, muertas. A los 6 días del ensamblaje de los cocultivos, se incubaron las células de EPR de cerdo con una solución 1 μ M de calceína-AM y 2 μ M de EthD-III en PBS durante 30 minutos en oscuridad. Transcurrido ese tiempo se lavó con PBS y se hicieron obtuvieron fotografías de 10 campos microscópicos (magnificación 10x) al azar, de cada pocillo con células de EPR porcino, utilizando un microscopio invertido de fluorescencia Leica DMI6000B (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

4.6. CARACTERIZACIÓN DE LAS AT-MSC MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA

Las células AT-MSC fueron estudiadas mediante inmunofluorescencia indirecta para determinar su estado de diferenciación a los 3 y 6 días del inicio de los diferentes cocultivos. Para ello se utilizarán anticuerpos frente a varios antígenos: Nestina (Abcam, Cambridge, UK) como marcador de células madre neurales, α SMA (α - smooth muscle Actin, Abcam, Cambridge, UK) como marcador de transdiferenciación hacia células de tipo fibroblasto, Citokeratina 8/18 (Abcam, Cambridge, UK) como marcador de células epiteliales, y Recoverina (Covance, Emeryville, CA) como marcador de fotorreceptores.

Anti-α-SMA	Anticuerpo primario monoclonal	Hecho en ratón	1:50	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Citokeratina8/18	Anticuerpo primario monoclonal	Hecho en ratón	1:100	(Abcam, Cambridge, UK
Anti-Nestina	Anticuerpo primario monoclonal	Hecho en ratón	1:100	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Recoverina	Anticuerpo primario policlonal	Hecho en conejo	1:250	Covance, Emeryville, CA, USA
FITC IgG antimouse	Anticuerpo secundario		1:50	Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, USA
FITC IgG antirabbit	Anticuerpo secundario		1:50	Jackson Imm.-Lab.Inc., West Grove, PA, USA

Tabla 3: Anticuerpos utilizados en las inmunofluorescencias de las AT-MSC

4.6.1. Recuperación y fijación de las AT-MSC

A los tiempos 3 y 6 días desde el inicio de los cocultivos, se separaron los explantes de neuroretina de las membranas de policarbonato del sistema de cultivo Transwell® para su procesamiento. Una vez que todas las membranas estuvieron libres de

explantes, se recortaron del sistema Transwell® y se trasladaron, con el cultivo celular de AT-MSK hacia arriba, a una placa de 6 pocillos para su recuperación. Dicha recuperación se llevó a cabo ante la opacidad de la membrana de policarbonato, que imposibilitaba la observación directa mediante un microscopio de fluorescencia. Las células se recuperaron mecánicamente mediante la adición reiterada de PBS sobre las células adheridas a la membrana. Una vez las células se despegaron fueron recogidas y centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos. A continuación se resuspendió el pellet y se contaron en una cámara de Neubauer mediante el ensayo estándar con Tripán Azul, con la ayuda de un microscopio óptico. Tras el conteo se sembraron 10.000 células/cm² en placas de Permanox® de 8 pocillos (1,8 cm² pocillo). A las 24 horas se fijaron con metanol a -20°C durante 10 minutos, se lavaron con PBS y se dejaron secar. Las células así fijadas se mantuvieron a -20°C hasta el inicio del ensayo de inmunofluorescencia.

4.6.2. Inmunofluorescencia indirecta

Mediante las técnicas de inmunofluorescencia es posible caracterizar un cultivo celular a nivel proteico. En este caso se ha utilizado la inmunofluorescencia indirecta para determinar la presencia de los antígenos descritos anteriormente (tabla 3), en las AT-MSK tras 3 y 6 días de cocultivo. La característica principal de la inmunofluorescencia indirecta es la utilización de 2 anticuerpos para localizar una molécula concreta. Mientras el primario se une directamente al antígeno diana, el anticuerpo secundario que se unirá al primario, está marcado con un fluoróforo, lo que permite la detección de esa fluorescencia en el lugar donde está presente el antígeno diana además de amplificar así su señal.

En resumen, en este estudio se ha seguido el siguiente protocolo: se descongelaron las muestras y se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBS. Posteriormente, se incubaron las muestras en una solución de bloqueo durante 1 hora, 10 % de suero de

cabra (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en PBS, a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Tras la incubación se añadieron los distintos anticuerpos primarios (tabla 3) diluidos en solución de bloqueo y se incubaron durante toda la noche a 4°C, en cámara húmeda. Al día siguiente se lavó 3 veces durante 5 minutos con PBS y se incubaron las muestras con los anticuerpos secundarios (tabla 3) diluidos en PBS, durante una hora a temperatura ambiente, en cámara húmeda y en oscuridad. A continuación se realizaron otros 3 lavados durante 5 minutos con PBS antes de añadir la solución de contratinción de los núcleos realizada con DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride, Invitrogen, Paisley, UK) 1:500 en PBS. Finalmente se eliminó el DAPI con 3 lavados de 5 minutos con PBS y se montaron las preparaciones con el medio de montaje DAKO (DakoCytomation Inc., Carpinteria, CA, USA).

Para la detección de la fluorescencia se utilizó el microscopio invertido de fluorescencia confocal. Se realizaron 5 fotografías de 5 campos microscópicos al azar, a 10 aumentos para cada muestra y se contaron las células marcadas y no marcadas de cada fotografía. Se incluyeron controles positivos para cada anticuerpo así como controles negativos (sin anticuerpo primario).

4.7. CARACTERIZACIÓN DE LOS EXPLANTES DE NEURORRETINA DE CERDO MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA.

Se utilizarán técnicas de inmunofluorescencia para evaluar el estado de conservación de los explantes de neurorretina en los diferentes tiempos y cocultivos. Al igual que en el caso de la caracterización de las AT-MS (apartado 4.6), la caracterización de los explantes de neurorretina se llevo a cabo a nivel proteico, utilizando técnicas de inmunofluorescencia indirecta. Para ello se siguió el protocolo utilizado en anteriores estudios del Grupo de Retina del IOBA y en varias publicaciones.^{73,74.}

Anti-GFAP	Anticuerpo primario policlonal	Vaca y conejo	1:500	DakoCytomation Inc, Glostrup, Denmark
Anti-CRALBP	Anticuerpo primario monoclonal	Hecho en ratón	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Recoverina	Anticuerpo primario policlonal		1:500	Millipore, CA, USA
Alexa Fluor 488 IgG antimouse	Anticuerpo secundario		1:200	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Alexa Fluor 488 IgG antirabbitt	Anticuerpo secundario		1:200	Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, USA

Tabla 4: Anticuerpos utilizados en las inmunofluorescencias de los cortes de los explantes de neurorretina.

4.7.1. Procesamiento

A los 3 y 6 días del inicio del estudio, los explantes de neurorretina fueron separados de la membrana de policarbonato del sistema Transwell® e inmediatamente fueron fijados en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (pH 7,4) durante 2 horas antes de ser bañados en sacarosa como crioprotección, en concentraciones creciente: 2 horas en sacarosa al 10%, 2 horas en sacarosa al 20% y toda la noche en sacarosa al 30%. Al día siguiente, los explantes fueron embebidos en Tissue-Tek (O.C.T. Compound; Sakura Finetek Europe B.V., Alphen, The Netherlands) y conservados a -80.°C. Posteriormente se cortaron en secciones de 5 µm de espesor en el criostato y se conservaron en los portaobjetos a -20°C hasta el inicio de la inmunotinción.

4.7.2. Inmunofluorescencia indirecta

Para la inmunodetección de los explantes de neuroretina se siguió un protocolo similar al que se utilizó para la caracterización mediante inmunofluorescencia de las AT-MS. En este caso, en resumen, se atemperaron los cortes de los explantes durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el OCT mediante un lavado de 30 minutos en agua destilada. A continuación se secaron los portaobjetos y se rodearon las muestras con Pap-pen (Invitrogen, Paisley, UK) para evitar la pérdida de líquido y una posible evaporación total durante las incubaciones.. Se incubaron las muestras durante 2 horas a temperatura ambiente en el tampón de bloqueo, solución formada por un 0,1 % de Triton x-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis,MO, USA) y un 5% de suero de cabra en PBS, en cámara húmeda. A continuación se incubaron los cortes con el anticuerpo primario anti-GFAP (anti Glial Fibrillary Acidic Protein, DakoCytomation Inc, Glostrup, Denmark), durante 30 minutos a temperatura ambiente a una concentración de 1:500 en PBS con un 0,1 % de Triton x-100. Se eliminó el anticuerpo anti-GFAP y se incubaron las muestras con el otro anticuerpo primario, al anti-CRALBP (Cellular RetinAldehyde Binding Protein, Abcam plc, Cambridge, UK) a una concentración de 1:1000 en PBS con un 0,1 % de Triton x-100, durante toda la noche a 4 °C, en cámara húmeda. Al día siguiente, se elimina el anticuerpo anti-CRALBP de los cortes y se lavaron con PBS, 3 veces durante 15 minutos. Posteriormente se incuban los anticuerpos secundarios (tabla 4), simultáneamente durante una hora a temperatura ambiente, en oscuridad y en cámara húmeda; se realizan otros 3 lavados de 15 minutos con PBS y se incuban en una solución 1:500 de DAPI en PBS para la contratinción de los núcleos celulares. Finalmente se realizan otros 3 lavados de 15 minutos en PBS para eliminar el DAPI en exceso y se montan las preparaciones con medio de montaje DAKO. Para la detección de la fluorescencia se utilizó un microscopio de DM4000B, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania. y se incluyeron los correspondientes controles negativos (sin anticuerpo primario).

5. RESULTADOS

5.1. EVALUACIÓN DEL CULTIVO CELULAR DE EPR DE CERDO PRESENTE EN EL CULTIVO MIXTO OBJETO DE ESTUDIO

5.1.1. Caracterización morfológica del cultivo primario de EPR de cerdo mediante su seguimiento por microscopía de contraste de fases

Tras el aislamiento del EPR de ojos de cerdo procedentes del matadero local, llevado a cabo por disgregación enzimática, se realizó un seguimiento diario del cultivo celular resultante mediante microscopía de contraste de fases.

Las células mostraron características morfológicas propias del EPR, que se mantuvieron hasta el pase 5 (figura 8). Así, a las 24 horas tras el aislamiento, las células se mostraron esféricas y muy pigmentadas (figura 8.A). A medida que progresó el cultivo, las células adquirieron una morfología poligonal y un característico crecimiento en “islas” (figura 8.B). Finalmente, formaron una monocapa de células hexagonales y pigmentadas al llegar a la confluencia. Esta población celular fue bastante homogénea, aunque junto con las células poligonales y pigmentadas también se observó la presencia muy minoritaria de otro tipo celular más grande y redondeado, y menos pigmentado (figura 8.C).

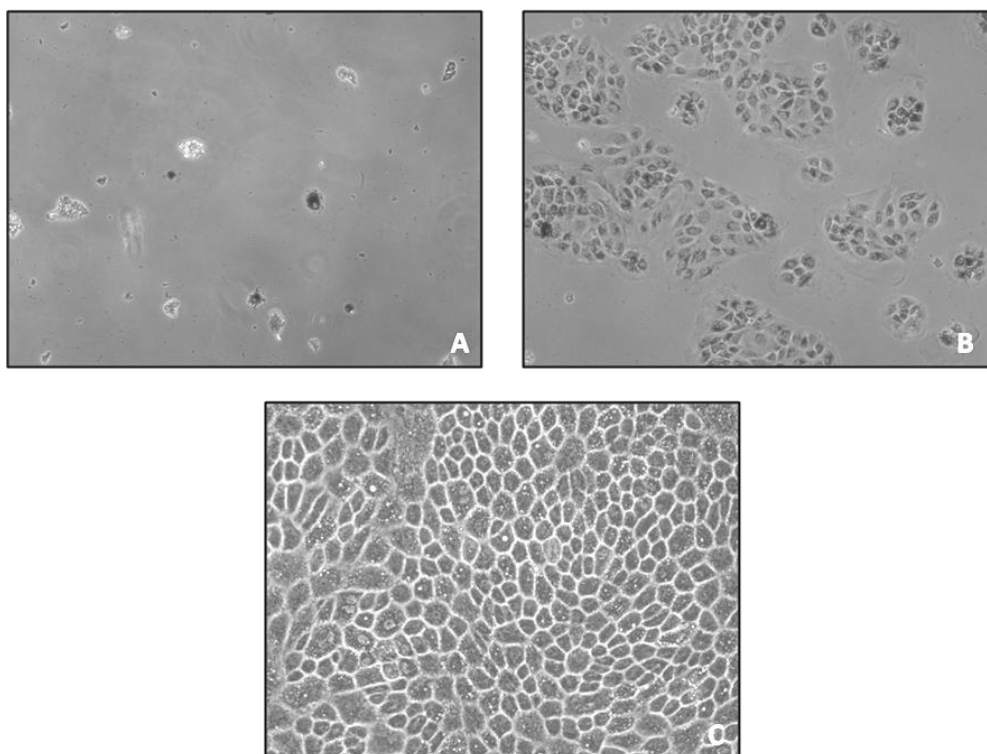


Figura 8: Fotografías realizadas mediante microscopía de contraste de fases, representativas del aislamiento y cultivo de células del EPR porcino. A) 24 horas (magnificación: 10x), B) 4 días (magnificación: 10x) y C) 7 días (magnificación: 20x), tras su aislamiento a partir de ojos de cerdo, para un número de ojos de n=4.

5.1.2. Selección del medio de cultivo más adecuado para el cultivo mixto objeto de estudio en función de la proliferación y viabilidad celular del cultivo primario de EPR de cerdo

Debido a que la presencia de medio Neurobasal A en el cultivo organotípico de neurorretina resultaba necesaria para la adecuada evolución del explante durante el tiempo de duración del estudio, el objetivo de este ensayo fue evaluar la viabilidad y la tasa de proliferación de las células del EPR de cerdo en: a) medio Neurobasal A (suplementado con un 10% de suero fetal bovino, L-Glutamina y B-27) y b) una mezcla de medio Neurobasal A (suplementado con suero fetal bovino, L-Glutamina y B-27) y

medio DMEM (, suplementado con un 10% suero fetal bovino) en una proporción 1:1. Como control se utilizó el medio DMEM (, suplementado con un 10% de suero fetal bovino).

Se determinó la viabilidad celular del EPR de cerdo tras 3 y 6 días de crecimiento en los diferentes medios de cultivo. Los resultados se muestran en la figura 9. La viabilidad de las células del EPR cultivadas en el medio a) y en el b) fue significativamente superior a la de las células crecidas en el medio control, tanto a los 3 como a los 6 días. También se observó un aumento de la viabilidad de las células crecidas en el medio b) respecto a las crecidas en el medio a) a los 3 días de cultivo, sin embargo esta circunstancia no se observó a los 6 días.

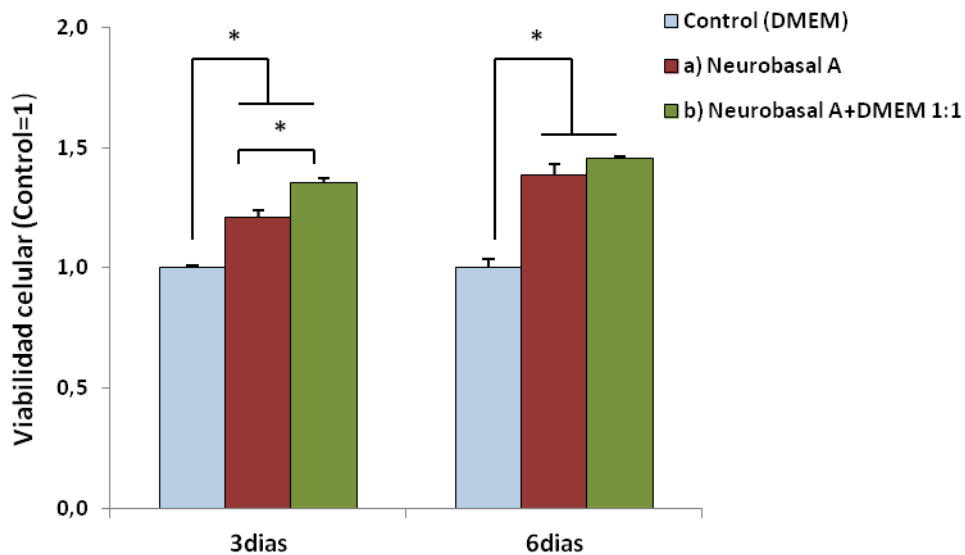


Figura 9: Valores promedio \pm desviación típica de la viabilidad celular del cultivo primario de EPR de cerdo, a los 3 y 6 días de crecimiento en diferentes medios de cultivo. Experimentos independientes: n=1, triplicado. *(p<0,05).

Por otra parte, se estudió la tasa de proliferación del cultivo primario de EPR de cerdo cultivado en estos mismos medios, observándose una mayor proliferación de las células cultivadas en los medios a) y b), respecto a aquellas cultivadas en el medio control, durante 6 días. Sin embargo, únicamente en el medio b) se observó una mayor

proliferación celular respecto al control a los 3 días de cultivo. Entre los medios a) y b) no hubo diferencias significativas a los 6 días de cultivo, siendo a los 3 días significativamente más alta la tasa de proliferación de las células cultivadas en el medio b) (figura 10).

Estos resultados nos llevaron a seleccionar al medio de cultivo b) como el más adecuado para el cultivo mixto de células del EPR porcino y AT-MSC en un modelo organotípico de neuroretina de cerdo.

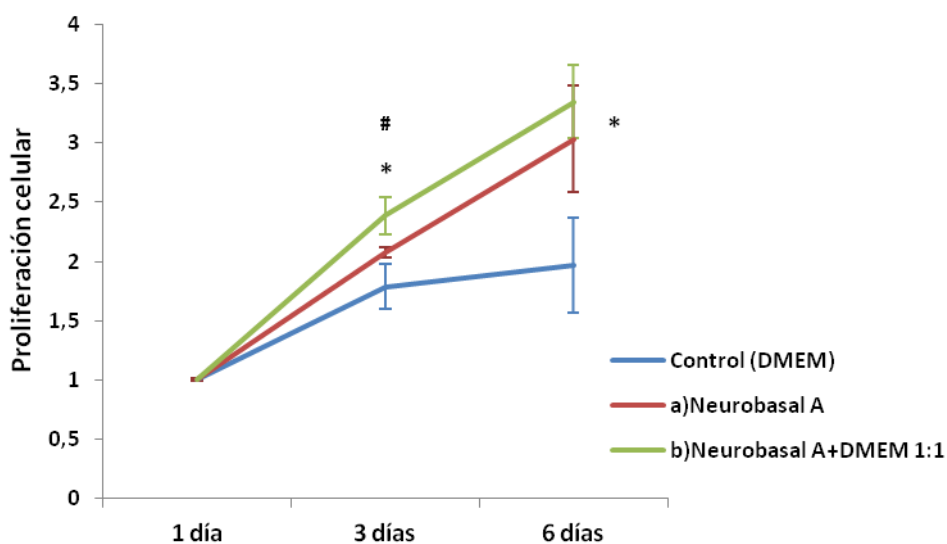


Figura 10: Proliferación celular del cultivo primario de EPR de cerdo en diferentes medios de cultivo. Se representa el valor promedio \pm la desviación típica de las unidades de fluorescencia obtenidas para cada tiempo en función de las obtenidas a tiempo = 1 día.

Experimentos independientes: n=1, triplicado. * ($p < 0,05$ entre los medios a) y/o b) y el control), # ($p < 0,05$ entre el medio a) y el b)).

5.1.3. Determinación de la concentración óptima de peróxido de hidrógeno, para el tratamiento de las células del EPR de cerdo: ensayo de viabilidad celular

Se determinó que la concentración de peróxido de hidrógeno óptima sería aquella responsable de un descenso de la viabilidad celular de aproximadamente el 50% respecto al control sin tratar, en un tiempo de exposición de 5 horas.

En la figura 11, se observa como el valor promedio de las concentraciones de 200 μM y 400 μM son las más cercanas al objetivo del ensayo, considerándose finalmente la de 400 μM como la más adecuada. En ningún caso la exposición a las distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno produjo un aumento de la viabilidad celular respecto a la del control sin tratar.

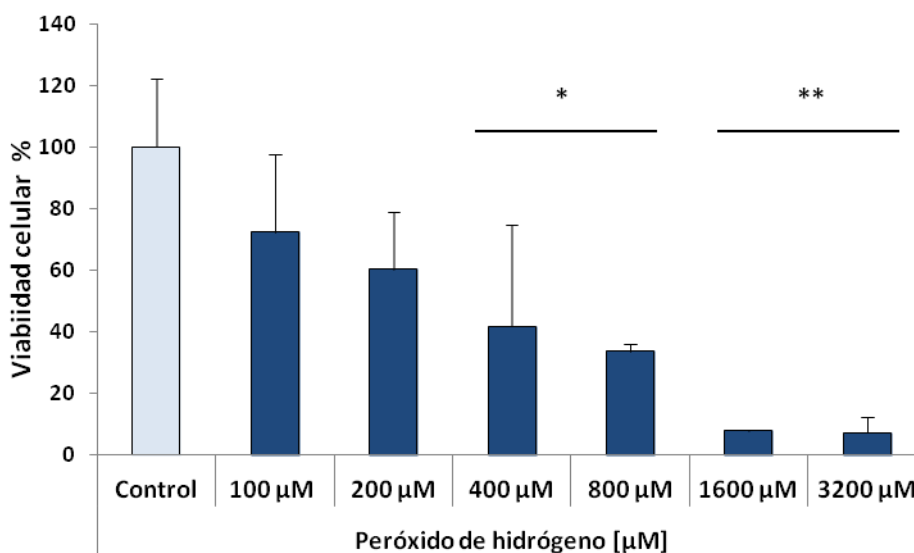


Figura 11: Valores promedio \pm desviación típica de la viabilidad celular del cultivo primario de EPR de cerdo tras 5 horas de exposición a distintas concentraciones de H_2O_2 , siendo el control el cultivo primario de EPR de cerdo sin tratar. Experimentos independientes: $n=1$, triplicado. * ($p<0,05$ entre las diferentes concentraciones de H_2O_2 y el control), ** ($p<0,01$ entre las diferentes concentraciones de H_2O_2 y el control).

5.1.4. Estudio de proliferación y viabilidad de las células del EPR porcino tras su cocultivo con AT-MSC y un cultivo organotípico de neuroretina de cerdo

Se llevó a cabo un estudio de proliferación celular del cultivo primario de EPR porcino durante 6 días tras el inicio del cocultivo de éste con AT-MSC y un explante de neuroretina de cerdo. A partir de este estudio se pretendía determinar si la tasa de proliferación de las células del EPR se ve afectada por la presencia de AT-MSC (ME), por la presencia de neuroretina (NE), o por la presencia de ambos simultáneamente

(NME), (figura 12.A). Por otra parte, este estudio también tenía como objetivo determinar si tras un daño oxidativo, provocado por la exposición de las células del EPR de cerdo a una concentración de 400 μM de H_2O_2 , el cocultivo de este epitelio con AT-MSC (ME+H), con un explante de neuroretina (NE+H) o con ambos simultáneamente (NME+H), podría aumentar la tasa de proliferación celular del EPR dañado (figura 12.A).

Tanto en las células del EPR de cerdo que fueron expuestas a H_2O_2 , como en las que no lo fueron, se observó un aumento de su densidad celular a lo largo del tiempo de cultivo.

En las células del EPR no tratadas con H_2O_2 no se observaron diferencias significativas en la tasa de proliferación celular entre las cocultivadas con AT-MSC o las cocultivadas con el explante de neuroretina, y las de EPR en monocultivo (control). Sin embargo si se observó un marcado descenso de la proliferación celular del EPR cocultivado con ambos (AT-MSC y explante de neuroretina) respecto del EPR control, tras 6 días de crecimiento.

En las células del EPR tratadas con H_2O_2 , tras 6 días de cultivo únicamente se observó un aumento significativo en la tasa de proliferación de las células cocultivadas con el explante de neuroretina, respecto del EPR control.

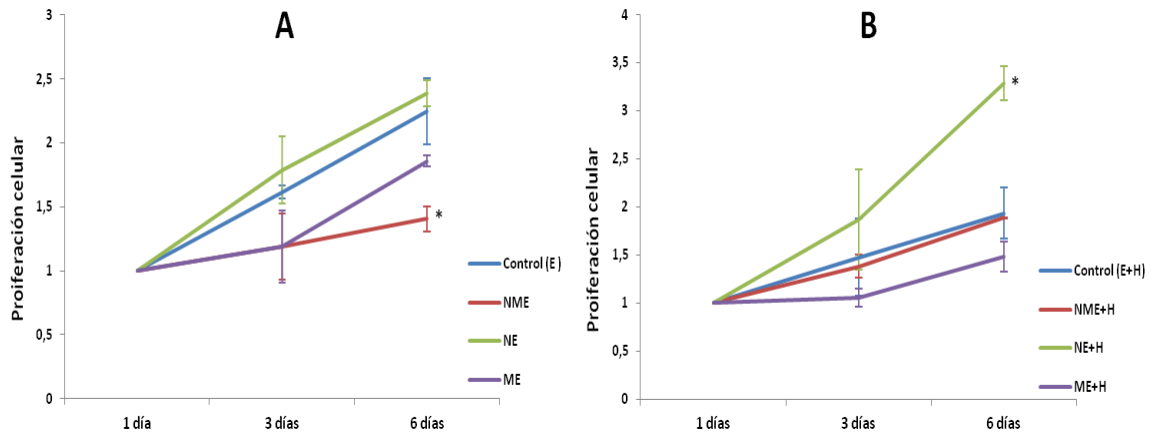


Figura 12: Proliferación celular del cultivo primario de EPR de cerdo en los diferentes cocultivos (NME, NE, ME, NME+H, NE+H y ME+H; tabla 1). Se muestran los resultados para A) cocultivos sin exposición previa a 400 μM de H_2O_2 durante 5 horas, y B) cocultivos con exposición previa a 400 μM de H_2O_2 durante 5 horas. Se representa el valor promedio \pm la desviación típica de las unidades de fluorescencia obtenidas para cada tiempo, en función de las obtenidas a tiempo = 1 día. Experimentos independientes $n=3$, triplicado. * ($p<0,05$)

Del mismo modo que en el caso de la determinación de la proliferación celular, también se llevó a cabo un estudio de viabilidad de las células del EPR porcino a los 6 días tras el inicio de los diferentes cocultivos (figura 13). Con este estudio se pretendía conocer si la viabilidad del EPR podría verse comprometida por la presencia de AT-MSK (ME), por la presencia de neurorretina (NE), o por la presencia de ambos (NME) en el mismo cocultivo, así como si tras un daño oxidativo, provocado mediante la exposición de las células del EPR de cerdo a una concentración de 400 μM de H_2O_2 durante 5 horas, la presencia de AT-MSK (ME+H), la presencia de neurorretina (NE+H) o la presencia simultánea de ambos (NME+H), podría favorecer la supervivencia de las células del EPR dañado.

Los resultados presentados en la figura 13 muestran un alto porcentaje de células viables a los 6 días de cocultivo del EPR con un explante de neurorretina o con

AD.MSC, respecto del EPR en monocultivo (control). En ambos casos la viabilidad celular supera el 90 % respecto de la del control, siendo significativamente superior en la que el EPR fue cocultivado con un explante de neuroretina. Sin embargo las células del EPR cocultivadas con AT-MSC y neuroretina simultáneamente, mostraron un descenso en su viabilidad celular de más de un 30% respecto al control.

En cuanto a los cocultivos en los que previamente se expuso las células del EPR de cerdo a una concentración de 400 μM de H_2O_2 durante 5 horas (E+H, NME+H, NE+H y ME+H), se produjo en todos ellos un descenso significativo en el porcentaje de células viables respecto a los mismos cocultivos en ausencia de tratamiento previo con H_2O_2 . Además, en ningún caso se observó una disminución en el porcentaje de células viables de los cocultivos NME+H, NE+H y ME+H respecto al monocultivo de EPR previamente estimulado con H_2O_2 (E+H), Viéndose incluso significativamente incrementado en los cocultivos del EPR con neuroretina (NE+H), y del EPR con AT-MSC y neuroretina simultáneamente (NME+H).

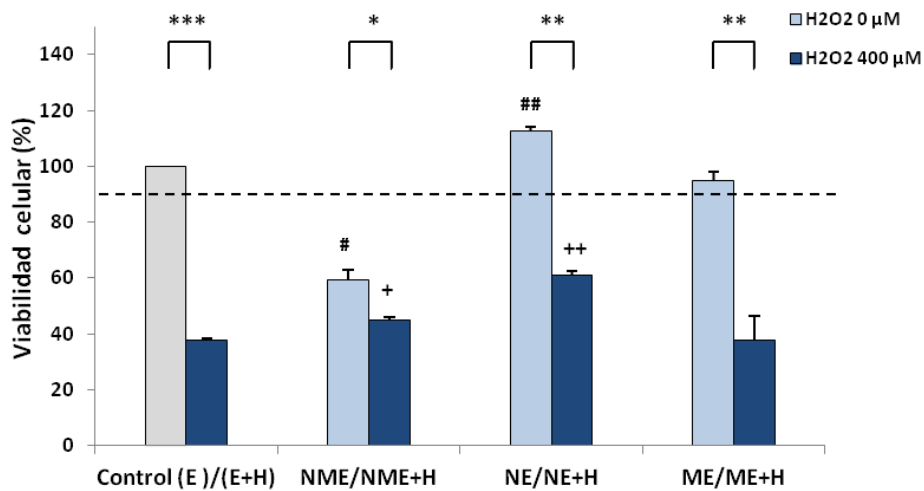


Figura 13: Valores promedio \pm desviación típica del porcentaje de células viables del cultivo primario de EPR de cerdo tanto en los cocultivos expuestos a H_2O_2 (E+H, NME+H, NE+H y ME+H) como en los que no fueron expuestos a H_2O_2 (NME, NE y ME), respecto del monocultivo de células del EPR de cerdo (control, E).

Experimentos independientes: n=3, triplicado. *(p<0,05), **(p<0,01), ***(p<0,001), # (p<0,05 entre cocultivos sin previa exposición a H_2O_2 y el control), ##(p<0,01 entre cocultivos sin previa exposición a H_2O_2 y el control), +(p<0,05 entre cocultivos con previa exposición a H_2O_2 y el E+H), ++p<0,01 entre cocultivos con previa exposición a H_2O_2 y el E+H).

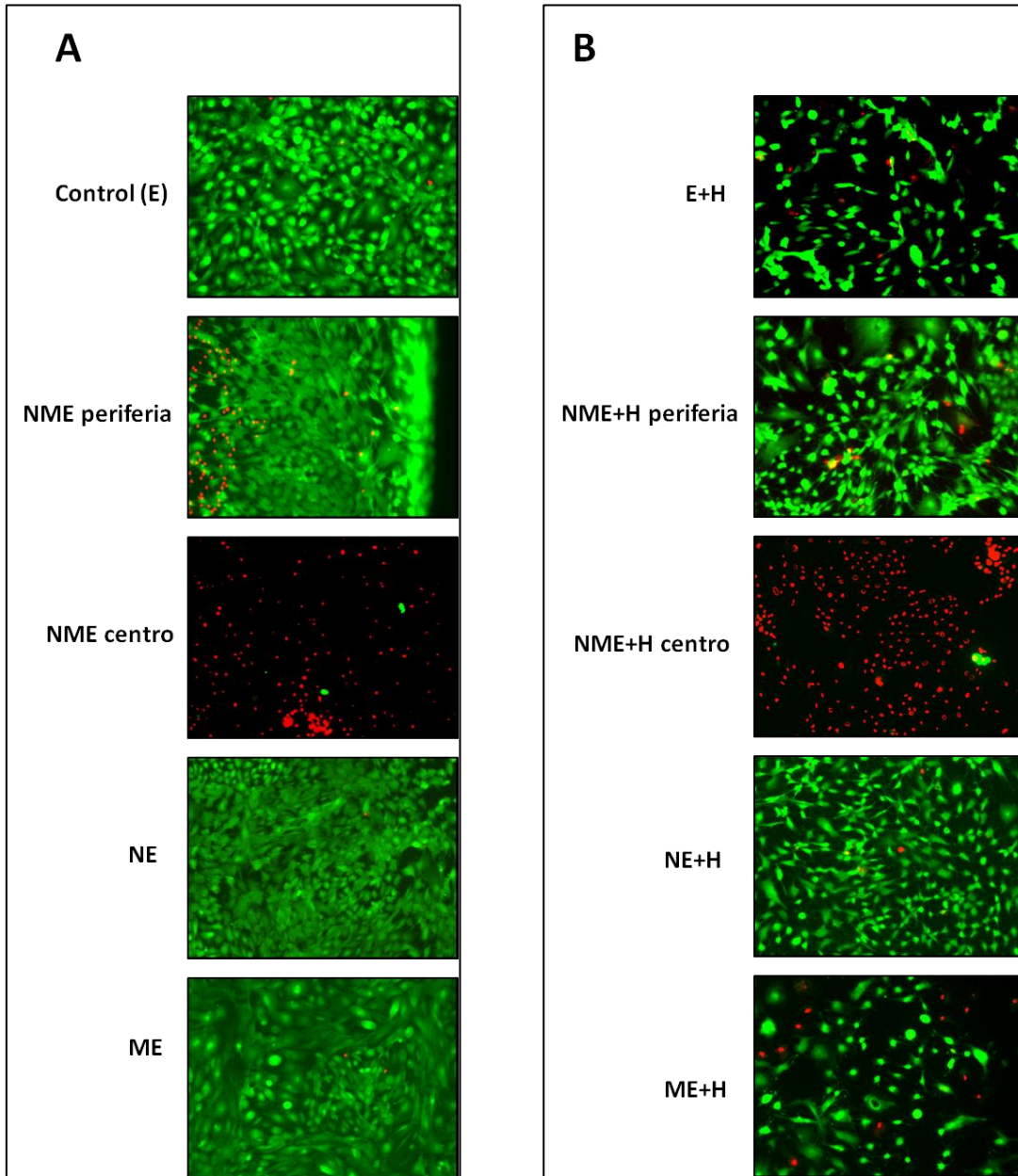


Figura 14: Imágenes representativas del porcentaje de células viables del EPR de cerdo a los 6 días del inicio del estudio (10 campos microscópicos tomados al azar para cada cocultivo). Las células viables aparecen marcadas con fluorescencia verde (calceína) y las células con daños en su membrana celular (muertas) aparecen marcadas con fluorescencia roja (EthD-III). A) células del EPR no expuestas a H₂O₂ en monocultivo (control) y con los diferentes cocultivos (tabla 1). B) células del EPR expuestas a H₂O₂, en monocultivo y con los diferentes cocultivos (tabla 1). Experimentos independientes: n=3. Magnificación: x10

5.2. EVALUACIÓN DEL CULTIVO CELULAR DE AT-MSC PRESENTE EN EL CULTIVO MIXTO OBJETO DE ESTUDIO

5.2.1. Estudio de la proliferación del cultivo celular de AT-MSC sobre una membrana de policarbonato de 0,4 μm de diámetro de poro

Se realizó un estudio preliminar de la proliferación de las AT-MSC cultivadas sobre una membrana de policarbonato de 0,4 μm de diámetro de poro, del sistema de cultivo Transwell® (Corning Inc., Corning, NY, USA), debido a la imposibilidad de realizar un seguimiento microscópico apropiado de la adherencia y crecimiento del cultivo celular sobre dicha membrana.

La figura 15 representa la tasa de proliferación de las AT-MSC sobre una membrana de policarbonato de 0,4 μm de diámetro de poro durante 3 días de cultivo, respecto a la proliferación del control a día 1. Como control se utilizó una membrana de policarbonato de 0,4 μm de diámetro de poro sobre la que no se cultivaron células.

En el primer día tras la siembra, la membrana de policarbonato sobre la que se cultivaron las AT-MSC muestra un valor promedio 3 veces más elevado (en unidades de fluorescencia) que el control. Tres días después de iniciado el cultivo, dicha tasa de proliferación celular en la membrana de policarbonato sobre la que se sembraron AT-MSC aumenta significativamente (más de dos veces) respecto a la obtenida el primer día, mientras que la membrana control no muestra ningún cambio significativo.

Estos resultados confirman la adecuada adherencia y proliferación celular del cultivo de AT-MSC sobre la membrana estudiada.

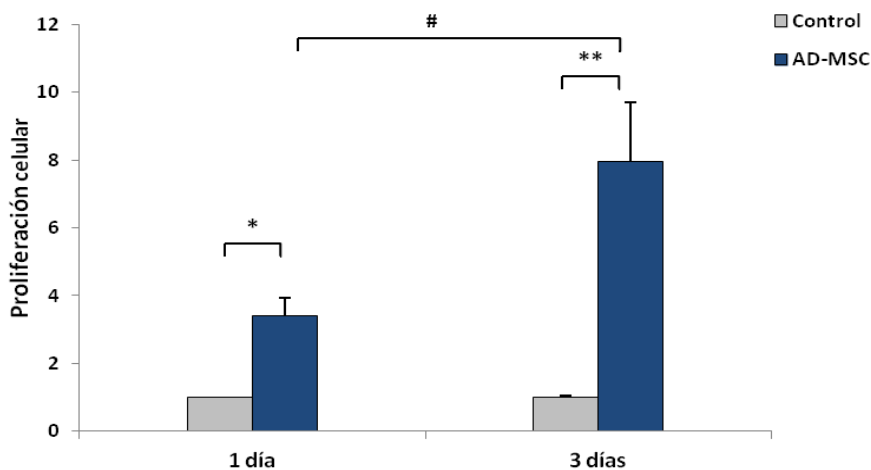


Figura 15: Proliferación celular del cultivo de AT-MSC sobre una membrana de policarbonato de 0,4 μm de diámetro de poro durante 3 días. Como control se utilizó una membrana de policarbonato de 0,4 μm de poro sin cultivo celular. Se representa el valor promedio \pm la desviación típica de las unidades de fluorescencia obtenidas para cada tiempo en función de las obtenidas por el control a tiempo = 1. Experimentos independientes: n=3, triplicado. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), # ($p < 0,05$ entre las AT-MSC cultivadas sobre la membrana a día 1 y a día 3 tras la siembra).

5.2.2. Estimación de la permeabilidad del cultivo celular de AT-MSC sobre una membrana de policarbonato de 0,4 μm de diámetro

Este estudio preliminar se diseñó con el objetivo de comprobar si en el cocultivo de células del EPR porcino y AT-MSC en un modelo organotípico de neuroretina de cerdo, las AT-MSC cultivadas sobre la membrana de policarbonato podrían llegar a impedir la difusión, a través de dicha membrana, de los factores secretados por los distintos tipos celulares presentes en el cocultivo.

La figura 16 muestra la cantidad de BSA difundida en una hora, a través de la membrana de policarbonato de 0,4 μm de diámetro de poro sobre la que previamente se había sembrado 30.000 AT-MSC/ cm^2 , en relación con la cantidad de BSA difundida a través de la membrana control (sobre la que no se cultivaron AT-MSC), a 3 y 6 días tras la siembra de las células.

Estos resultados confirman que el cultivo de AT-MSC sobre una membrana de policarbonato de 0,4 μm no impide la difusión a través de dicha membrana a los 3 y 6 días tras la siembra. No obstante se observó que la permeabilidad de la membrana sobre la que fueron cultivadas las AT-MSC respecto a la membrana control, se reducía con el tiempo (aproximadamente un 30% a los 3 días y un 60% a los 6 días).

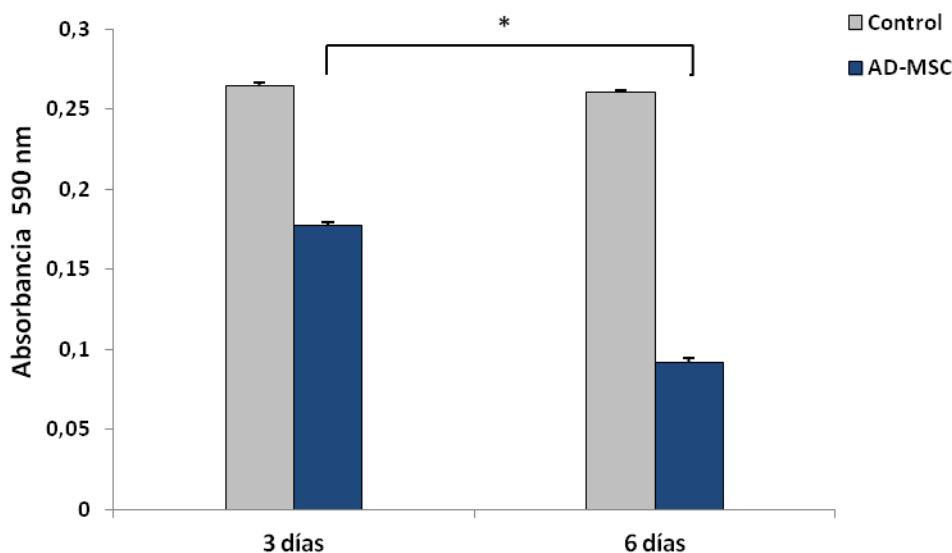


Figura 16: Cantidad de BSA difundida en una hora, expresada como valor promedio \pm la desviación típica de la absorbancia a 590 nm, a los 3 y 6 días del cultivo de AT-MSC sobre una membrana de policarbonato de 0,4 μm de poro. Como control se utilizó una membrana de policarbonato de 0,4 μm de poro sin cultivo celular. Experimentos independientes: n=1, triplicado. * ($p < 0,05$).

5.2.3. Caracterización de las AT-MSC tras su cocultivo con células del EPR porcino y un cultivo organotípico de neuroretina de cerdo

La caracterización de las AT-MSC presentes en el cultivo mixto objeto de estudio se llevó a cabo mediante el estudio de la expresión de marcadores a nivel proteico por técnicas de inmunofluorescencia, realizándose a 3 y 6 días de cultivo.

El objetivo de este estudio fue determinar si el cocultivo de las AT-MSC con células del EPR (ME), con un cultivo organotípico de neurorretina (NM) o con ambos simultáneamente (NME), puede inducir una diferenciación celular de las AT-MSC hacia diferentes tipos celulares.

5.2.3.1. Expresión de la proteína α -SMA

Los resultados expuestos en la figura 17 muestran una gran disminución en la expresión de la proteína α -SMA en todos los cocultivos estudiados respecto del monocultivo celular de AT-MSC (control), siendo a los 3 días de un $27,5 \pm 0,3$ % de células positivas para este marcador en el control, e inferior a un 5% en los cocultivos, y a los 6 días de un $37,1 \pm 6,5$ % en el control e inferior a un 8 % en los cultivos.

Estos porcentajes podrían indicar una disminución de la transdiferenciación de las AT-MSC hacia células de tipo fibroblasto en respuesta a la presencia en el mismo cocultivo de células de EPR porcino y/o de un cultivo organotípico de neurorretina. No se observaron diferencias significativas en las expresiones de α -SMA entre los distintos cocultivos.

Como control positivo se utilizó un cultivo celular de fibroblastos. El control negativo, sin anticuerpo primario, no mostró fluorescencia verde (resultados no mostrados).

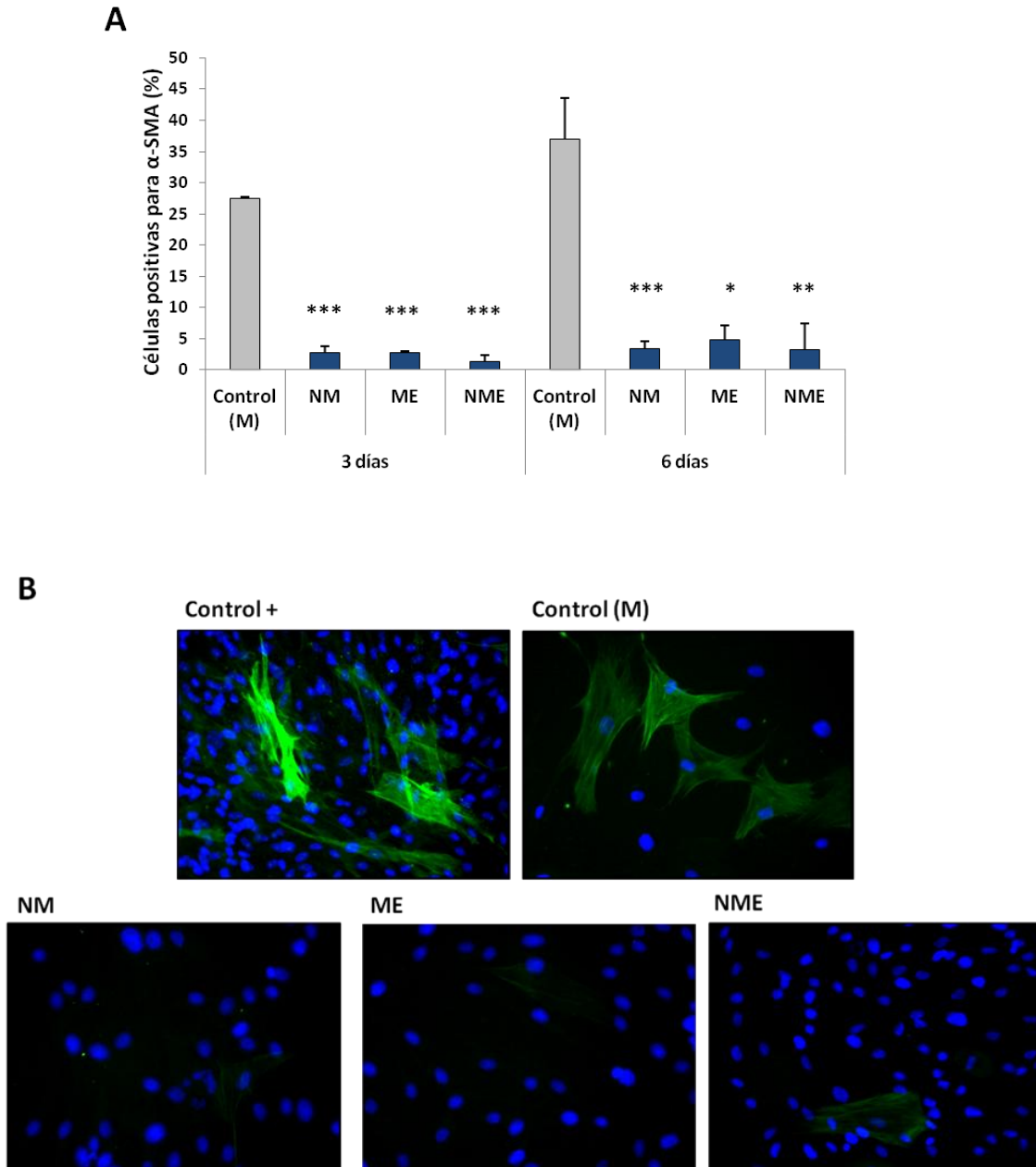


Figura 17: Expresión de la proteína α -SMA, detectada mediante inmunofluorescencia, en AT-MSC en diferentes cocultivos (NM, ME y NME; tabla 1) y en monocultivo (como control). A) Resultados expresados como valor medio \pm desviación típica del porcentaje de células positivas, obtenidos a partir del conteo al azar de 5 campos microscópicos tomados a 10 aumentos. B) Imágenes de inmunofluorescencia, marcaje positivo en verde y núcleos celulares contrateñidos con DAPI en azul. Fotografías representativas de 2 experimentos independientes tomadas a 20 aumentos a los 6 días del inicio de los cultivos. Se utilizó un cultivo de fibroblastos, como control positivo. Experimentos independientes: $n=2$. *($p<0,05$), **($p<0,01$), ***($p<0,001$).

5.2.3.2. Expresión de la proteína Citokeratina 8/18

Se analizó la expresión de la proteína Citokeratina 8/18, considerada como un marcador de células epiteliales, en todos los cocultivos (NM, ME y NME) así como en el monocultivo de AT-MSC utilizado como control, a 3 y 6 días del inicio del experimento.

Los resultados mostraron una muy baja expresión de esta proteína, por debajo del 5% de células positivas tanto a los 3 como a los 6 días y en todos los casos analizados, no encontrándose diferencias significativas entre los cocultivos y los controles a excepción de las AT-MSC cocultivadas con un explante de neurorretina de cerdo (NM) a los 6 días de cultivo, como se puede observar en la figura 18.A.

Como control positivo se utilizó la línea celular de EPR humano, ARPE-19. El control negativo (sin anticuerpo primario) no mostró fluorescencia verde (resultados no mostrados).

Estos resultados no permiten confirmar la diferenciación de AT-MSC hacia EPR u otros tipos celulares epiteliales ni su posible relación con la presencia de células de EPR, neurorretina o ambos simultáneamente, en un tiempo de 6 días de cultivo.

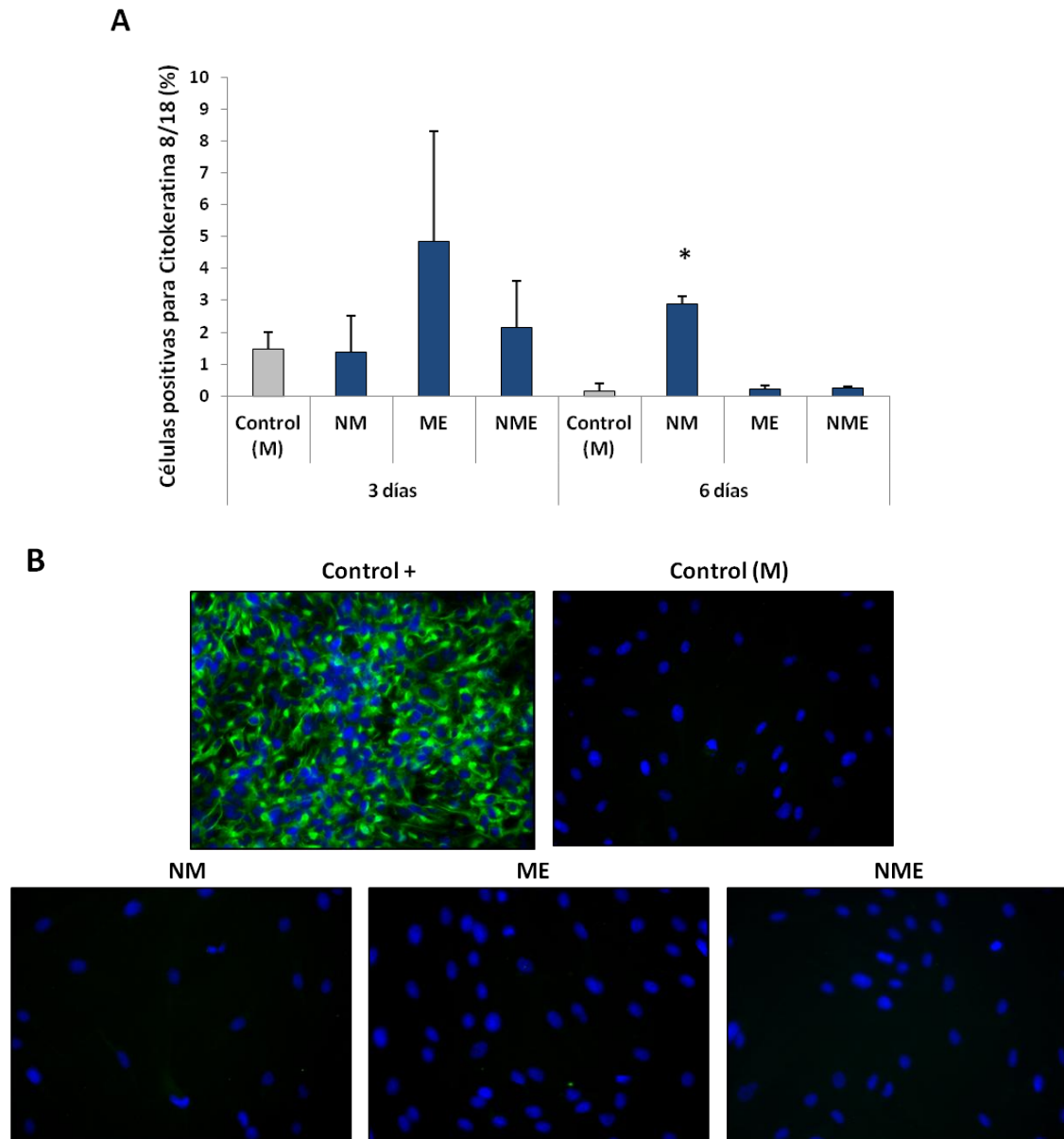


Figura 18: Expresión de la proteína Citokeratina 8/18, detectada mediante inmunofluorescencia en AT-MSC en diferentes cocultivos (NM, ME y NME; tabla 1) y en monocultivo como control. A) Resultados expresados como valor medio \pm desviación típica del porcentaje de células positivas, obtenidos a partir del conteo al azar de 5 campos microscópicos tomados a 10 aumentos. B) Imágenes de inmunofluorescencia, marcaje positivo en verde y núcleos celulares contrateñidos con DAPI en azul. Fotografías representativas de 2 experimentos independientes tomadas a 20 aumentos a los 6 días del inicio de los cultivos. Se utilizó la línea celular humana de EPR, ARPE-19, como control positivo.

Experimentos independientes: $n=2$. $*(p<0,05)$.

5.2.3.3. Expresión de la proteína Nestina

Se estudió la expresión de Nestina, proteína utilizada como marcador de células madre, en todos los cocultivos (NM, ME y NME) así como en el monocultivo de AT-MSC utilizado como control, a 3 y 6 días del inicio del experimento. Como cabría esperar, los resultados mostraron un alto porcentaje de células positivas para la expresión de Nestina en el cultivo de AT-MSC utilizado como control, tanto a los 3 ($99,5 \pm 0,5$) como a los 6 días de estudio ($99,2 \pm 0,8$). Por otra parte, en ninguno de los tiempos se observó una diferencia significativa en el porcentaje de células positivas de los diferentes cocultivos respecto de los controles, manteniéndose en todos los casos su valor promedio por encima del 90% (figura 19). Como control positivo se utilizó un cultivo primario de células progenitoras de cuerpo ciliar de cerdo (CBPC). El control negativo, sin anticuerpo primario, no mostró fluorescencia verde alguna (resultados no mostrados).

Estos elevados porcentajes de células positivas para un marcador de células madre, así como la ausencia de diferencias entre los distintos tipos de cocultivos, podría indicar que independientemente de la presencia de neurorretina o de EPR, el cultivo celular de AT-MSC mantiene sus características de células madre al menos durante un tiempo de 6 días.

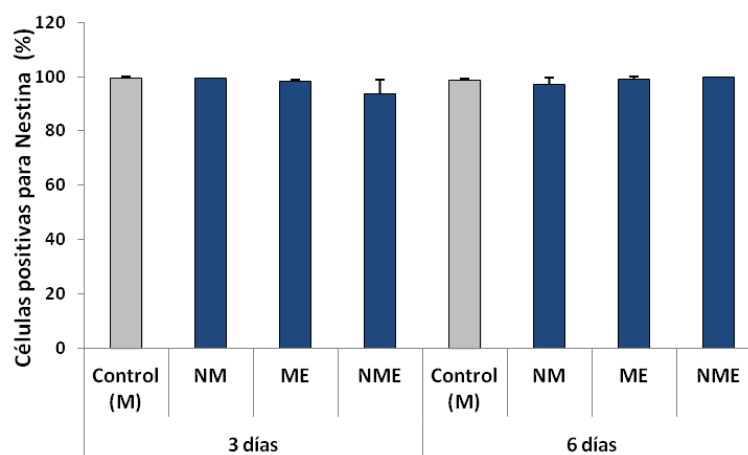


Figura 19: Expresión de la proteína Nestina, detectada mediante inmunofluorescencia, en AT-MSC en diferentes cocultivos (NM, ME y, NME; tabla 1 y en monocultivo como control. Resultados expresados como valor medio \pm desviación típica del porcentaje de células positivas, obtenidos a partir del conteo al azar de 5 campos microscópicos tomados a 10 aumentos.

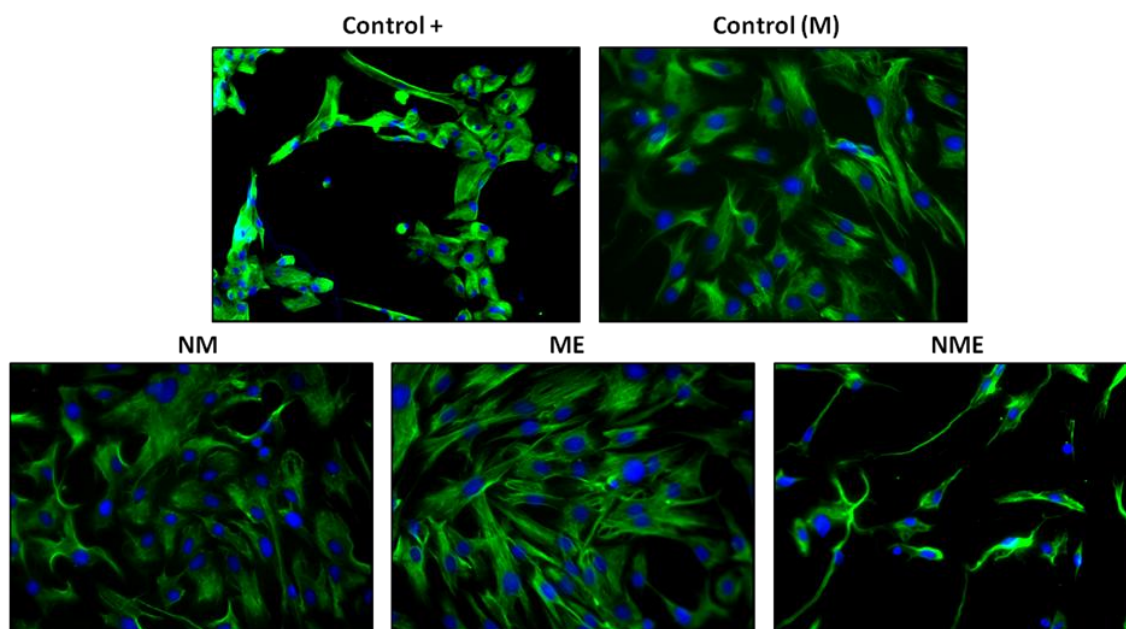


Figura 20: Imágenes de inmunofluorescencia, detección positiva de la proteína Nestina en verde y núcleos celulares contrateñidos con DAPI en azul. Fotografías representativas de 2 experimentos independientes, tomadas a 20 aumentos a los 6 días del inicio de los cultivos. Se utilizó un cultivo primario de CBPC de cerdo como control positivo.

5.2.3.4. Expresión de la proteína Recoverina

Se analizó mediante técnicas de inmunofluorescencia la expresión de Recoverina, proteína utilizada como marcador de fotorreceptores, en todos los cocultivos (NM, ME y NME) así como en el monocultivo de AT-MSc utilizado como control, a 3 y 6 días del inicio del experimento

En la figura 21 se observa un porcentaje muy bajo de células positivas para la expresión de Recoverina tanto en las AT-MSc utilizadas como control, como en los diferentes cocultivos. Para el tiempo 3 días no se observa ninguna diferencia significativa entre la expresión de Recoverina en las AT-MSc presentes en los diferentes cocultivos y las AT-MSc del control. Sin embargo a los 6 días del inicio del estudio si se observa un ligero aumento del porcentaje de células positivas para el

marcador Recoverina en las AT-MSc cocultivadas simultáneamente con células del EPR y un explante de neuroretina (NME), respecto a las AT-MSc control ($0,6 \pm 0,5$ % de células positivas frente a $1,6 \pm 0,15$ de células positivas).

Como control positivo se utilizó un corte transversal de $5 \mu\text{m}$ de espesor de un explante de neuroretina de cerdo, procesado 2 horas tras la muerte del animal. El control negativo, sin anticuerpo primario, no mostró fluorescencia verde (resultados no mostrados).

A pesar del aumento de la expresión de Recoverina en las AT-MSc del cocultivo NME respecto de las AT-MSc del control, los porcentajes de células positivas a 6 días de cultivo son tan bajos que no es posible afirmar que para este tiempo de estudio el cocultivo de un explante de neuroretina y células del EPR con AT-MSc provoque una diferenciación celular de estas últimas hacia un fenotipo celular característico de la célula fotorreceptora.

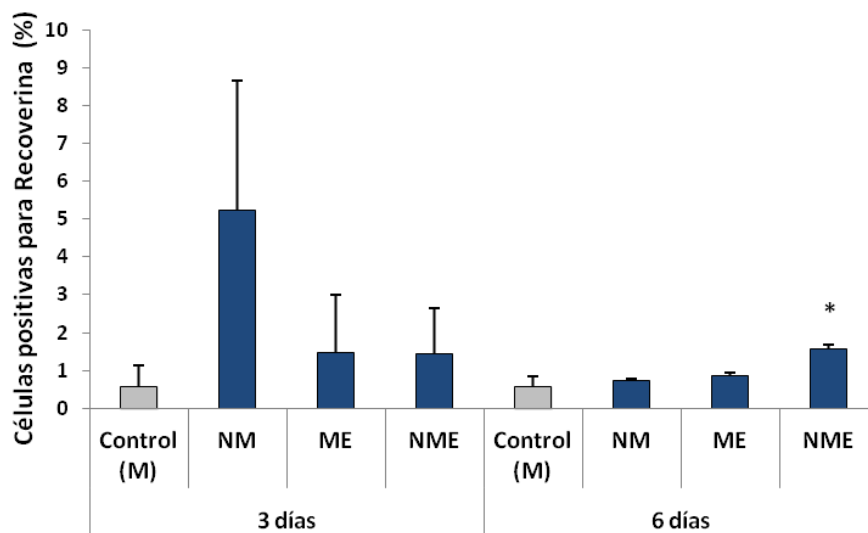


Figura 21: Expresión de la proteína Recoverina, detectada mediante inmunofluorescencia, en AT-MSc en diferentes cocultivos (NM, ME y, NME; tabla 1) y en monocultivo como control. Resultados expresados como valor medio \pm desviación típica del porcentaje de células positivas, obtenidos a partir del conteo al azar de 5 campos microscópicos tomados a 10 aumentos. Experimentos independientes: $n=2$. *($p<0,05$).

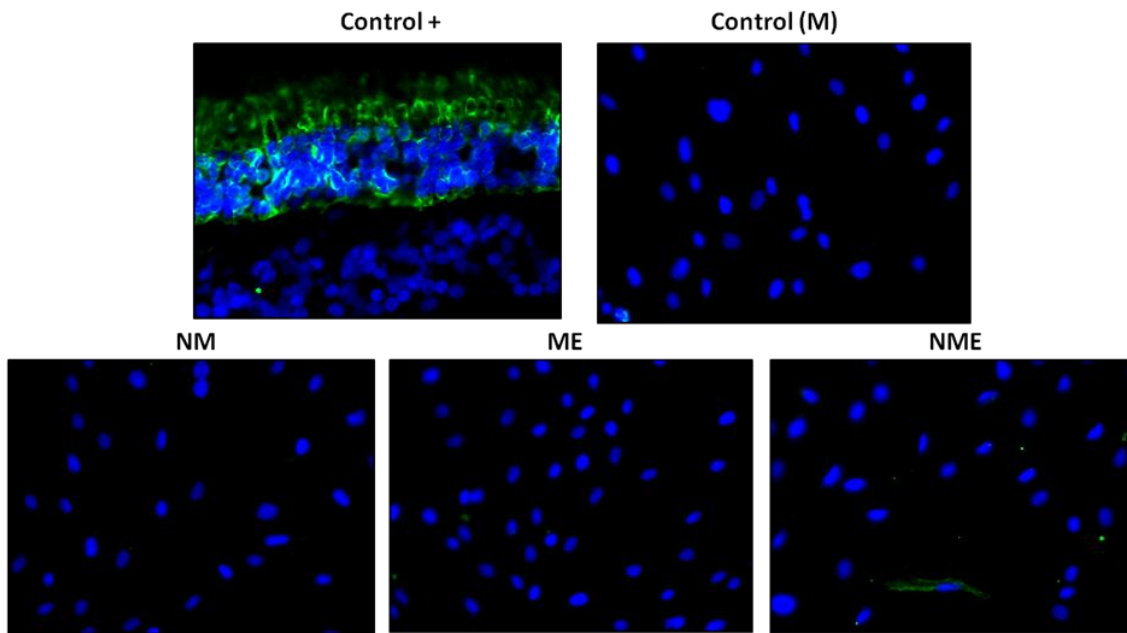


Figura 22: Imágenes de inmunofluorescencia, marcaje con Recoverina en verde y núcleos celulares contrateñidos con DAPI en azul. Fotografías representativas de 2 experimentos independientes, tomadas a 20 aumentos a los 6 días del inicio de los cultivos. Se utilizó un corte transversal de 5 μm de espesor de un explante de neuroretina de cerdo, como control positivo (fotografía tomada a 60 aumentos).

5.3. CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO ORGANOTÍPICO DE NEURORRETINA DE CERDO PRESENTE EN EL CULTIVO MIXTO OBJETO DE ESTUDIO

5.3.1. Caracterización del explante de neurorretina tras su aislamiento

Inmediatamente tras el aislamiento de los explantes de neurorretina de un ojo de cerdo, uno de ellos (control a tiempo 0) fue procesado para su evaluación estructural mediante inmunofluorescencia indirecta.

Mediante la detección de la expresión de las proteínas GFAP y CRALBP, y de la tinción nuclear con DAPI, se pudo determinar, tal y como se muestra en la figura 23, el estado de conservación de la neurorretina. Se observó claramente la expresión de la proteína CRALBP, que determinó el espesor del explante, ya que está presente en las células de Müller, marcando tanto su cuerpo celular como sus prolongaciones que atraviesan toda la retina. Además se detectó CRALBP por encima de la capa nuclear externa (ONL), llegando a observarse en la membrana limitante externa (OLM). La expresión de la proteína GFAP quedó restringida a la membrana limitante interna (ILM) y a la capa de fibras del nervio óptico (NFL). La contratinción de los núcleos celulares con DAPI, hizo posible la diferenciación de la capa nuclear interna (INL), la capa nuclear externa (ONL) y la capa de células ganglionares (GCL).

También se detectó la expresión de Recoverina para determinar el estado de los fotorreceptores, pudiéndose así diferenciar la capa de segmentos externos (OS).

A partir de estos resultados, se comprobó que a pesar del desprendimiento mecánico del EPR y de su posterior procesamiento, el explante de neurorretina mostraba un buen estado de conservación.

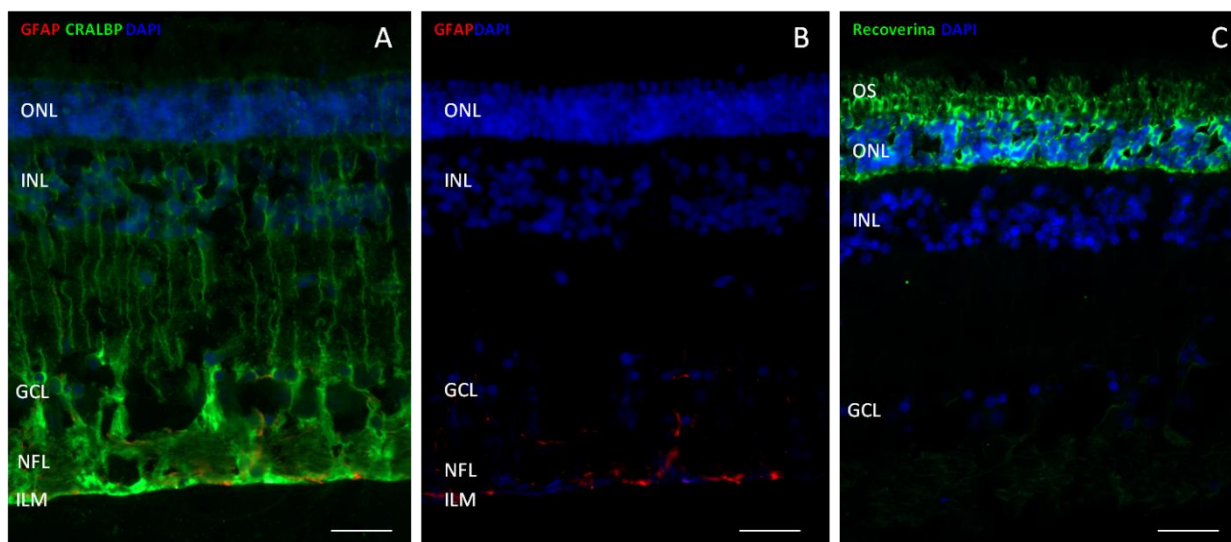


Figura 23: Imágenes de inmunofluorescencia, tomadas a 40 aumentos, del explante de neurorretina procesado inmediatamente tras su aislamiento de un ojo de cerdo (control a tiempo 0). A) y B), expresión de GFAP en rojo. A) expresión de CRALBP en verde. C) Expresión de recoverina en verde. En todas las imágenes núcleos celulares contrateñidos con DAPI en azul y barras de escala de 20 μm . OS: capa de segmentos externos; ONL: capa nuclear externa; INL: capa nuclear interna; GCL: capa de células ganglionares; NFL: capa de fibras nerviosas; ILM: membrana limitante interna. Fotografías representativas de 2 experimentos independientes.

5.3.2. Caracterización de los explantes de neurorretina control a lo largo del cultivo

Los explantes de neurorretina establecidos en los diferentes cocultivos (NM, NE y NME) así como aquellos utilizados como control (N), se procesaron para su caracterización inmunohistoquímica a los 3 y 6 días de iniciado el estudio.

La figura 24 muestra la evolución de los explantes control. En estos, se observa como la expresión de la proteína GFAP aumentó con el tiempo respecto del explante procesado inmediatamente después del aislamiento de la neurorretina (control a tiempo 0). La expresión de CRALBP, sin embargo, no parece cambiar su patrón de expresión durante el tiempo de cultivo, distribuyéndose en todo el espesor de la retina. En cuanto a los núcleos celulares, parecen desorganizarse progresivamente, reduciendo su número y llegando a ser difícil el reconocimiento del límite entre las capas GCL e INL a ambos tiempos de cultivo, e incluso de la ONL a los 6 días.

Las imágenes de la figura 24.D,E y F, muestran el aumento en la expresión de la GFAP con el tiempo. A los 3 días, el aumento de la GFAP se vio prácticamente restringido a la parte más interna de la retina, principalmente la capa NFL, aunque también se observó en la GCL. A los 6 días de cultivo se observó una expresión aun más marcada de la GFAP en las capas internas y en las prolongaciones de las células de Müller, llegando a la ONL y la OLM y extendiéndose en forma lo que parece una de nueva membrana subretinianas (flechas).

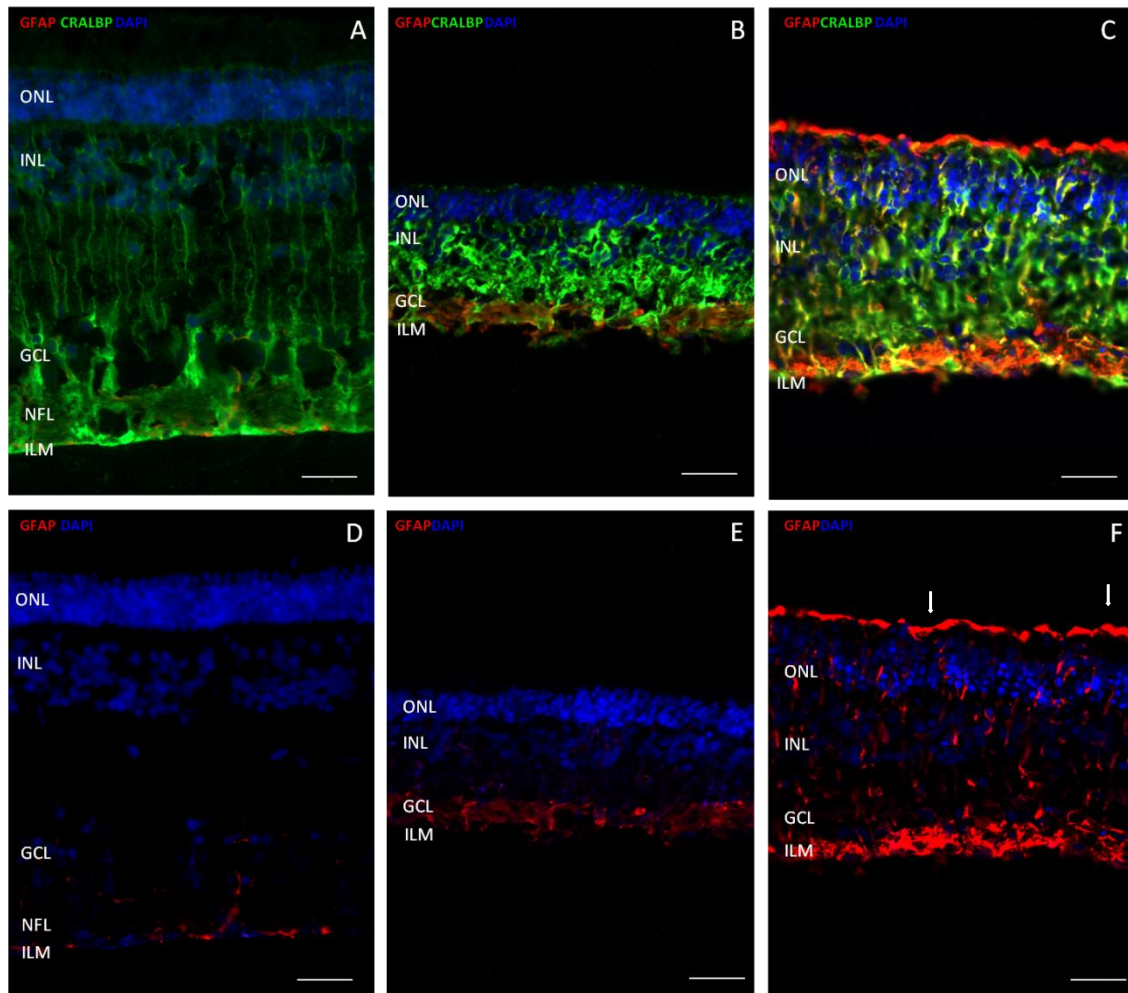


Figura 24: Imágenes de inmunofluorescencia, tomadas a 40 aumentos. A) y D), explante control a tiempo 0. B) y E) explante control de 3 días. C) y F) explante control de 6 días. Expresión de GFAP en rojo, de CRALBP en verde, núcleos celulares contrateñidos con DAPI en azul y barras de escala de 20 μ m. ONL: capa nuclear externa; INL: capa nuclear interna; GCL: capa de células ganglionares; NFL: capa de fibras nerviosas; ILM: membrana limitante interna. Fotografías representativas de 2 experimentos independientes.

5.3.3. Caracterización de los explantes de neurorretina de los diferentes cocultivos durante el tiempo de estudio

Los resultados de las inmunofluorescencias de los explantes de neurorretina de los diferentes cocultivos, se muestran en la figura 25. En todos los casos se observó un aumento progresivo de la expresión de GFAP durante el tiempo de estudio respecto al control a tiempo 0 (figura 23 y figura 24 A y D), al igual que sucedía en los explantes control de 3 y 6 días (figura 24). El marcaje con el anticuerpo primario anti-CRALBP no reveló diferencias importantes respecto a los controles, manteniéndose constante a lo largo del cultivo y abarcando el espesor de la neurorretina en todos los casos. Por otra parte, respecto a los núcleos celulares marcados con DAPI, si se observaron diferencias entre los explantes de los distintos cocultivos y el patrón seguido por los explantes control de 0, 3 y 6 días tanto en su número como en su nivel de organización.

En los explantes del cocultivo de neurorretina con células de EPR de cerdo (NE, figura 25. E-H), se observó una evidente disminución de la expresión de GFAP a los 3 días respecto del explante control para ese tiempo, asemejándose al marcaje visto en la neurorretina control para tiempo 0. A los 6 días de cultivo, aunque también parece existir una reducción en el marcaje GFAP positivo respecto al control para este tiempo, esta disminución no es tan clara como a los 3 días, pudiéndose detectar dicho marcaje para GFAP tanto en prolongaciones que llegan a las capas más externas de la retina, como en las nuevas membranas formadas, similares a membranas subretinianas. En cuanto a la expresión de CRALBP, aunque como ya se ha descrito no existen diferencias importantes con los controles, en el explante de 6 días del cocultivo NE se observó marcaje para esta proteína en la OLM, circunstancia que se había perdido en el control para este tiempo. Finalmente atendiendo a los núcleos celulares, tanto su número como su organización responden a patrones similares a las observadas en los controles.

En los explantes del cocultivo de neurorretina con AT-MSK (NM, figura 25. I-L), se observó un incremento en la expresión de GFAP en las capas más internas de la retina,

tanto a los 3 como a los 6 días respecto de los controles para estos tiempos. Sin embargo en el explante de 6 días de cultivo, las prolongaciones de las células de Müller marcadas, parecen haberse reducido en número y longitud respecto de las que se observaba en el control para este tiempo, y ya no forman nuevas membranas subretinianas GFAP positiva. La expresión de CRALBP a los 6 días de cultivo, al igual que en el cocultivo NE, fue levemente detectada a la altura de la OLM, circunstancia que se había perdido en el control para este tiempo. En cuanto a los núcleos celulares, para los dos tiempos de cultivo se observa un claro aumento del número y de la conservación de su organización, fundamentalmente en las capas ONL e INL, donde los núcleos celulares aparecen mucho más compactados que en los explantes controles para estos tiempos, e incluso se llega a diferenciar la capa de GFL. De este modo, en el cocultivo NM, la estructura interna de la retina parece mantenerse mejor que en los controles.

Por último, en los explantes del cocultivo de neuroretina con AT-MSC y células del EPR (NME, figura 25. M-P), se observó un patrón de distribución de la expresión de GFAP similar a la del cocultivo NM, con un marcado aumento en las capas más internas de la retina respecto de los controles para ambos tiempos de cultivo y una reducción de la longitud de las prolongaciones de las células de Müller GFAP positivas que se extienden hacia las capas más externas de la retina, que de este modo no llegan a formar lo que parecen nuevas membranas subretinianas. La expresión de CRALBP a ambos tiempos de cultivo puede considerarse similar a la de los controles para dichos tiempos. En cuanto a los núcleos celulares, su organización parece disminuir respecto del cultivo NM, principalmente en la INL, sin embargo se sigue observando un mayor número y conservación de los núcleos celulares respecto a los explantes control para los dos tiempos y por tanto un mejor mantenimiento de la estructura interna de la retina.

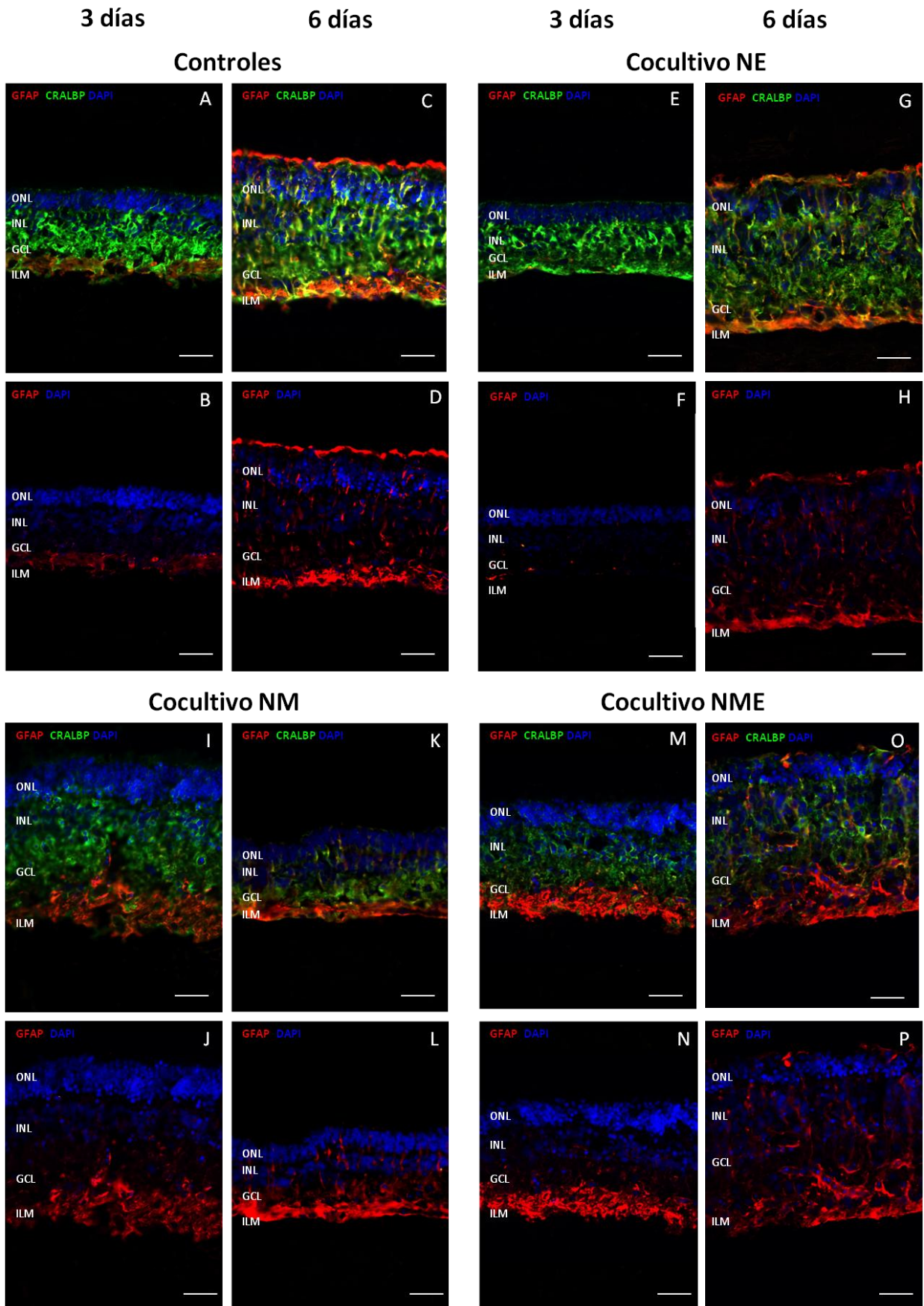


Figura 25: Imágenes de inmunofluorescencia, tomadas a 40 aumentos. A) y B) control de 3 días. C) y D) control de 6 días. E) y F) cocultivo NE a 3 días. G) y H) cocultivo NE a 6 días. I) y J) cocultivo NM a 3 días. K) y L) cocultivo NM a 6 días. . M) y N) cocultivo NME a 3 días. O) y P) cocultivo NME a 6 días. Expresión de GFAP en rojo y de CRALBP en verde, núcleos celulares contrateñidos con DAPI en azul y barras de escala de 20 μm . ONL: capa nuclear externa; INL: capa nuclear interna; GCL: capa de células ganglionares; NFL: capa de fibras nerviosas; ILM: membrana limitante interna. Fotografías representativas de 2 experimentos independientes.

6. DISCUSIÓN

La degeneración tisular, puede considerarse como una de las principales causas de muchas de las enfermedades que en la actualidad aun carecen de tratamiento. Esto adquiere una gran relevancia en patologías degenerativas de la retina, como la DMAE o la retinitis pigmentosa, que son enfermedades con una alta prevalencia y una gran importancia socio sanitaria, ya que afectan a un sentido fundamental como lo es la visión, y que llevan a la ceguera sin que en muchos casos existan tratamientos que frenen esta degeneración tisular. Las terapias avanzadas, concretamente la terapia celular con células madre que puedan regenerar o reparar los tejidos dañados pueden constituir una alternativa a la falta de tratamiento de algunas de estas enfermedades. Por esta razón, en los últimos tiempos se ha producido un crecimiento exponencial de las investigaciones basadas en el desarrollo de estas terapias celulares para la regeneración o la reparación de diferentes tejidos.⁷⁵

Las células madre mesenquimales (MSC), por sus características de baja inmunogenicidad, accesibilidad, facilidad para su expansión *in vitro*, alta capacidad para diferenciarse hacia tipos celulares de diferente origen embriológico, práctica ausencia de problemas éticos derivados de su uso al tratarse de células madre adultas que pueden proceder del propio paciente, y secreción de factores de crecimiento, antiangiogénicos o neurotróficos entre otros^{64-67,76}, las convierten en una opción ideal como estrategia terapéutica para reparar la retina dañada, causa de las enfermedades degenerativas citadas, o al menos para detener o ralentizar este proceso degenerativo.

En este trabajo, se proponía la utilización de MSC, concretamente de las derivadas de tejido adiposo (AT-MSC), para comprobar el efecto de los factores secretados por ellas en un modelo experimental de degeneración retiniana. Se han descrito diferentes modelos animales para el estudio de enfermedades degenerativas de la retina como la DMAE⁴⁴⁻⁴⁶, sin embargo al tratarse de patologías multifactoriales muy complejas y a la existencia de grandes diferencias anatómicas e histológicas entre la retina de mamíferos no primates y la humana, resulta difícil y costoso desarrollar un buen

modelo experimental de estas patologías. Esto junto con las limitaciones éticas que conlleva la utilización de animales de experimentación hizo que se descartase un modelo in vivo para la realización de este trabajo.⁷⁷ Por otra parte, los cultivos o cocultivos celulares clásicos, debido a sus características inherentes, tienen el inconveniente de no ser capaces de simular las interacciones intercelulares que se producen en un tejido,⁷⁸ por lo que tampoco constituían la opción más idónea para la realización de un estudio sobre un órgano tan complejo como la retina. En los cultivos organotípicos sin embargo, a las ventajas de tipo ético y económico que poseen sobre los modelos in vivo, hay que sumarle su mayor capacidad para simular las interacciones y el comportamiento metabólico y fisiológico celular respecto a los cultivos celulares tradicionales.^{56,79,80} Por otra parte, el Grupo de Retina del IOBA posee suficiente experiencia en la utilización de esta clase de modelos, habiendo desarrollado un modelo organotípico de neurorretina porcina que ha demostrado resultados comparables a los de otros desarrollados in vivo, sobre todo en cuanto a modificaciones aparecidas en las capas más externas de la retina a lo largo del tiempo.^{56,81} Por todo esto se decidió utilizar un cultivo organotípico de neurorretina como modelo experimental para el desarrollo de este trabajo.

Como origen animal para este modelo, se eligió el cerdo debido a que el ojo porcino es muy similar al humano, no solo en cuanto a tamaño del globo ocular, sino más importante para nuestros objetivos, en cuanto al tamaño, estructura y ultraestructura de la retina.⁸² Pese a las similitudes con la retina humana, en la retina de cerdo, al igual que en las retinas de los demás mamíferos no primates, no hay una verdadera mácula, aunque si existe una zona central y horizontal en toda la extensión de la retina, por encima del nervio óptico, donde se ha descrito la presencia de una elevada densidad de conos y una densidad de bastones similar a la humana.^{82,83} Como ya se ha comentado en el apartado de material y métodos (página 38), al obtener los explantes de neurorretina utilizados durante este estudio, se intentó evitar la zona más periférica de la retina y se aislaron 3 explantes por retina de 5 x 5 mm cada uno aproximadamente, que se colocaron sobre la membrana del sistema de cultivo

Transwell® en el compartimento superior y con los fotorreceptores dispuestos hacia la membrana, como ha sido descrito por otros autores.⁴⁹

Con el objetivo de dotar a este modelo experimental de una mayor similitud con las condiciones metabólicas que se producirían *in vivo*, se decidió cocultivar indirectamente células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) en el compartimento inferior del sistema Transwell®, en el fondo de los pocillos, generando así una monocapa de EPR cuyos factores secretados pudieran difundir y afectar al explante, pero sin que estas células fuesen capaces de migrar e integrarse en la neurorretina, ya que el tamaño de poro de la membrana del sistema (0,4 µm) no lo permite. Se decidió utilizar células del EPR porcino, en consonancia con lo descrito en el caso de la elección del origen animal del cultivo organotípico de neurorretina, para lo que fue preciso aislarlas de un ojo de cerdo (página 31). El número de células sembradas fue de 30.000 por cm², número suficiente para alcanzar la confluencia del pocillo sembrado al inicio del cocultivo⁵⁵ y que se corresponde con la densidad media de células del EPR que ha sido descrito que existen en una área de retina humana similar al tamaño del explante utilizado en este modelo de cultivo organotípico.¹⁰ En otro set de experimentos se expuso al cultivo celular de EPR de cerdo a peróxido de hidrógeno previamente a su cocultivo con el explante de neurorretina, para de esta forma simular el microambiente existente en el espacio subretiniano de una retina cuyo EPR estuviese alterado a causa del daño oxidativo. El daño oxidativo producido por el tabaco, la luz ultravioleta o la edad, ha sido descrito como una de las causas más relevantes de enfermedades degenerativas de la retina como la DMAE². Precisamente el empleo de peróxido de hidrógeno en lugar de inhibidores de la proliferación como la mitomicina C, se debió a que la acción citotóxica del H₂O₂ es consecuencia directa del estrés oxidativo producido por este sobre las células. Sin embargo puede que hubiera sido más efectivo el empleo de otra molécula que proporcionase un daño oxidativo más constante a lo largo del tiempo y no solo previamente al cocultivo con el explante de neurorretina, como ha sido descrito en el caso de la glucosa oxidasa. Sin embargo, finalmente se decidió recurrir al H₂O₂ debido al inferior coste que supone su adquisición, y a la experiencia previa del Grupo de Retina del IOBA con la utilización de

este compuesto como fuente de estrés oxidativo en células de EPR de la línea celular humana ARPE-19. Para conocer la concentración adecuada de H₂O₂ para células de EPR de cultivo primario de cerdo se realizó un experimento preliminar en el que para una reducción de la viabilidad del 50% y un tiempo de cultivo de 5 horas (parámetros deseables descritos en varias publicaciones⁷²) la concentración óptima seleccionada fue de 400 μM (figura 11).

Finalmente, dentro de los diferentes tipos de MSC que existen se eligieron las AT-MSC debido a su fácil accesibilidad y expansión celular in vitro, y a la amplia experiencia que posee el IOBA y el Grupo de Retina en particular, en su manejo y comportamiento tanto en cocultivo con células de EPR humanas de la línea celular ARPE-19, como con cocultivos con explantes de neurorretina⁵⁵. Teniendo en cuenta esta experiencia, se determinó la utilización de una densidad celular de 30.000 células/cm².

Sin embargo hubo varias dificultades metodológicas para implementar estas células en el modelo organotípico de neurorretina con células del EPR de cerdo, que se iba a utilizar en este estudio. En primer lugar, se pretendía cocultivar indirectamente las AT-MSC con el explante con el objetivo de evaluar las posibles alteraciones que los factores secretados por las AT-MSC pudiesen producir en la neurorretina, pero sin que estas células fuesen capaces de migrar e integrarse en el explante. Por este motivo se decidió situar las AT-MSC en el compartimento inferior del sistema de cultivo Transwell®. Sin embargo no se encontró ningún sistema de cultivo adecuado que permitiese mantener estas células en el compartimento inferior del Transwell®, sin afectar a las células del EPR de cerdo cultivadas en el fondo del pocillo. La solución propuesta fue la de sembrar estas AT-MSC en la parte inferior de la membrana de policarbonato del Transwell®, mientras que los explantes de neurorretina quedarían en la parte superior. Este método de cultivo no ha sido utilizado en cultivos organotípicos de neurorretina, pero ha sido descrito en la literatura para simular distintos tipos de epitelios, como el alveolar o el urinario.^{57,58}

Sembrar las AT-MSc en la parte inferior de la membrana de policarbonato podía suponer la imposibilidad de difusión de los factores secretados por las células de EPR y las AT-MSc hacia la neurorretina, por lo que se llevó a cabo un experimento preliminar para valorar la permeabilidad de esta membrana con y sin células AT-MSc en su superficie. (figura 4). Los resultados de este experimento mostraron una reducción en la difusión de los conjugados de BSA – Tripán azul/hora a través de la membrana con células de entre un 30% a los 3 días de cultivo hasta casi el 60% a los 6 días respecto de la membrana sin células. Sin embargo para ambos casos, la totalidad de los conjugados BSA-Tripan azul habían difundido a las 10 horas, tanto a los 3 como a los 6 días (datos no mostrados), por lo que se consideró una permeabilidad aceptable para el correcto desarrollo del cocultivo.

El otro inconveniente de sembrar las AD-MSc en la membrana de policarbonato del sistema Transwell®, fue la propia opacidad de la membrana, lo que no permitía el seguimiento del cultivo celular microscópicamente, por lo que se realizó un experimento preliminar de proliferación celular, que pretendía evaluar la eficacia de la metodología utilizada para la siembra y cultivo de las AT-MSc sobre esta superficie (figura 15). Los resultados de este experimento demostraron una buena proliferación celular sobre esta superficie con la metodología que se había utilizado para este tipo de cultivo.

Como medio de cultivo para este estudio, se ha utilizado una dilución 1:1 de medio DMEM y Neurobasal A suplementado con un 2% de B-27, un 1% de L-glutamina, penicilina (100 U/ml), streptomina (100 µg/ml), de anfotericina B (2,5 µg/ml), y un 10% de suero fetal bovino. Esta elección ha venido marcada por la idoneidad de utilizar Neurobasal A con B-27 en cultivos neuronales, un 10 % de suero para mantener las células gliales,^{19,50,51} y DMEM para mantener la proliferación y las características propias de las células del EPR. Además, se realizó un experimento preliminar para determinar si la capacidad de proliferación de las células del EPR se veía disminuida con la utilización de este medio, cuyos resultados no solo demostraron que no disminuía, sino que por el contrario se veía significativamente aumentada (figura 10).

Una vez seleccionado el medio, se determinó que los tiempos de estudio serían de 3 y 6 días, teniendo en cuenta que los posibles resultados obtenidos de este trabajo fueran comparables con los tiempos de estudios anteriores del Grupo del IOBA, descartándose tiempos mayores para evitar que hubiese una excesiva desestructuración de la retina que impidiese valorar adecuadamente la existencia de diferencias entre los numerosos cocultivos y controles de este trabajo. Además, a tiempos mayores de 6 días la permeabilidad de las membranas de policarbonato del sistema Transwell® sembradas con células AT-MSc se podía ver comprometida (datos no mostrados).

Por lo tanto a los 3 y 6 días del inicio de los diferentes cocultivos y controles descritos en la tabla 1, se determinó la viabilidad y la proliferación celular de los distintos cocultivos y controles en los que participaron células del EPR de cerdo (figuras 12,13 y 14), con el objetivo de conocer si los factores secretados por las AT-MSc habían alterado la supervivencia o la actividad metabólica de las células del EPR. Esta valoración se realizó mediante el ensayo Alamar Blue® ya que al no ser citotóxico permite la determinación de la viabilidad celular del mismo cultivo a diferentes tiempos, pudiendo elaborar curvas de proliferación. Además se empleó el Viability-cytotoxicity assay kit for live & dead cells® como un segundo método para observar la viabilidad celular a los 6 días.

Según demuestran los resultados, tanto la viabilidad como la proliferación celular de las células EPR no se vió alterada por la sola presencia de células AT-MSc en el cocultivo (ME y ME+H), al contrario de lo que indican otros estudios en los que se describe que las AD-MSc favorecen la proliferación celular de las células de EPR⁵⁵ Sin embargo en estos trabajos el cocultivo fue indirecto mientras que en nuestro caso ambos tipos celulares se encuentran en el mismo compartimento, y se empleó Mitomicina C para detener la proliferación de las células del EPR, mientras que en nuestro caso se ha utilizado H₂O₂.

Tampoco la presencia de las AT-MSC simultáneamente con el explante de neuroretina (NME) favoreció la proliferación de las células de EPR a ninguno de los tiempos. Al contrario, ésta disminuyó significativamente a los 6 días. En los resultados de viabilidad celular se observa como ésta es solo de un 60% respecto de la del control (figura 13). y atendiendo a las imágenes de microscopía de fluorescencia (figura 14) vemos que la distribución de las células del EPR vivas se concentran en la periferia del pocillo, mientras que en el centro prácticamente no quedan células viables. Esto sucedió en todos los experimentos realizados, por lo que es necesaria la revisión de la metodología de cultivo empleada para valorar si el volumen de medio de cultivo utilizado es suficiente para el adecuado mantenimiento de estas células. Sin embargo la proliferación de las células del EPR que habían sido expuestas al daño oxidativo aumentó respecto de su control en este tipo de cocultivo (NME+H) aunque no se refleja así en el estudio de proliferación para el mismo tiempo, por lo que hay que valorar este dato con cautela, y sería necesario realizar nuevos estudios para confirmar esta tendencia.

Por todo esto, el cocultivo de células del EPR con el explante de neuroretina en el que no había células AT-MSC, aumentó significativamente la viabilidad de las células del EPR, tanto a las que se indujo daño oxidativo como a las que no, y su proliferación celular se vio aumentada significativamente respecto de la del control a los 6 días de cultivo. Si bien estos resultados no favorecen la hipótesis de que los factores secretados por las AT-MSC, protejan el EPR, apoyan la idea de que el modelo organotípico de neuroretina se beneficia con la incorporación del EPR, ya que este no solo no degenera o pierde sus características en presencia de la neuroretina si no que su proliferación es mayor que cuando está en monocultivo.

En cuanto a la caracterización de las AT-MSC, se llevó a cabo a nivel proteico por inmunofluorescencia indirecta. Se analizó la expresión de cuatro marcadores diferentes con el objetivo de conocer el estado de diferenciación de estas células tras los diferentes cocultivos. La expresión de la proteína α -SMA, marcador ampliamente utilizado para transdiferenciación hacia fibroblastos, disminuyó significativamente en

todos los cocultivos en comparación con el control, para ambos tiempos de estudio (figura 17). La expresión de Citokeratina 8/18, marcador epitelial, solamente mostró diferencias significativas en el cocultivo del explante de neuroretina con AT-MSC, en los que se apreció un aumento de la expresión (figura 18). Sin embargo, el porcentaje de células que expresaron esta proteína es tan bajo (alrededor de un 3 % de valor promedio) que sería preciso determinar esta expresión mediante otros procedimientos para valorar su relevancia real. En cuanto a la expresión de la Nestina, marcador de células madre neurales, como era de esperar el porcentaje de células positivas fue muy elevado, por encima del 90 % en todos los casos y sin que se encontrasen diferencias significativas entre los distintos cocultivos y controles (figuras 19 y 20). Por último, en la expresión de la Recoverina, marcador de fotorreceptores, solo uno de los cocultivos mostró diferencias significativas con su control, y solo lo hizo a un tiempo de cultivo (6 días) (figura 21). Este cocultivo fue el que combinaba explante de neuroretina, células del EPR y AT-MSC, y el porcentaje de células positivas no alcanzó el 2 % de valor promedio, por lo que al igual que ocurría en el caso de la Citokeratina 8/18, sería necesaria la utilización de otros estudios para comprobar este hecho. Tomados en conjunto estos datos sobre la expresión de los diferentes marcadores proteicos, los resultados sugieren que no existe una diferenciación clara de las AT-MSC presentes en los diferentes cocultivos, hacia ninguno de los linajes celulares probados, aunque ha sido ampliamente descrita su capacidad de diferenciación hacia todos ellos. Los valores significativos que han aparecido en dos de los cocultivos para dos marcadores, son muy bajos (en torno al 2% de valor promedio), por lo que sería necesario el aumento de tiempo de los cocultivos para comprobar esta tendencia. De hecho, la disminución de la expresión del marcador para la α -SMA en todos los cocultivos respecto de los controles puede sugerir que la tendencia de las AT-MSC es hacia un estado más indiferenciado, lo que podría ser de utilidad en procesos terapéuticos que necesiten de factores que las AT-MSC secretasen en este estadio.

Finalmente, se realizó la caracterización inmunohistoquímica del estado de los explantes de neuroretina a lo largo del tiempo de cultivo. Para ello se utilizaron dos anticuerpos primarios, el anti-GFAP y el anti-CRALBP. La GFAP incrementa su expresión

en la gliosis reactiva que se produce en la retina tras la aparición de un proceso patológico^{84,85} mientras que prácticamente no se expresa en las retinas sanas de mamíferos.⁴⁷ Por esta razón, su expresión sirve como patrón del estado de alteración de la retina, por lo que es muy apropiado para nuestro tipo de estudio donde se ha tratado de evaluar el posible efecto que los factores secretados por las AT-MSCs pueden provocar sobre la neurorretina. La proteína GFAP se expresa en las células de Müller en gliosis, pero también lo hace en los astrocitos, por lo que es necesario un segundo marcador que solo se exprese en uno de los dos tipos celulares para poder diferenciarlos, para ello se decidió utilizar el CRALBP que solo se expresa en las células de Müller.^{86,87}

Atendiendo a los resultados de la caracterización inmunohistoquímica realizada tras el tiempo de cultivo, se puede comprobar cómo en los explantes controles, la expresión de GFAP aumenta progresivamente (figura 24). En el control en fresco (0 días), solamente se observa este marcaje en la membrana limitante interna. En el control a 3 días, éste alcanza la membrana limitante externa, y en el control a 6 días forma ya lo que se asemeja membranas subretinianas. Estos resultados son comparables con los de estudios previos llevados a cabo por el Grupo de Retina del IOBA^{19,50,51} así como por otros grupos.^{50,88} No obstante se debe destacar que en el caso del control a 6 días, la gliosis es más marcada en nuestro estudio que en los trabajos mencionados, en los que se ha descrito la aparición de membranas subretinianas en el ojo de cerdo tras 10 días de cultivo organotípico.^{56.}

Las inmunofluorescencias de los diferentes cocultivos (figura 25), revelan una reducción, respecto del control a 3 días, de la gliosis en el explante de neurorretina cocultivado con células del EPR, para ese mismo tiempo de cultivo. Este efecto no se observa en el tiempo de 6 días, donde la expresión de GFAP es similar al del control de 6 días. En los otros 2 cocultivos, en los que hay presencia de AT-MSCs, se observa una mayor expresión de GFAP que en los controles o en el cocultivo de neurorretina y EPR, sin embargo no llegan a desarrollarse membranas similares a las subretinianas y el nivel

de compactación de los núcleos y organización interna de la retina parecen menos alterados que en el caso del cocultivo de neuroretina y EPR a tiempo de 6 días.

Tomados en su conjunto estos resultados sugieren que la presencia de AT-MSK podría estar favoreciendo la gliosis de las células de Müller y por tanto la conservación de la estructura interna de la retina a espensas de una pérdida de su funcionalidad. Por otra parte, con la presencia del EPR disminuye la gliosis de la neuroretina, por lo que la adición de estas células al modelo organotípico de neuroretina ya establecido, podría suponer el desarrollo de un nuevo modelo organotípico más eficaz.

7. CONCLUSIONES

A partir de los objetivos planteados en este trabajo y tras la discusión de los resultados obtenidos se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1- Se ha conseguido poner a punto la metodología necesaria para establecer un cultivo organotípico de neuroretina con la presencia de epitelio en forma de cultivo celular, en el que se han podido cocultivar células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.

2- Se ha comprobado la seguridad de las células madre derivadas de tejido adiposo para el cultivo celular de epitelio pigmentario de la retina porcino. Sin embargo no se ha podido comprobar ningún efecto protector de estas células ni sobre el cultivo celular de epitelio pigmentario de la retina ni sobre el explante de neuroretina.

3- El modelo de cultivo organotípico de neuroretina de cerdo se ha visto favorecido por la presencia del cultivo celular de epitelio pigmentario de la retina.

4- Las células madre derivadas de tejido adiposo han mantenido sus propiedades de células progenitoras y no se han diferenciado hacia ninguno de los tipos celulares estudiados tras el cultivo, habiendo por el contrario disminuido su capacidad de transdiferenciación.

8. LIMITACIONES Y TRABAJO FUTURO

Durante el desarrollo de este trabajo han aparecido diversas limitaciones, entre las que se encuentran:

- La opacidad de la membrana del sistema de cultivo sobre la que se han cultivado las células mesenquimales derivadas de tejido adiposo, ha condicionado tanto el seguimiento del propio cultivo, como la caracterización inmunocitoquímica posterior.
- La variabilidad de las retinas obtenidas de ojos de cerdo, tanto la existente entre retinas pertenecientes a distintos animales como la existente entre distintas zonas de la misma retina, ha impedido comparar algunas características entre explantes, como por ejemplo la variación en su espesor a lo largo del cultivo.
- La disponibilidad de ojos de cerdo ha condicionado tanto el número de experimentos que se han podido llevar a cabo como los duplicados de cada muestra por experimento
- La propia metodología empleada para el establecimiento del sistema de cocultivo ha tenido sus limitaciones, entre las que destacan el reducido volumen de medio que se ha utilizado y la reducción en la permeabilidad de la membrana del sistema de cocultivo Transwell® al ser sembrada con células mesenquimales.

En cuanto al trabajo futuro derivado de las conclusiones preliminares de este estudio, puede encontrarse:

- Aumentar el tamaño muestral de los experimentos llevados a cabo en este trabajo, con el objetivo de obtener resultados más sólidos.

- Aumentar los tiempos de cultivo, fundamentalmente para aclarar si algunas de las tendencias que se han observado en el estado de diferenciación de las células mesenquimales se ratifican a tiempos más largos.

- Evaluar la expresión de los distintos marcadores utilizados en las células mesenquimales derivadas de tejido adiposo de una forma cuantitativa (por western blot o PCR-Real Time).

- Realizar estudios del medio de cultivo en el que se han realizado los diferentes cultivos y del que se han guardado muestras, para identificar y cuantificar los factores presentes.

- Repetir los experimentos encapsulando las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo de manera que el cocultivo sea completamente indirecto.

9. BIBLIOGRAFÍA

- 1- Weiland JD, Cho AK, Humayun MS. Retinal prostheses: current clinical results and future needs. *Ophthalmology*. 2011;118:2227-37.
- 2- Fujihara M, Nagai N, Sussan TE, et al. Chronic cigarette smoke causes oxidative damage and apoptosis to retinal pigmented epithelial cells in mice. *PLoS One*. 2008;3:e3119.
- 3- Zarbin MA. Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol*. 2004;122:598–614.
- 4- Resnikoff S, et al. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organ*. 2004;82:844–851.
- 5- Strauss, O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev*. 2005;85:845-81.
- 6- Kolomeyer AM, Sugino IK, Zarbin MA. Characterization of conditioned media collected from cultured adult versus fetal retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52:5973-86.
- 7- Age-Related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Arch Ophthalmol*. 2001;119:1417-36.
- 8- The Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) Research Group. Lutein + Zeaxanthin and Omega-3 Fatty Acids for Age-Related Macular Degeneration: The Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2013:1-11.
- 9- Sociedad Española de Retina Vítreo (SERV). Tratamiento de la Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE) exudativa. Guía de Práctica Clínica de la SERV. 2009. Recuperado de:
https://www.serv.es/pdf/Guia_SERV_01.pdf.
- 10- Binder S, Stanzel BV, Krebs I, Glittenberg C. Transplantation of the RPE in AMD. *Prog Retin Eye Res*. 2007;26:516-54.
- 11- Binder S, Stolba U, Krebs I, Krugluger W, et al. Transplantation of autologous retinal pigment epithelium in eyes with foveal neovascularization resulting from age-related macular degeneration: a pilot study. *Am J Ophthalmol*. 2002;133:215-25.

- 12- Petrukhin K. New therapeutic targets in atrophic age-related macular degeneration. *Expert Opin Ther Targets*. 2007;11:625–39.
- 13- Bressler NM Age-related macular degeneration is the leading cause of blindness. *JAMA*. 2004;291:1900–1
- 14- European Medicines Agency (EMA). Advanced Therapies. 2013. Recuperado de: http://www.emea.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000294.jsp&mid=WC0b01ac05800241e0.
- 15- Alison MR, Poulosom R, Forbes S, et al. An introduction to stem cells. *J Pathol*. 2002;197:419-23
- 16- Steven Schwartz, MD. Jules Stein Eye Institute-UCLA, California, US. Safety and Tolerability of Sub-retinal Transplantation of hESC Derived RPE (MA09-hRPE) Cells in Patients With Advanced Dry Age Related Macular Degeneration (Dry AMD). Ensayo clinico en fase II. Recuperado de: <http://www.clinicaltrials.gov>
- 17- Zhang K, Hopkins JJ, Heier JS, et al. Ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for treatment of geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:6241-5.
- 18- Limb GA, Daniels JT, Cambrey AD, et al. Current prospects for adult stem cell-based therapies in ocular repair and regeneration. *Curr Eye Res*. 2006;31:381-90.
- 19- Fernandez-Bueno I, Rodriguez de la Rúa E, Pastor JC, et al. Histology and immunochemistry evaluation of autologous translocation of retinal pigment epithelium-choroid graft in porcine eyes. *Acta Ophthalmol*. 2013;91:125-32.
- 20- Liggett TE, Griffiths TD, Gaillard ER. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized bovine retinal pigmented epithelial cell line. *BMC Cell Biol*. 2009;10:33.
- 21- Sonoda S, Spee C, Barron E, et al. A protocol for the culture and differentiation of highly polarized human retinal pigment epithelial cells. *Nat Protoc*. 2009;4:662-73.
- 22- Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007;110:3499-509

- 23- Chamberlain G, Fox J, Ashton B, et al. Concise review: Mesenchymal stem cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007;25:2739-49.
- 24- Vossmerbaeumer U, Ohnesorge S, Kueh S. Retinal pigment epithelial phenotype induced in human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2009;2:177-188.
- 25- Arnhold S, Absenger Y, Klein H, et al. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells rescue photoreceptors cells in the dystrophic retina of the rhodopsin knockout mouse. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245:414-22.
- 26- Nuzzi R, Gunetti M, Rustichelli D, et al. Effect of In Vitro Exposure of Corticosteroid Drugs, Conventionally Used in AMD Treatment, on Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int*. 2012:9460-90.
- 27- Buchholz DE, Pennington BO, Croze RH, et al. Rapid and efficient directed differentiation of human pluripotent stem cells into retinal pigmented epithelium. *Stem Cells Transl Med*. 2013;2:384-93.
- 28- Kicic A, Shen WY, Wilson AS, et al. Differentiation of marrow stromal cells into photoreceptors in the rat eye. *Journal of Neuroscience*. 2003;23:7742–9.
- 29- Inoue Y, Iriyama A, Ueno S, et al. Subretinal transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells delays retinal degeneration in the RCS rat model of retinal degeneration. *Experimental Eye Research*. 2007; 85:234–41.
- 30- Blaber SP, Webster RA, Herbert BR, et al. Analysis of in vitro secretion profiles from adipose-derived cell populations. *J Transl Med*. 2012;10:172-88.
- 31- Tögel F, Weiss K, Yang Y, et al. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;292:F1626-35.
- 32- Rehman J, Traktuev D, Li J, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004;109:1292-8.
- 33- Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, et al. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther*. 2010;1:2.

- 34- De la Rosa O, Lombardo E, Beraza A, et al. Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2009;15:2795-806.
- 35- da Silva Meirelles L, Fontes AM, Covasda DT. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2009;419-27.
- 36- Harper MM, Adamson L, Blits B, et al. Brain-derived neurotrophic factor released from engineered mesenchymal stem cells attenuates glutamate- and hydrogen peroxide-mediated death of staurosporine-differentiated RGC-5 cells. *K*. 2009;89:538-48.
- 37- Lopatina T, Kalinina N, Karagyaour M, et al. Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo. *PLoS One*. 2011;6:e17899.
- 38- Li N, Li XR, Yuan JQ. Effects of bone-marrow mesenchymal stem cells transplanted into vitreous cavity of rat injured by ischemia/reperfusion. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2009;247:503-14.
- 39- MacLaren RE, Buch PK, Smith AJ, Ali RR, et al. CNTF gene transfer protects ganglion cells in rat retinae undergoing focal injury and branch vessel occlusion. *Exp Eye Res*. 2006;83:1118-27.
- 40- Marconi S, Castiglione G, Turano E, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells systemically injected promote peripheral nerve regeneration in the mouse model of sciatic crush. *Tissue Eng Part A*. 2012;18:1264-72.
- 41- Koeberle PD, Bähr M. The upregulation of GLAST-1 is an indirect antiapoptotic mechanism of GDNF and neurturin in the adult CNS. *Cell Death Differ*. 2008;15:471-83.
- 42- Wang SP, Wang ZH, Wang XH, et al. Therapeutic effect of mesenchymal stem cells in rats with intracerebral hemorrhage: reduced apoptosis and enhanced neuroprotection. *Mol Med Report*. 2012;6:848-54.
- 43- Tao W, Wen R, Goddard MB, Sherman SD, et al. Encapsulated cell-based delivery of CNTF reduces photoreceptor degeneration in animal models of retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43:3292-8.

- 44- Cayouette M, Gravel C. Adenovirus-mediated gene transfer of ciliary neurotrophic factor can prevent photoreceptor degeneration in the retinal degeneration (rd) mouse. *Hum Gene Ther.* 1997;8:423–30.
- 45- Wakabayashi K, Nagai A, Yamaguchi S, et al. Transplantation of human mesenchymal stem cells promotes functional improvement and increased expression of neurotrophic factors in a rat focal cerebral ischemia model. *J Neurosci Res.* 2010;88:1017-25.
- 46- Chen J, Zhang ZG, Li Y, et al. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. *Circ Res.* 2003;92:692-9.
- 47- Garcia M, Forster V, Hicks D. Effects of muller glia on cell survival and neuritogenesis in adult porcine retina in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:3735-43.
- 48- Johnson TV, Martin KR. Development and characterization of an adult retinal explants organotypic tissue culture system as an in vitro intraocular stem cell transplantation model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:3503-12.
- 49- Caffé AR, Visser H, Jansen HG, et al. Histotypic differentiation of neonatal mouse retina in organ culture. *Curr Eye Res.* 1989;8:1083-92
- 50- Fernandez-Bueno I, Pastor JC, Gayoso MJ. Müller and macrophage-like cell interactions in an organotypic culture of porcine neuroretina. *Mol Vis.* 2008;14:2148-56.
- 51- Fernandez-Bueno I. Inhibición mediante Adalimumab de la hipertrofia reactiva de las células de müller en un cultivo organotípico de neuroretina porcina. Tesis doctoral. Universidad de León, facultad de Veterinaria, Departamento de Medicina Cirugía y Anatomía Veterinaria, 2011.
- 52- Fernandez-Bueno I, García-Gutierrez MT, Srivastava GK. Adalimumab (tumor necrosis factor-blocker) reduces the expresión of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity increased by exogenous tumor necrosis factor alpha in an organotypic cultura of porcine neuroretina. *Mol Vis.* 2013;6:894-901.
- 53- Koizumi A, Zeck G, Ben Y, et al. Organotypic culture of physiologically functional adult mammalian retinas. *PLoS One.* 2007;2:e221.

- 54- Fernandez-Bueno I, Fernández-Sánchez L, Cuenca N, et al. Time course modifications in organotypic culture of human neuroretina. *Experimental Eye Research*. 2012;114:26-38.
- 55- Singh AK, Srivastava GK, García-Gutiérrez MT, et al. Adipose derived Mesenchymal stem cells partially rescue Mitomycin C treated ARPE19 cells from death in co-culture. *Histol Histopathol*. 2013. (in press).
- 56- Winkler J, Hagelstein S, Rohde M, et al. Cellular and cytoskeletal dynamics within organ cultures of porcine neuroretina. *Exp Eye Res* 2002;74:777-8.
- 57- Rothen-Rutishauser BM, Kiama SG, Gehr P. A three-dimensional cellular model of the human respiratory tract to study the interaction with particles. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005;32:281-9.
- 58- Lehmann AD, Daum N, Bur M, et al. An in vitro triple cell co-culture model with primary cells mimicking the human alveolar epithelial barrier. *Eur J Pharm Biopharm*. 2011;77:398-406
- 59- Ambati J, Ambati BK, Kuziel WA, et al. Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Surv Ophthalmol*. 2003;48: 257–293.
- 60- Spanish Eyes Epidemiological (SEE) Study Group. Prevalence of age-related macular degeneration in Spain. *Br J Ophthalmol*. 2011;95:931-6.
- 61- Gehrs KM, Anderson DH, Johnson LV, et al. Age-related macular degeneration--emerging pathogenetic and therapeutic concepts. *Ann Med*. 2006;38:450-71.
- 62- Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET Jr, et al. VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization Clinical Trial Group. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2004;351:2805-16.
- 63- Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, et al; MARINA Study Group. Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2006;355:1419-31.
- 64- Bunnell BA, Flaatt M, Gagliardi C, et al. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008;45:115-20.

- 65- Kotton DN, Fine A. Derivation of lung epithelium from bone marrow cells. *Cytotherapy*. 2003;5:169-73.
- 66- Doorn J, Moll G, Le Blanc K, et al. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells; paracrine effects and potential improvements. *Tissue Eng Part B Rev*. 2011;13.
- 67- Levkovitch-Verbin H, Sadan O, Vander S, et al. Intravitreal injections of neurotrophic factors secreting mesenchymal stem cells are neuroprotective in rat eyes following optic nerve transection. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:6394-400.
- 68- Bray GA. Medical consequences of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:2583-9.
- 69- Srivastava GK, Reinoso R, Singh AK, et al. Flow cytometry assessment of the purity of human retinal pigment epithelial primary cell cultures. *J Immunol Methods*. 2013;389:61-8.
- 70- Zhang L, Li X, Zhao M, et al. Antisense oligonucleotide targeting c-fos mRNA limits retinal pigment epithelial cell proliferation: a key step in the progression of proliferative vitreoretinopathy. *Exp Eye Res*. 2006;83:1405-11.
- 71-McQuaid KE, Smyth EM, Keenan AK. Evidence for modulation of hydrogen peroxide-induced endothelial barrier dysfunction by nitric oxide in vitro. *European journal of Pharmacology*. 1996;2:236-47
- 72- Wankun X, Wenzhen Y, Min Z, et al. Protective effect of paeoniflorin against oxidative stress in human retinal pigment epithelium in vitro. *Mol Vis*. 2011;17:3512-22.
- 73- Cuenca N, De Juan J, Kolb H. Substance P-immunoreactive neurons in the human retina. *J Comp Neurol*. 1995;356:491-504.
- 74- Cuenca N, Kolb H. Circuitry and role of substance P-immunoreactive neurons in the primate retina. *J Comp Neurol*. 1998;393:439-56.
- 75- Atala A. Tissue engineering and regenerative medicine: Concepts for clinical application. *Rejuvenation Res*. 2004;7:15-31.
- 76- Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells: A new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol*. 2007;28:219-26.

- 77- Agrawal, R.N., et al. In vivo models of proliferative vitreoretinopathy. *Nat Protoc*, 2007;2:67-77.
- 78- Forrester JV, et al, Cellular proliferation in the vitreous: the use of vitreous explants as a model system. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1986;27:1085-94.
- 79- Caffé AR, et al, *Mouse* retina explants after long-term culture in serum free medium. *J Chem Neuroanat*. 2001;22:263-73.
- 80- Engelsberg K, Johansson K, Ghosh F. Development of the embryonic porcine neuroretina in vitro. *Ophthalmic Res*,. 2005; 37:104-11.
- 81- Fisher SK, GP Lewis GP. Müller cell and neuronal remodeling in retinal detachment and reattachment and their potential consequences for visual recovery: a review and reconsideration of recent data. *Vision Research*. 2003;43:887-97.
- 82- Hendrickson A, Hicks D. Distribution and density of medium- and short-wavelength selective cones in the domestic pig retina. *Exp Eye Res*. 2002;74:435-44
- 83- Hebel R. Distribution of retinal ganglion cells in five mammalian species (pig, sheep, ox, horse, dog). *Anat Embryol (Berl)*. 1976;150:45-51.
- 84- Eisenfeld AJ, Bunt-Milam AH, Sarthy PV. Muller cell expression of glial fibrillary acidic protein after genetic and experimental photoreceptor degeneration in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1984;25:1321-8.
- 85- Bringmann A, Reichenbach A. Role of Muller cells in retinal degenerations. *Front Biosci*. 2001;6:72-92.
- 86-! Johnson PT, Geller SF, Lewis GP, et al. Cellular retinaldehyde binding protein in developing retinal astrocytes. *Exp Eye Res* 1997;64:759-66.
87. Guerin CJ, Anderson DH, Fisher SK. Changes in intermediate filament immunolabeling occur in response to retinal detachment and reattachment in primates. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:1474-82.
- 88- Martin DM, Yee D, Feldman EL. Gene expression of the insulin-like growth factors and their receptors in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Brain Res Mol Brain Res*. 1992;12:181-6.

89- Cullen VC, Mackarelb AJ, Hislipb SJ, Clare M. O'Connorb, Alan K. Keenana. Investigation of vascular endothelial growth factor effects on pulmonary endothelial monolayer permeability and neutrophil transmigration. *General Pharmacology*. 2000;35:149-57.

10. ANEXO

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación de células del epitelio pigmentario de la retina. Adaptación de David Williams *et al.* **Página 10**

Figura 2: Esquema representativo de los factores secretados por las MSC así como su función. Adaptación de da Silva Meirelles *et al.*, 2009.³⁶ **Página 15**

Figura 3: Pasos seguidos para el aislamiento de células de epitelio pigmentario de la retina de un ojo de cerdo. **Página 32**

Figura 4: Placa de 6 pocillos empleada para la determinación de la membrana de policarbonato del sistema de cultivo Transwell®. A) Placa con los Transwell dentro de los pocillos, B) Placa lista para ser leída en el espectrofotómetro. **Página 37**

Figura 5: Pasos seguidos para el aislamiento de la neurorretina de un ojo de cerdo. **Página 39**

Figura 6: Pasos seguidos en la siembra de AT-MSc sobre la parte inferior de la membrana de policarbonato del sistema Transwell®. **Página 41**

Figura 7: A) Esquema representativo de los cocultivos y controles realizados por experimento, para 3 y 6 días. B) Esquema del ensamblaje de los cocultivos, en este caso concretamente representa un cocultivo de neurorretina, células de epitelio pigmentario de la retina y AT-MSc (NME). **Página 42**

Figura 8: Fotografías realizadas mediante microscopía de contraste de fases, representativas del aislamiento y cultivo de células del EPR porcino. A) 24 horas (magnificación: 10x), B) 4 días (magnificación: 10x) y C) 7 días (magnificación: 20x), tras su aislamiento a partir de ojos de cerdo, para un número de ojos de n=4. **Página 52**

Figura 9: Valores promedio \pm desviación típica de la viabilidad celular del cultivo primario de EPR de cerdo, a los 3 y 6 días de crecimiento en diferentes medios de cultivo. Experimentos independientes: n=1, triplicado. *(p<0,05). **Página 53**

Figura 10: Proliferación celular del cultivo primario de EPR de cerdo en diferentes medios de cultivo. Se representa el valor promedio \pm la desviación típica de las unidades de fluorescencia obtenidas para cada tiempo en función de las obtenidas a tiempo = 1 día. **Página 54**

Experimentos independientes: n=1, triplicado. * (p<0,05 entre los medios a) y/o b) y el control), # (p<0,05 entre el medio a) y el b)

Figura 11: Valores promedio \pm desviación típica de la viabilidad celular del cultivo primario de EPR de cerdo tras 5 horas de exposición a distintas concentraciones de H₂O₂, siendo el control el cultivo primario de EPR de cerdo sin tratar. Experimentos independientes: n=1, triplicado. *(p<0,05 entre las diferentes concentraciones de H₂O₂ y el control), ** (p<0,01 entre las diferentes concentraciones de H₂O₂ y el control).

Página 55

Figura 12: Proliferación celular del cultivo primario de EPR de cerdo en los diferentes cocultivos (NME, NE, ME, NME+H, NE+H y ME+H; tabla 1). Se muestran los resultados para A) cocultivos sin exposición previa a 400 μ M de H₂O₂ durante 5 horas, y B) cocultivos con exposición previa a 400 μ M de H₂O₂ durante 5 horas. Se representa el valor promedio \pm la desviación típica de las unidades de fluorescencia obtenidas para cada tiempo, en función de las obtenidas a tiempo = 1 día.

Experimentos independientes n=3, triplicado. * (p<0,05). **Página 57**

Figura 13: Valores promedio \pm desviación típica del porcentaje de células viables del cultivo primario de EPR de cerdo tanto en los cocultivos expuestos a H₂O₂ (E+H, NME+H, NE+H y ME+H) como en los que no fueron expuestos a H₂O₂ (NME, NE y ME), respecto del monocultivo de células del EPR de cerdo (control, E). **Página 58**

Experimentos independientes: n=3, triplicado. *(p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001), # (p<0,05 entre cocultivos sin previa exposición a H₂O₂ y el control), ## (p<0,01 entre cocultivos sin previa exposición a H₂O₂ y el control), +(p<0,05 entre cocultivos con previa exposición a H₂O₂ y el E+H), ++p<0,01 entre cocultivos con previa exposición a H₂O₂ y el E+H).

Figura 14: Imágenes representativas del porcentaje de células viables del EPR de cerdo a los 6 días del inicio del estudio (10 campos microscópicos tomados al azar para cada cocultivo). Las células viables aparecen marcadas con fluorescencia verde (calceína) y las células con daños en su membrana celular (muertas) aparecen marcadas con fluorescencia roja (EthD-III). A) células del EPR no expuestas a H₂O₂ en monocultivo (control) y con los diferentes cocultivos (tabla 1). B) células del EPR expuestas a H₂O₂, en monocultivo y con los diferentes cocultivos (tabla 1). **Página 59**

Experimentos independientes: n=3. Magnificación: x10

Figura 15: Proliferación celular del cultivo de AD-MSC sobre una membrana de policarbonato de 0,4 μm de diámetro de poro durante 3 días. Como control se utilizó una membrana de policarbonato de 0,4 μm de poro sin cultivo celular. Se representa el valor promedio \pm la desviación típica de las unidades de fluorescencia obtenidas para cada tiempo en función de las obtenidas por el control a tiempo = 1.

Experimentos independientes: n=3, triplicado. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), # ($p < 0,05$ entre las AD-MSC cultivadas sobre la membrana a día 1 y a día 3 tras la siembra. **Página 61**

Figura 16: Cantidad de BSA difundida en una hora, expresada como valor promedio \pm la desviación típica de la absorbancia a 590 nm, a los 3 y 6 días del cultivo de AD-MSC sobre una membrana de policarbonato de 0,4 μm de poro. Como control se utilizó una membrana de policarbonato de 0,4 μm de poro sin cultivo celular.

Experimentos independientes: n=1, triplicado. * ($p < 0,05$). **Página 62**

Figura 17: Expresión de la proteína α -SMA, detectada mediante inmunofluorescencia, en AD-MSC en diferentes cocultivos (NM, ME y NME; tabla 1) y en monocultivo (como control). A) Resultados expresados como valor medio \pm desviación típica del porcentaje de células positivas, obtenidos a partir del conteo al azar de 5 campos microscópicos tomados a 10 aumentos. B) Imágenes de inmunofluorescencia, marcaje positivo en verde y núcleos celulares contrateñidos con DAPI en azul. Fotografías representativas de 2 experimentos independientes tomadas a 20 aumentos a los 6 días del inicio de los cultivos. Se utilizó un cultivo de fibroblastos, como control positivo.

Experimentos independientes: n=2. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$). **Página 64**

Figura 18: Expresión de la proteína Citokeratina 8/18, detectada mediante inmunofluorescencia en AD-MSC en diferentes cocultivos (NM, ME y NME; tabla 2) y en monocultivo como control. A) Resultados expresados como valor medio \pm desviación típica del porcentaje de células positivas, obtenidos a partir del conteo al azar de 5 campos microscópicos tomados a 10 aumentos. B) Imágenes de inmunofluorescencia, marcaje positivo en verde y núcleos celulares contrateñidos con DAPI en azul. Fotografías representativas de 2 experimentos independientes tomadas a 20 aumentos a los 6 días del inicio de los cultivos. Se utilizó la línea celular humana de EPR, ARPE-19, como control positivo. **Página 66**

Experimentos independientes: n=2. *($p < 0,05$).

Figura 19: Expresión de la proteína Nestina, detectada mediante inmunofluorescencia, en AD-MSC en diferentes cocultivos (NM, ME y, NME; tabla 2) y en monocultivo como control. Resultados expresados como valor medio \pm desviación típica del porcentaje de células positivas, obtenidos a partir del conteo al azar de 5 campos microscópicos tomados a 10 aumentos. **Página 67**

Figura 20: Imágenes de inmunofluorescencia, detección positiva de la proteína Nestina en verde y núcleos celulares contrateñidos con DAPI en azul. Fotografías representativas de 2 experimentos independientes, tomadas a 20 aumentos a los 6 días del inicio de los cultivos. Se utilizó un cultivo primario de CBPC de cerdo como control positivo. **Página 68**

Figura 21: Expresión de la proteína Recoverina, detectada mediante inmunofluorescencia, en AT-MSC en diferentes cocultivos (NM, ME y, NME; tabla 1) y en monocultivo como control. Resultados expresados como valor medio \pm desviación típica del porcentaje de células positivas, obtenidos a partir del conteo al azar de 5 campos microscópicos tomados a 10 aumentos.

Experimentos independientes: n=2. *($p < 0,05$). **Página 69**

Figura 22: Imágenes de inmunofluorescencia, marcaje con Recoverina en verde y núcleos celulares contrateñidos con DAPI en azul. Fotografías representativas de 2 experimentos independientes, tomadas a 20 aumentos a los 6 días del inicio de los cultivos. Se utilizó un corte transversal de 5 μm de espesor de un explante de neurorretina de cerdo, como control positivo (fotografía tomada a 60 aumentos).

Página 70

Figura 23: Imágenes de inmunofluorescencia, tomadas a 40 aumentos, del explante de neurorretina procesado inmediatamente tras su aislamiento de un ojo de cerdo (control a tiempo 0). A) y B), expresión de GFAP en rojo. A) expresión de CRALBP en verde. C) Expresión de recoverina en verde. En todas las imágenes núcleos celulares contrateñidos con DAPI en azul y barras de escala de 20 μm . OS: capa de segmentos externos; ONL: capa nuclear externa; INL: capa nuclear interna; GCL: capa de células ganglionares; NFL: capa de fibras nerviosas; ILM: membrana limitante interna. Fotografías representativas de 2 experimentos independientes. **Página 72**

Figura 24: Imágenes de inmunofluorescencia, tomadas a 40 aumentos. A) y D), explante control a tiempo 0. B) y E) explante control de 3 días. C) y F) explante control de 6 días. Expresión de GFAP en rojo, de CRALBP en verde, núcleos celulares contrateñidos con DAPI en azul y barras de escala de 20 μm . ONL: capa nuclear externa; INL: capa nuclear interna; GCL: capa de células ganglionares; NFL: capa de fibras nerviosas; ILM: membrana limitante interna. Fotografías representativas de 2 experimentos independientes. **Página 73**

Figura 25: Imágenes de inmunofluorescencia, tomadas a 40 aumentos. A) y B) control de 3 días. C) y D) control de 6 días. E) y F) cocultivo NE a 3 días. G) y H) cocultivo NE a 6 días. I) y J) cocultivo NM a 3 días. K) y L) cocultivo NM a 6 días. . M) y N) cocultivo NME. **Página 76**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Cocultivos y controles empleados en la ejecución del estudio. Los tiempos de cultivo fueron de 3 y 6 días, excepto para el explante de neurorretina en fresco (control N a 0 días). **Página 29.**

Tabla 2: Medios de cultivo utilizados durante la realización del estudio. **Página 30.**

Tabla 3: Anticuerpos utilizados en las inmunofluorescencias de las AT-MS. **Página 44.**

Tabla 4: Anticuerpos utilizados en las inmunofluorescencias de los cortes de los explantes de neurorretina. **Página 47.**