



Universidad de Valladolid



Master en Investigación en Ciencias de la Visión

2016-2017

Universidad de Valladolid

Trabajo de Fin de Master

EVALUACIÓN DE LA SECRECIÓN DE FACTORES NEUROTRÓFICOS POR LAS CELULAS MSV EN COCULTIVO CON NEURORETINAS PORCINAS, EN FUNCIÓN DE LA DOSIS CELULAR Y DEL TIEMPO DE CULTIVO

Andrés Eduardo Valisena

Directores

Dra. Rosa María Coco Martín

Dr. Iván Fernández Bueno



Universidad de Valladolid



COMISION DE INVESTIGACION

Dña. M^a Paz García García como **Secretaria de la Comisión de Investigación** del Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA) de la Universidad de Valladolid,

CERTIFICA

Que el proyecto de TFM “EVALUACIÓN DE FACTORES NEUOTRÓFICOS SECRETADOS POR CELULAS MSV EN COCULTIVO CON NEURORETINA PORCINA, EN FUNCIÓN DE LA DOSIS CELULAR Y DEL TIEMPO DE CULTIVO” del alumno **Andres Valisena** con número de registro: 015/2017, ha sido revisado en la última reunión de la Comisión de Investigación de 9 de marzo de 2017.

Y para que así conste expido el presente certificado.

En Valladolid, a 14 de marzo de 2017

Fdo.: M^a Paz García García
Secretaria de la Comisión de Investigación



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

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

Dña. ROSA MARÍA COCO MARTÍN y D. IVÁN FERNÁNDEZ BUENO en calidad de Tutores del alumno D. Andrés Eduardo Valisena, del Máster en Investigación en Ciencias de la Visión del Curso académico 2016/2017.

CERTIFICAN haber leído la memoria del Trabajo de Fin de Máster titulado "EVALUACIÓN DE LA SECRECIÓN DE FACTORES NEUROTRÓFICOS POR LAS CELULAS MSV EN COCULTIVO CON NEURRETINAS PORCINAS, EN FUNCIÓN DE LA DOSIS CELULAR Y DEL TIEMPO DE CULTIVO" y estar de acuerdo con su exposición pública en la convocatoria de julio

En Valladolid a 11 de julio de 2017

Vº Bº

Fdo.: Rosa María Coco Martín

Vº Bº

Fdo.: Iván Fernández Bueno

Los Tutores

Agradecimientos

- Al Grupo de Retina del IOBA y, en especial, a Sonia Labrador Velandia, Salvatore Di Lauro, Sara Crespo Millas, Maite García Gutiérrez y Nieves Fernández Alonso sin los cuales todo este trabajo no hubiera sido posible.

- A mis tutores, Dr. Iván Fernández Bueno y Dra. Rosa Coco Martín que me han apoyado y guiado.

INDICE

ABREVIATURAS	4
RESUMEN	5
1-INTRODUCCIÓN	6
1.1 MODELO DE CULTIVO ORGANOTÍPICO	6
1.2 ENFERMEDADES DEGENERTIVAS DE LA RETINA	8
1.3 TERAPIA CELULAR MEDIANTE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSCs)	8
2- JUSTIFICACIÓN.....	10
3- HIPÓTESIS	11
4- OBJETIVOS	11
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	11
4.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
5- MATERIAL Y MÉTODOS	12
5.2 CULTIVOS CELULARES	12
5.2.1 CÉLULAS MSV	12
5.2.2 DOSIS CELULARES	13
5.3 OBTENCIÓN DE LOS EXPLANTES DE NEURORRETINA DE CERDO	14
5.4 PREPARACIÓN DE LAS PLACAS DE CULTIVO	16
5.5 CUANTIFICACIÓN DE LOS FACTORES NEUROTRÓFICOS	17
5.6 ANALISIS ESTADÍSTICO	18
6- RESULTADOS	19
6.1 CUANTIFICACIÓN DE FACTORES NEUROTRÓFICOS CON DOSIS CELULAR DE 15.000 CELULAS POR POCILLO	19
6.2 CUANTIFICACIÓN DE FACTORES NEUROTRÓFICOS CON DOSIS CELULAR DE 30.000 CELULAS POR POCILLO:.....	22
6-3 COMPARACIÓN DE DOSIS BAJA CON DOSIS ALTA	26
7- DISCUSIÓN.....	27
7.1- ELECCIÓN DE UN MODELO DE CULTIVO ORGANOTÍPICO DE NEURORRETINA PORCINA.	27
7.2 DISCUSIÓN DEL MATERIAL Y MÉTODO	28
7.3 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	29
8- CONCLUSIONES	31
9- BIBLIOGRAFÍA.....	32

ABREVIATURAS

- BDNF: *Brain derived neurotrophic factor* (factor neurotrófico derivado del cerebro)
- bFGF: *basic Fibroblast Growth Factor* (Factor de crecimiento de fibroblastos básico)
- CNTF: *Ciliary neurotrophic factor* (Factor neurotrófico ciliar)
- DMAE: Degeneración macular asociada a la edad
- DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Medio eagle modificado por Dulbecco)
- DR: Desprendimiento de retina
- ESCs: *Embryonic stem cells* (células madre embrionarias)
- GMP: *Good Manufacturing Practice* (Buenas prácticas de fabricación)
- GDNF: *Glial derived neurotrophic factor* (factor neurotrófico derivado de la glia)
- IBGM: Instituto de Genética y Biología Molecular.
- IGF-1: *Insulin-like Growth Factor 1* (Factor de crecimiento insulínico tipo 1)
- iPSCs: *Induced pluripotent stem cells* (células madre pluripotentes inducidas)
- M: Medio
- MSCs: *Mesenchymal stem cells* (Células madre mesenquimales)
- MSVs: *Mesenchymal Stem from Valladolid* (Células madre mesenquimales de Valladolid)
- NGF: *Nerve growth factor* (factor de crecimiento neural)
- NR: Neurorretina
- RP: Retinitis Pigmentosa
- SEM: *Standard Error of the Mean* (Error estándar de la media)

RESUMEN

Introducción: Distintas enfermedades degenerativas de la retina como la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), la retinitis pigmentosa (RP) y el desprendimiento de retina (DR) entre otras patologías, no poseen tratamientos del todo efectivos en la actualidad. Las terapias avanzadas, concretamente las basadas en células madre, buscan ofrecer diferentes opciones terapéuticas en este tipo de enfermedades. Una de las aplicaciones principales de estas células se basa en su potencial de secretar de forma paracrina, factores neuroprotectores capaces de enlentecer la degeneración de los fotorreceptores y otras células nerviosas retinianas. Sin embargo se desconoce con detalle de qué forma son secretados estos factores y las múltiples variables que pueden influir en su secreción.

Propósito: Analizar si la secreción de factores neurotróficos por parte de las células madre mesenquimales MSV 15-007 en co-cultivo con neurorretinas porcinas varía en función de la dosis celular y del tiempo de co-cultivo.

Métodos: Estudio de investigación preclínico, prospectivo y analítico en el que a partir de 6 ojos de cerdo se obtuvieron 12 explantes de neurorretina porcina procedentes del área centralis, 6 de los explantes se cocultivaron con células madre mesenquimales MSV 15-007 a una dosis de 15.000 y 30.000 cels/pocillo respectivamente y 6 sirvieron como control. Al finalizar, se cuantificó mediante ensayos de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), la secreción de los factores neurotróficos BDNF, NGF y CNTF a las 48, 96 y 144 horas y se analizaron sus variaciones en el tiempo.

Resultados: Las variaciones con respecto a la secreción de los factores BDNF y NGF en el tiempo no mostraron valores significativos. En cuanto al BDNF se observó que las células cocultivadas con neurorretinas mostraron una concentración que fue superior al resto de condiciones estudiadas en ambas dosis celulares, siendo mayor de forma estadísticamente significativa en la dosis celular de 30.000cel/pocillo. la cantidad de NGF producido por las MSV cultivadas de forma aislada fue similar a la cantidad producida por las MSV cocultivadas con neurorretinas. Esta similitud se observó en ambas dosis celulares, con ligeras variaciones en el tiempo que no llegaron a la significación estadística. Los resultados del factor CNTF no fueron concluyentes.

Conclusiones: Las MSV cocultivadas *in vitro* con o sin NR son capaces de secretar factores neurotróficos tales como el BDNF, el NGF y el CNTF implicados en la supervivencia de las células retinianas en degeneración, , por tanto, las MSV pueden ser potencialmente eficaces como terapia neuroprotectora en patologías relacionadas con la degeneración retiniana.

1-INTRODUCCIÓN

1.1 MODELO DE CULTIVO ORGANOTÍPICO

Los cultivos organotípicos de retina son modelos tisulares in vitro que fueron descritos hace casi un siglo. Este tipo de cultivos empezó a utilizarse en el año 1926 por Strangeways y Fell quienes realizaron cultivos de retina a partir de ojos embrionarios de pollo, y han ido evolucionando desde entonces. En la actualidad se considera como "gold standard" el modelo propuesto en 1989 por Caffé et al. (1) Quienes describen por primera vez el cultivo de explantes de neuroretina sobre membranas poliméricas porosas, cultivados con los fotorreceptores en contacto con la membrana, que se ha convertido en el método más utilizado actualmente para el cultivo de neuroretinas. Los cultivos de explantes de neuroretina tienen la peculiaridad de reproducir las dinámicas funcionales neuroretinianas, basadas en la interacción entre las diferentes células que constituyen este tejido complejo. Por esta razón, el cultivo organotípico de retina neural resulta ser superior a los cultivos de células disociadas, en los cuales tales dinámicas están ausentes (2). Por ello, estos modelos permiten el ensayo de eficacia de medicamentos y de toxicidad farmacológica (3), el estudio de los efectos de moléculas, como los factores de crecimiento (4), y de cocultivos con células madre, de una forma más cercana a los procesos in vivo.

1.2 ENFERMEDADES DEGENERATIVAS DE LA RETINA

Como antes se apuntaba, la retina es un tejido complejo compuesto por diferentes capas y membranas interconectadas. Estas capas están constantemente en comunicación por distintos estímulos fisicoquímicos para lograr mantener su homeostasis y así su funcionamiento normal (5). Cualquier alteración en la relación entre estas capas es el origen de procesos de degeneración celular o de mecanismos de proliferación aberrante que impiden su correcto funcionamiento (5), lo que origina el desarrollo de diversas patologías retinianas, como la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), la

retinitis pigmentosa (RP) y el desprendimiento de retina (DR), entre otras. En estas enfermedades, las células de la retina responden activando y modificando diferentes rutas metabólicas, produciendo alteraciones moleculares que generan cambios en la función y morfología de estas células, obteniendo, en consecuencia, disfunción retiniana, acompañada en la gran mayoría de los casos de una evidente alteración de la estructura de la retina (6). Un mejor conocimiento de los procesos de remodelado que se llevan a cabo en estas diferentes enfermedades podría ser útil tanto para hacer razonamientos diagnósticos y pronósticos más certeros, como para aplicar mejores estrategias terapéuticas para mantener la función visual (6). Se han descrito distintas fases de degeneración retiniana para intentar estandarizar de forma apropiada la relación entre los cambios morfológicos y el estado de degeneración de la retina en cada una de las enfermedades. Estas se extienden desde la fase inicial donde no se observan alteraciones morfológicas ni funcionales en la retina pero los fotorreceptores bajo diferentes tipos de estrés como disrupción del epitelio pigmentario de la retina en la DMAE, alteraciones a nivel genético en la RP, o niveles elevados de glucosa en el DR, inician una cascada de eventos que conllevan a la muerte de los fotorreceptores, y que en fases más tardías producen un reordenamiento anómalo de los circuitos de conexión celular que genera la pérdida de la función visual (6).

La DMAE es una enfermedad multifactorial que está asociada con diversos factores genéticos y ambientales. Estudios de asociación de genoma completo han detectado una gran cantidad de locus y variantes genéticas de riesgo (7). Las variantes más comunes se encontraron en genes pertenecientes al sistema del complemento y del sistema inmune (7). Por este motivo la progresión de la degeneración retiniana en esta enfermedad se asocia a una desregulación de los componentes de la inflamación y de la respuesta inmune.

Otra enfermedad en donde se observa una importante degeneración retiniana es la retinitis pigmentosa (RP). La RP se caracteriza por una degeneración de fotorreceptores, pero mayoritariamente de conos, produciendo disminución de agudeza visual nocturna y pérdida progresiva del campo visual periférico en etapas tempranas, que avanza

progresivamente hacia el polo posterior de la retina, produciendo visión en “túnel” y disminución de la agudeza visual en etapas más avanzadas (8). Esta enfermedad tiene un componente genético y hereditario muy heterogéneo con aproximadamente 260 genes y 4500 mutaciones identificadas hasta el momento, y puede ser heredada de forma autosómica recesiva en 50-60% de los casos, autosómica dominante 30-40% de los casos y ligada a X en 5-15% de los casos aproximadamente (9). Las mutaciones se pueden encontrar en genes que codifican proteínas para una amplia variedad de procesos celulares, incluyendo, proteínas involucradas en la fototransducción, en el metabolismo de la vitamina A y procesos de fagocitosis, entre otros (9). Independientemente del gen afectado, los déficits de visión se deben a la degeneración de los fotorreceptores a través de mecanismos de apoptosis, aunque los mecanismos de acción varían.

El desprendimiento de retina (DR) se produce por la separación de la retina neurosensorial y del EPR . La forma más frecuente, denominada regmatógena, se origina por la formación de un desgarro retiniano que crea una vía de acceso al espacio subretiniano por la cual el vítreo se introduce entre la neurorretina y el EPR, lo que da lugar a la separación de estas dos estructuras. Así, se reconoce claramente que la degeneración de los fotorreceptores tras el DR, tanto por necrosis como por apoptosis, es un evento fundamental para la pérdida de agudeza visual, así como otras modificaciones celulares que afectan significativamente a la recuperación funcional tras un DR (6).

1.3 TERAPIA CELULAR MEDIANTE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSCs)

Las terapias avanzadas, concretamente la terapia celular mediante el empleo de células madre mesenquimales, han demostrado resultados prometedores, basados en el retraso o estabilización de la degeneración de las células retinianas. Estas células madre adultas y pluripotentes, son fácilmente accesibles y carecen de los problemas éticos que se dan en otros tipos de células madre como las embrionarias (ESCs) o las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) (10). Además existe la posibilidad de tratar al paciente de

una forma autóloga evitando así un posible rechazo inmunológico. Dentro de las posibles aplicaciones de las MSCs existen dos vertientes. La primera es terapia regenerativa basada en el reemplazo de las células retinianas lesionadas mediante MSCs, previamente diferenciadas a tejido retiniano, que ha sido propuesta como tratamiento de enfermedades degenerativas de la retina, y parece tener un futuro prometedor, aunque todavía quedan muchos inconvenientes por superar. Un problema importante es lograr células totalmente diferenciadas para el reemplazo celular y que estas lleguen a interconectarse con el resto de células presentes en la retina. La segunda se basa en otra de las propiedades de las MSCs, de gran interés para su aplicación en patologías retinianas, que es su capacidad de secretar, de forma paracrina, ciertos factores neurotróficos como el *Ciliary Neurotrophic Factor* (CNTF), el *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF), el *Insulin-like Growth Factor 1* (IGF-1), el *Nerve Growth Factor* (NGF), el *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) y el *Glial Derive Neurotrophic Factor* (GDNF) (11). Estos factores neuroprotectores han sido capaces de enlentecer la degeneración retiniana en modelos animales de ratón, conejo y cerdo (11). Sin embargo, estos factores son proteínas de vida media corta que no permanecen en contacto con la retina el tiempo suficiente como para lograr el efecto inmunomodulador y antiapoptótico deseado al ser inyectados de forma intravítrea por lo que esta aproximación ha sido desestimada (11). Por este motivo actualmente ha surgido una nueva estrategia en estudio que consiste en la implantación de MSCs encapsuladas capaces de producir estos factores por tiempos más prolongados (11). De esta forma se están estudiando las posibles aplicaciones de esta terapia en diferentes enfermedades degenerativas retinianas como son la DMAE, la RP, y patologías del nervio óptico entre otras.

2- JUSTIFICACIÓN

En esta área de trabajo, el Grupo de Retina del IOBA ha determinado que las MSCs en cocultivo con neuroretina de cerdo, son capaces de producir factores neurótróficos, como el CNTF y el BDNF, esenciales, para el normal desarrollo de las células ganglionares de la retina. En concreto en este estudio se emplearon células madre MSV, obtenidas a partir de células mesenquimales alogénicas, reexpandidas “ex vivo” mediante procedimientos GMP (*Good Manufacturing Practice*), y fabricadas como producto en fase de investigación (PEI Nº 15-007) por el Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM) de la Universidad de Valladolid.

No obstante, para poder aplicar estas células en seres humanos enfermos es necesario conocer en profundidad la potencial secreción de otros factores neurotróficos relacionados con el mantenimiento de las células retinianas, así como los niveles de estos factores secretados en función de la dosis celular y del tiempo de contacto con las neuroretinas. En este caso, se evaluó específicamente si la posible secreción paracrina por parte de las células MSV de los factores BDNF y CNTF cambia con la variación de la dosis celular utilizada (15.000 y 30.000 cels/pocillo) respectivamente y en tiempos de estudio específicos de 48, 96 y 144 horas. Además, se añadió el análisis de un nuevo factor, el NGF, una neurotrofina que promueve la regeneración axonal al unirse a receptores tirosin-kinasa A,B y C (12). Estos receptores actúan como ligandos inhibitorios derivados de la degeneración de la mielina y del tejido cicatricial que aparecen tras lesiones en el SNC e inducen una respuesta mediada por receptor que desencadena el colapso del cono de crecimiento del axón en regeneración tras una lesión (12).

El conocimiento en mayor profundidad del comportamiento de la secreción de estos factores, por parte de las MSV, podría permitir futuras aplicaciones terapéuticas, de forma efectiva, en diferentes enfermedades como la DMAE y la RP, y en otras degenerativas de la retina que comparten mecanismos fisiopatológicos similares, podrían beneficiarse de las propiedades inmunomoduladoras, antiapoptóticas y neuroprotectoras que poseen estas células.

3- HIPÓTESIS

La secreción de factores neurotróficos por parte de las células madre mesenquimales MSV 15-007 en co-cultivo con neuroretinas porcinas varía en función de la dosis celular y del tiempo de co-cultivo.

4- OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la producción de factores neurotróficos por parte de las células MSV (PEI 15-007) en cocultivo con neuroretinas porcinas en función de la dosis celular y del tiempo de cocultivo.

4.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar los niveles de BDNF, CNTF y NGF secretados por parte de las células MSV en co-cultivo con neuroretinas porcinas a las dosis de 15.000 y 30.000 células/pocillo.
- b) Determinar los niveles de BDNF, CNTF y NGF secretados por parte de las células MSV en co-cultivo con neuroretinas porcinas a los 2, 4 y 6 días de cultivo.

5- MATERIAL Y MÉTODOS

Para su desarrollo, se utilizaron 6 ojos de cerdos, entre 6 y 8 meses de edad, procedentes del matadero local Justino Gutiérrez S.L. (Laguna de Duero, Valladolid, España). Los ojos se recogieron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco®, Paisley, Reino Unido), suplementado con 10% de antibióticos/antimicóticos (100 U/ml de Penicilina, 100 µg/ml de Estreptomicina y 2,5 µg/ml de Anfotericina B, Gibco®, Invitrogen, Paisley, UK), con el fin de reducir el riesgo de contaminación. Los ojos fueron trasladados refrigerados hasta el Laboratorio de Cultivos Celulares del IOBA donde se procedió con el protocolo de obtención de los explantes de neurorretina y la preparación del cocultivo. El tiempo transcurrido entre la muerte del animal/enucleación de los ojos hasta su procesamiento en el laboratorio se limitó a un máximo de 2 horas, con el fin de reducir la degeneración precoz de las células retinianas por falta de soporte nutricional tras la muerte del animal.

5.2 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).

5.2.1 CÉLULAS MSV

El IBGM de la Universidad de Valladolid proporcionó las células MSV frescas a una concentración de 1×10^6 cels/ml en 1,5 ml de medio DMEM suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina y 10% de suero fetal bovino (FBS). En concreto se emplearon células:

- PEI: 15-007 MSV (Mesenchymal Stem from Valladolid).
- Genotipo: XY (fenotipo varón) o XX (fenotipo mujer)

Fases de obtención de las células MSV:

- Aislamiento de células mononucleadas procedentes de médula ósea.

- Expansión “in Vitro”
- Pases (Tripsinización)
- Expansión “in Vitro”
- Proceso final
- Envasado

5.2.2 DOSIS CELULARES

Las células fueron cultivadas y expandidas en dos dosis (15.000/pocillo o 1562,5 células/cm² y 30.000/pocillo o 3.125 células/cm²) durante 72 horas previamente a su utilización. El proceso de expansión se realizó directamente en placas de cultivo Transwell® con medio DMEM suplementado con 10 % de FBS, 1% de antibiótico y 1% de L-Glutamina, todo Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.

El proceso de cultivo de las células MSV se realizó de la siguiente manera:

- Se recibieron 1×10^6 cels contenidas en 1ml de medio DMEM suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina y 10% de SFB.
- Se procedió a su conteo y a determinar su viabilidad mediante el empleo del ensayo de Azul Tripan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) en una cámara de Neubauer.
- Bajo una campana de flujo laminar (Faster-BHN, 2004, Cultek, Madrid, España) se resuspendieron las células en 10 ml de medio DMEM suplementado con 1% de antibiótico y 10% de FBS.
- Se sembraron dos dosis celulares de 15.000 y 30.000 células en cada pocillo de las placas de cultivo Transwell® y se mantuvieron en incubadora a 37°C y 5% de CO₂ durante 72 horas antes del inicio del cocultivo con las neuroretinas.
- Al finalizar el cocultivo, las MSV fueron fijadas con metanol frío (Panreac Química S.A.U., Barcelona, España) durante 15 minutos a 4°C y posteriormente guardadas a -80°C para futuros experimentos.

5.3 OBTENCIÓN DE LOS EXPLANTES DE NEURORRETINA DE CERDO

Dentro de la campana de flujo laminar se colocó el globo ocular en una placa de Petri (90 mm; Corning, NY, EE. UU.) con Betadine® (MEDA Pharma S.A., Madrid, España) y se limpiaron los restos de tejidos extraoculares (parpados, conjuntiva, capsula de Tenon, músculos y grasa orbitaria).

Bajo una campana de flujo laminar (Faster-BHN, 2004, Cultek, Madrid, España) se lavó cada globo ocular en Betadine® (2 minutos), etanol 70% (2 minutos) y DMEM suplementado con 10% de antibiótico/antimicótico (3 lavados de 5 minutos).

Se colocó el globo ocular en una placa de Petri con medio DMEM suplementado con un 10% de antibiótico/antimicótico y se perforó el globo ocular con una aguja estéril de 22G, a través de la esclera y a la altura de la ora serrata, para realizar un ojal por el que poder introducir unas tijeras corneales que permitieron hacer la disección del globo ocular en segmento anterior y posterior. (FIG 1-A).

Se retiró por tracción el segmento anterior y se arrastró con él al vítreo. En algunos casos fue necesario ayudarse con un bastoncillo de algodón estéril para eliminar los restos de vítreo fuertemente adheridos a la retina periférica.

Se colocó el segmento posterior en una placa de Petri con medio DMEM suplementado con 10% de antibiótico/antimicótico limpios.

Se realizó un desprendimiento mecánico de la retina neural con la ayuda de un pincel y mediante el paso de medio de cultivo DMEM entre la neurorretina y el EPR, con el fin de reducir los tiempos de manipulación retiniana y el posible daño mecánico resultante de la manipulación directa de la retina. (FIG 1-B,C).

Se identificó el área centralis y se recortaron dos explantes cuadrados y adyacentes, de (5x5 mm), aproximadamente 1 mm por encima del nervio óptico, evitando la presencia de vasos visibles y de bordes irregulares (FIG 2). Para ello, se emplearon unas tijeras de

Vannas (John Weiss International, Milton Keynes, Reino Unido) unos pinceles y una espátula metálica de bordes romos (4x4 mm).

Se colocaron los explantes sobre la espátula metálica, con ayuda de un pincel, y se depositaron sobre la membrana de los pocillos de las placas de cultivo Transwell® (Pore polycarbonate membrane insert, 0.4 μm de poro, 24 mm de diámetro; Corning Inc., Corning, NY, EE.UU.) de modo que la membrana limitante interna quede en contacto con ésta y que no se formen pliegues en los explantes, con el objetivo de conseguir un contacto apropiado con la membrana (FIG 1-F,E).

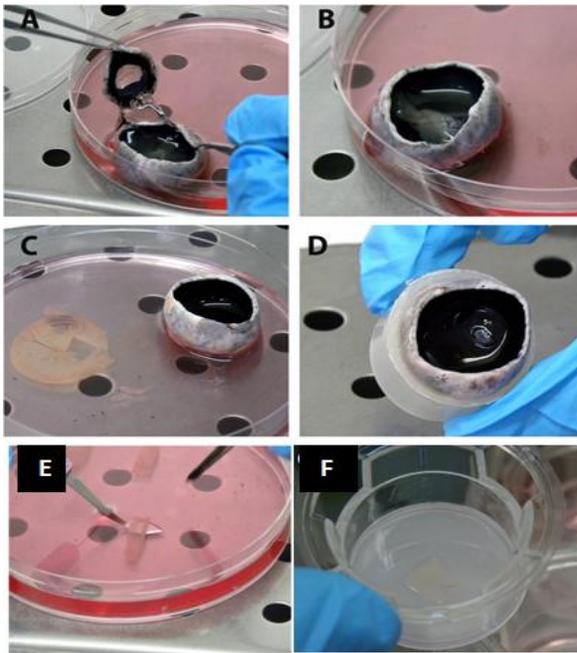


FIG-1 Método de obtención de los explantes de neuroretina. Se procedió a la disección del globo ocular en segmento anterior y posterior A. posteriormente se realizó el desprendimiento mecánico de la retina neural con la ayuda de un pincel B-C. Se colocaron los explantes sobre la espátula metálica, con ayuda de un pincel, y se depositaron sobre la membrana de los pocillos E-F.



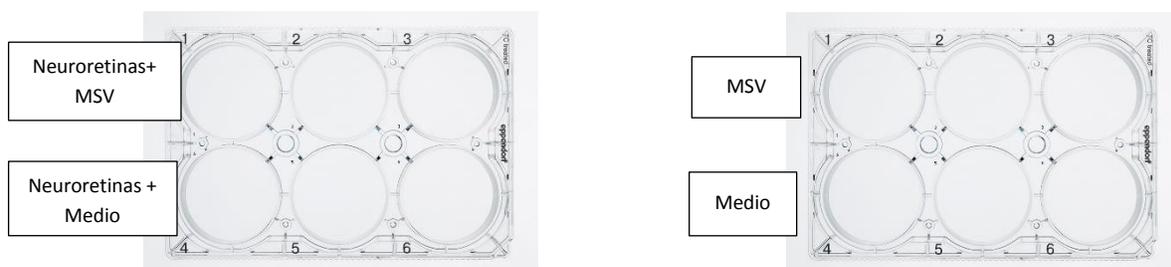
FIG-2 Identificación del área centralis, aproximadamente 1 mm por encima del nervio óptico, evitando la presencia de vasos visibles y de bordes irregulares.

5.4 PREPARACIÓN DE LAS PLACAS DE CULTIVO

Se utilizaron 4 placas Transwell distribuidas de la siguiente manera:

En los pocillos 1, 2 y 3 y en los pocillos 6, 7 y 8 se sembraron 15.000 y 30.000 células/pocillo (MSV, PEI 15-007) respectivamente, contenidas en 1,6 mL de medio DMEM/HAM F12 (Gibco®, Paysley, Reino Unido) suplementado con 10 % de FBS, 1% de Antibiótico y 1% de L-Glutamina 72 horas previamente a la obtención de los explantes retinianos. En el resto de los pocillos se depositaron 1,6 ml de medio. Una vez obtenidos los explantes, se colocaron sobre las membranas Transwell de los pocillos 1 a 6 de las placas 1 y 3 (Figura 3). Las placas de cultivo se mantuvieron en una incubadora a 37°C con una atmósfera enriquecida al 5% de CO₂ durante el tiempo de duración del experimento (144 horas). De esta manera, los sobrenadantes de cultivo celular procedentes de los pocillos 1, 2 y 3 (NR + MSV + medio) se definieron como condición experimental 1, los sobrenadantes de los pocillos 4, 5 y 6 (NR + medio) condición experimental 2, los sobrenadantes de los pocillos 7, 8 y 9 (MSV+ medio) como condición experimental 3 y los medios de los pocillos 10, 11 y 12 como controles (Figura 3). El medio se renovó diariamente hasta la conclusión del experimento, añadiendo siempre 1.6 mL de medio recién elaborado y atemperado. Este volumen de medio predeterminado por el fabricante permitió su contacto con la membrana del pocillo, pero sin sobrepasarla, lo que, a su vez, permitió la adhesión de la retina a la membrana del pocillo, evitando que flotara sobre el medio.

- Placas 1 y 2: dosis celular baja (15.000 células x pocillo)



- Placas 3 y 4: dosis celular alta (30.000 células x pocillo)

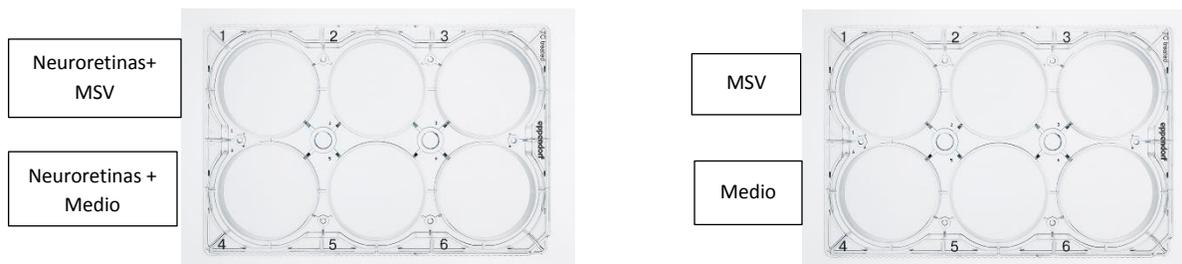


FIG-3 Preparación de las placas de cultivo. MSV: Mesenchymal Stem from Valladolid (PEI 15-007), Medio: Ham/F12.

5.5 CUANTIFICACIÓN DE LOS FACTORES NEUOTRÓFICOS

Los sobrenadantes del cultivo de cada una de las condiciones experimentales se retiraron a las 48, 96 y 144 horas y se recogieron en tubos de 1,5 ml (Eppendorf, Corning, NY, EE. UU). Las muestras se guardaron en ultracongelación a -80°C hasta su procesamiento, para evaluar la posible presencia de factores de crecimiento secretados por las células MSV (PEI 15-007) durante el cultivo. Para ello se emplearon técnicas de inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés). Técnica en la cual un antígeno, hormona o proteína inmovilizada se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima, capaz de generar un producto detectable, como el cambio de color. De esta forma, se cuantificaron mediante el empleo de kits comerciales el BDNF (RayBio® Human BDNF ELISA Kit; RayBiotech, Norcross, GA, USA) con un rango de detección desde 0,1 a 16ng/ml, el CNTF (Human CNTF kit; Cloud-Clone Corp., Houston, TX, USA) con un rango de detección desde 7,8 a 500 pg/ml y el NGF (Human NGF kit; Cloud-Clone Corp., Houston, TX, USA), con rango de detección de de 15,6 a 1000 pg/ml.

5.6 ANALISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos obtenidos fueron recogidos en un cuaderno de laboratorio en papel y trasladados a una hoja Excel (Microsoft Excel 2016®). Los datos representados en esta parte del trabajo corresponden con la media de los resultados obtenidos en los diferentes experimentos realizados \pm la desviación estándar (SEM) y fueron analizados con el programa SPSS (versión 24.0, SPSS, Inc., Chicago, IL, EE.UU.). Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Para el estudio de la comparación de los datos obtenidos en los diferentes tiempos de estudio se realizó un ANOVA de 1 factor con *post hoc* de DSM para muestras de distribución normal, Games-Howell para muestras de distribución asimétrica y similitud de sus varianzas.

Para el estudio comparativo de cada condición entre ambas dosis experimentales y en los distintos tiempos de estudio se realizó la prueba U de Mann-Whitney para muestras no paramétricas.

6- RESULTADOS

6.1 CUANTIFICACIÓN DE FACTORES NEUROTROFICOS CON DOSIS CELULAR DE 15.000 CELULAS POR POCILLO

La determinación mediante ELISA de los 3 factores en estudio secretados por las MSV permitió determinar la presencia de BDNF, CNTF y NGF en los sobrenadantes de cultivo celular en las 4 condiciones experimentales. Las concentraciones de BDNF detectadas en los sobrenadantes de la condición experimental 1 (cocultivo de NR con MSV y medio) fueron de 3836,7 ($\pm 0,11867$), 3906 ($\pm 0,11547$), 3778,3 ($\pm 0,18202$) a las 48 horas, 96 horas y 144 horas respectivamente y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo (Fig-4). En los sobrenadantes procedentes de la condición experimental 2 (NR y medio) también se encontraron concentraciones de BDNF 2877 ($\pm 142,63$), 2341 ($\pm 58,8$), 2484,3 ($\pm 60,56$)pg/ml respectivamente, que disminuyeron de forma significativa ($p < 0,05$) a las 96 horas y aumentaron nuevamente pero de forma no significativa a las 144 horas (Fig-4). Los sobrenadantes procedentes de la condición experimental 3 (MSV y medio) presentaron una concentración muy baja de BDNF 1104,7 ($\pm 309,9$), 848,3 ($\pm 75,96$), 712,3 ($\pm 63,67$)pg/ml respectivamente la cual disminuyó a las 96 horas de forma no significativa y a las 144 horas de forma significativa ($p < 0,05$) (Fig-4). El medio utilizado para el mantenimiento de los cultivos (condición experimental 4) presentó una concentración baja de BDNF: 475 ($\pm 36,17$), 567 ($\pm 57,06$), 566,3 ($\pm 32,12$) pg/ml respectivamente, que se mantuvo sin grandes cambios a lo largo del tiempo (Fig-4). Las concentraciones de BDNF halladas en las condiciones experimentales 2, 3 y 4 fueron estadísticamente menores en comparación con la hallada en la condición experimental 1 en los tres tiempos de cultivo evaluados ($p < 0,05$) (Fig-4).

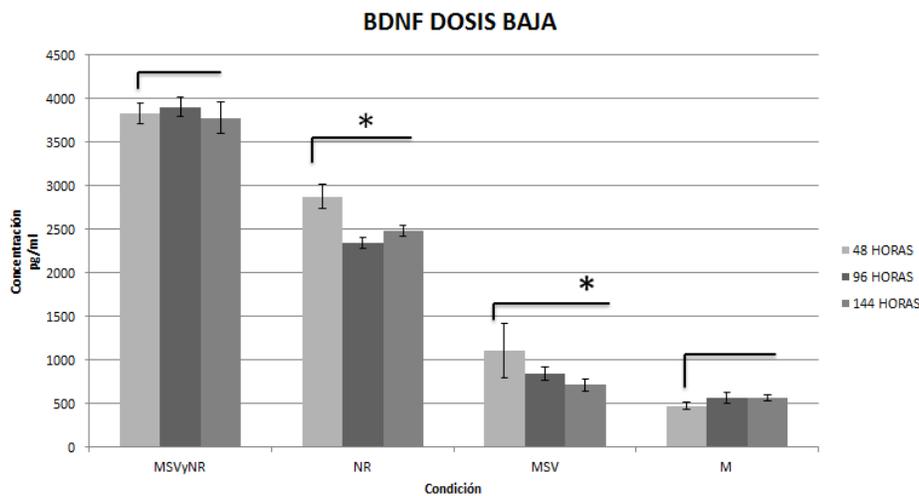


Figura 4. Medias (\pm SEM) de las concentraciones del factor neurotrófico BDNF halladas en los sobrenadantes del cultivo en las diferentes condiciones experimentales a las 48, 96 y 144 horas. NR: Neurorretina, MSV: Mesenchymal Stem from Valladolid (PEI 15-007), Medio: Ham/F12. Significancia estadística: * $p < 0,05$.

-En relación con el NGF, se observó que las concentraciones de este factor en los sobrenadantes procedentes de la condición experimental 1 (cocultivo de NR con MSV y medio) fueron de 26,30 ($\pm 0,9745$), 31,303 ($\pm 9,10375$) y 35,713 ($\pm 3,60565$) pg/ml a las 48, 96 y 144 horas respectivamente (Fig-5). Hubo un aumento progresivo de la concentración de NGF en el tiempo que no fue estadísticamente significativo. En los sobrenadantes obtenidos de la condición experimental 2 (cultivo de NR y medio) la concentración de NGF fue similar en todos los tiempos de estudio 19,0947 ($\pm 2,0034$), 19,66 ($\pm 2,97468$), 16,835 ($\pm 1,01685$)pg/ml aumentando levemente a las 96 horas y disminuyendo a las 144 horas pero siempre de forma no significativa (Fig-5). La concentración hallada en la condición experimental 2 fue estadísticamente menor en comparación con la hallada en la condición experimental 1 y 3 a las 144 horas de estudio ($p < 0,05$)(Fig-5). Los sobrenadantes derivados de la condición experimental 3 (MSV y medio) mostraron concentraciones de NGF altas 28,5357 ($\pm 3,39367$), 24,4143 ($\pm 1,44556$), 29,6613 ($\pm 3,29332$)pg/ml pero similares en el tiempo con un descenso a las 96 horas y un leve aumento a las 144 horas, no siendo las diferencias estadísticamente significativas (Fig-5). El medio utilizado para el mantenimiento de los cultivos (condición experimental 4) mostró una concentración basal de NGF 14,6703 ($\pm 3,27797$), 13,564 ($\pm 1,10065$), 19,2423 ($\pm 1,61229$)pg/ml con un aumento no significativo a las 144 horas (Fig-5).

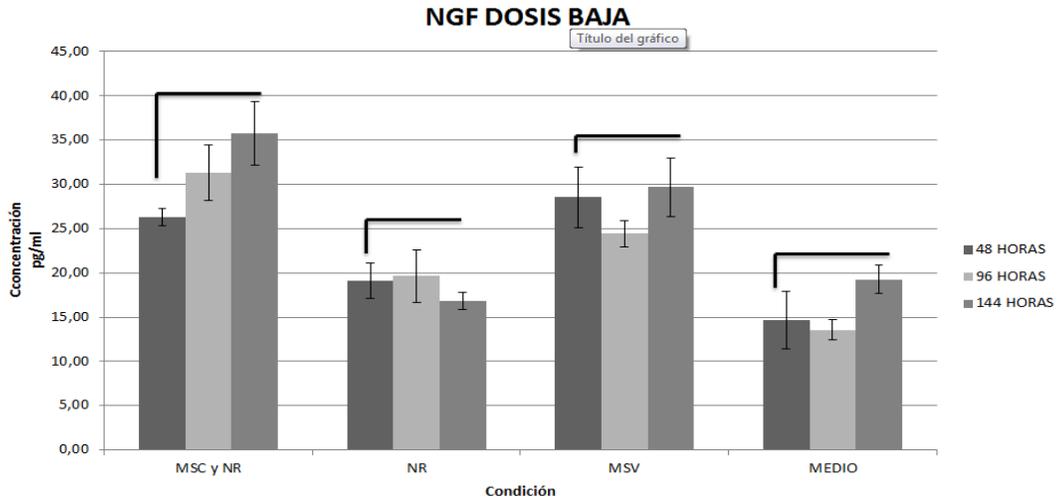


Figura 5. Medias (\pm SEM) de las concentraciones del factor neurotrófico NGF halladas en los sobrenadantes del cultivo en las diferentes condiciones experimentales a las 48, 96 y 144 horas. NR: Neurorretina, MSV: Mesenchymal Stem from Valladolid (PEI 15-007), Medio: Ham/F12. Significancia estadística: * $p < 0,05$.

-En cuanto a la determinación de los niveles de CNTF los sobrenadantes procedentes de la condición experimental 1 (cocultivo de NR con MSV y medio) las concentraciones de CNTF fueron de 2,1645 ($\pm 0,53557$), 1,6638 ($\pm 0,55521$) y 1,0027 ($\pm 0,09781$) pg/m a las 48, 96 y 144 horas respectivamente (Fig-6). A diferencia de los otros dos factores estudiados hubo una disminución progresiva de la concentración de CNTF en el tiempo que no fue estadísticamente significativa (Fig-6). En los sobrenadantes obtenidos de la condición experimental 2 (cultivo de NR y medio) la concentración fue de 4,7223 ($\pm 0,3048$), 5,248 ($\pm 2,1892$), 5,9817 ($\pm 0,96136$) respectivamente, apreciándose un aumento de forma progresiva hasta las 144 horas pero sin significación estadística (Fig-6). La concentración hallada en la condición experimental 2 fue estadísticamente mayor en comparación con la hallada en la condición experimental 1, 3 y 4 a las 48 y 96 horas de estudio, y menor en comparación a la condición experimental 4 a las 144 horas de estudio. Los sobrenadantes derivados de la condición experimental 3 (MSV y medio) mostraron de CNTF de 4,1387 ($\pm 1,06578$), 0,9208 ($\pm 0,84089$), 6,865 ($\pm 1,37799$)pg/ml con un descenso no significativo a las 96 horas y un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) a las 144 horas (Fig-6). El medio utilizado para el mantenimiento de los cultivos (condición experimental 4) mostró una concentración de CNTF de 3,9707 ($\pm 0,51195$), 4,2272 ($\pm 1,09025$), 10,252 ($\pm 1,14459$)pg/ml similar a las 48 y 96 horas con un paradójico aumento de forma

significativa a las 144 horas (Fig-6). En los sobrenadantes obtenidos de esta última condición además se observaron niveles superiores a la condición 1 estadísticamente significativos ($p < 0,05$) (Fig-6).

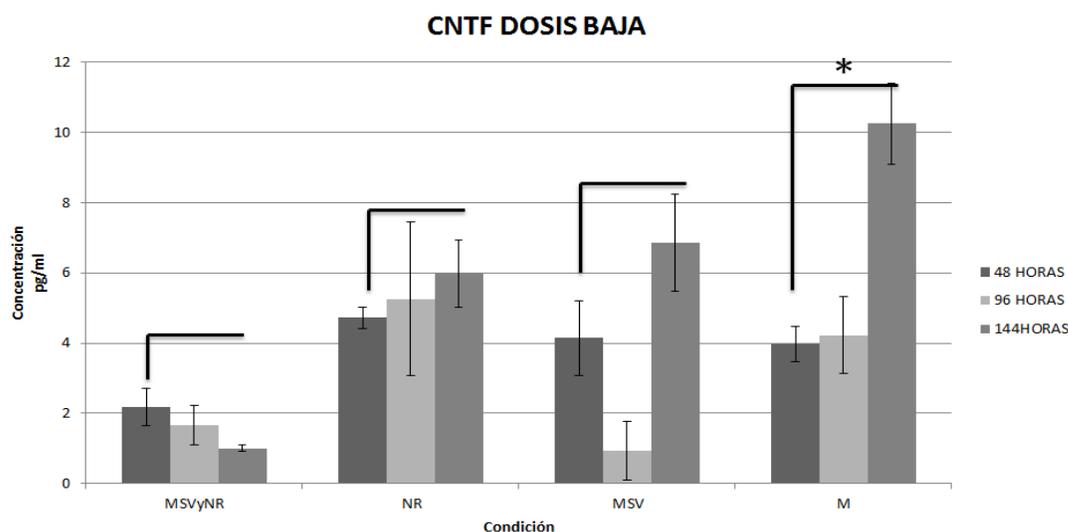


Figura 6. Medias (\pm SEM) de las concentraciones del factor neurotrófico CNTF halladas en los sobrenadantes del cultivo en las diferentes condiciones experimentales a las 48, 96 y 144 horas. NR: Neuroretina, MSV: Mesenchymal Stem from Valladolid (PEI 15-007), Medio: Ham/F12. Significancia estadística: * $p < 0,05$.

6.2 CUANTIFICACIÓN DE FACTORES NEUROTRÓFICOS CON DOSIS CELULAR DE 30.000 CELULAS POR POCILLO:

La determinación mediante ELISA de los 3 factores en estudio secretados por las MSV también permitió determinar la presencia de BDNF, CNTF y NGF en los sobrenadantes de cultivo celular en las 4 diferentes condiciones experimentales a una dosis celular más alta. Las concentraciones de BDNF detectadas en los sobrenadantes de la condición experimental 1 (cocultivo de NR con MSV y medio) fueron de 4946,666pg/ml (\pm 104,4929), 6951,333pg/ml (\pm 210,8691), 5059,333pg/ml (\pm 178,7378) las 48 horas, 96 horas y 144 horas respectivamente y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo (Fig-6). En los sobrenadantes procedentes de la condición experimental 2 (NR y medio) también se encontraron concentraciones de BDNF 320 (\pm 55,4256), 17,1333

($\pm 7,9522$), 10,259 ($\pm 3,1222$)pg/ml que disminuyeron de forma significativa ($p < 0,05$) a las 96 horas y disminuyeron aún más pero de forma no significativa a las 144 horas (Fig-6). Los sobrenadantes procedentes de la condición experimental 3 (MSV y medio) presentaron una concentración de BDNF que osciló entre 2900 y 3500pg/ml con un ascenso a las 96 horas y un descenso a las 144 horas no significativos (Fig-6). El medio utilizado para el mantenimiento de los cultivos (condición experimental 4) presentó una concentración baja de BDNF 240 ($\pm 94,2974$), 57,4433 ($\pm 26,8064$), 8,7127 ($\pm 2,1346$)pg/ml que disminuyó a lo largo del tiempo de forma no significativa (Fig-6). Las concentraciones de BDNF halladas en las condiciones experimentales 2, 3 y 4 fueron estadísticamente menores en comparación con la hallada en la condición experimental 1 en los tres tiempos de cultivo evaluados ($p < 0,05$).

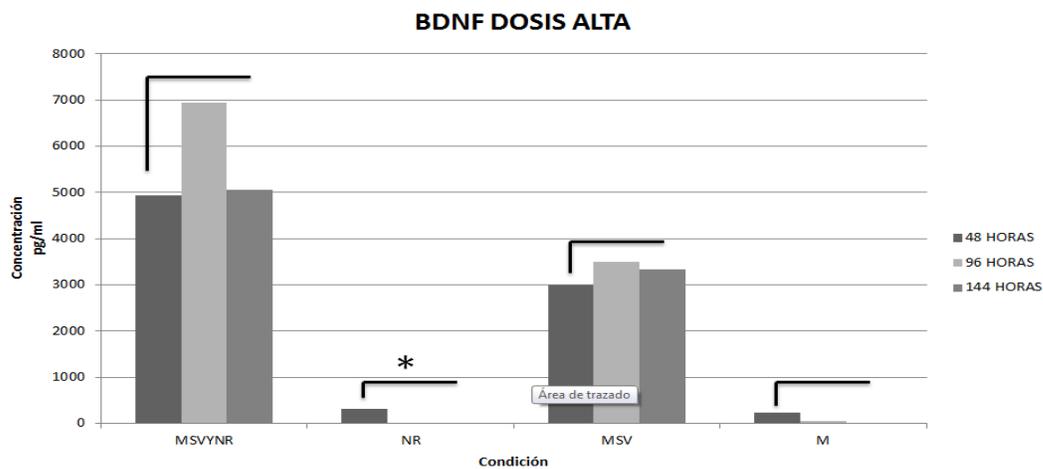


Figura 7. Medias (\pm SEM) de las concentraciones del factor neurotrófico BDNF halladas en los sobrenadantes del cultivo en las diferentes condiciones experimentales a las 48, 96 y 144 horas. NR: Neuroretina, MSV: Mesenchymal Stem from Valladolid (PEI 15-007), Medio: Ham/F12. Significancia estadística: * $p < 0,05$.

-En relación con el NGF, se observó que las concentraciones de este factor en los sobrenadantes procedentes de la condición experimental 1 (cocultivo de NR con MSV y medio) fueron de 53,1045 ($\pm 7,9034$), 41,0863 ($\pm 5,6224$) y 52,9683 ($\pm 0,7205$) pg/ml las 48, 72 y 144 horas respectivamente (Fig-7). Las concentraciones se mantuvieron estables en el tiempo con un ligero descenso a las 96 horas que no fue estadísticamente significativo. En los sobrenadantes obtenidos de la condición experimental 2 (cultivo de NR y medio) la concentración de NGF 19,5377 ($\pm 3,202$), 21,6143 ($\pm 4,9581$), 12,2775 ($\pm 2,1856$)pg/ml fue similar en todos los tiempos de estudio aumentando ligeramente a las 96 horas y

disminuyendo a las 144 horas pero siempre de forma no significativa (Fig-7). Los sobrenadantes derivados de la condición experimental 3 (MSV y medio) mostraron concentraciones de NGF altas pero similares en el tiempo 46,2775 ($\pm 12,0715$), 43,2261 ($\pm 6,4976$), 53,4478 ($\pm 7,0136$)pg/ml con un descenso a las 96 horas y un aumento a las 144 horas no estadísticamente significativos (Fig-7). El medio utilizado para el mantenimiento de los cultivos (condición experimental 4) mostró una concentración basal de NGF 9,6775 ($\pm 3,1079$), 13,3808 ($\pm 5,8608$), 19,6442 ($\pm 4,3069$)pg/ml con un aumento progresivo a las 96 y 144 horas no significativo (Fig-7). Las concentraciones halladas en la condiciones experimentales 1 y 3 fueron similares en el tiempo con una ligera ventaja para la condición experimental 3 a las 96 y 144 horas que no fue estadísticamente significativa. Sin embargo, estas condiciones presentaron concentraciones superiores en comparación con las concentraciones halladas en la condición experimental 2 y 4 en todos los tiempos de estudio ($p < 0,05$).

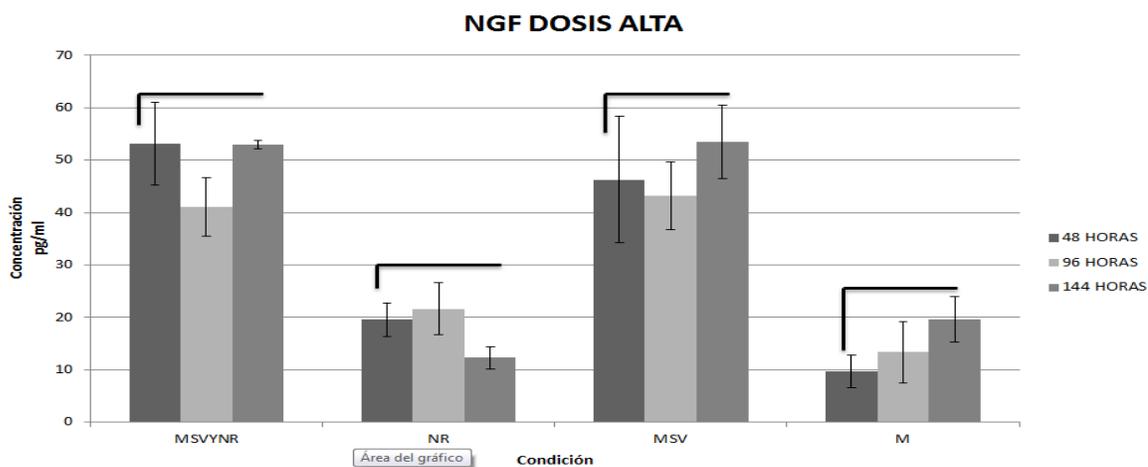


Figura 8. Medias (\pm SEM) de las concentraciones del factor neurotrófico NGF halladas en los sobrenadantes del cultivo en las diferentes condiciones experimentales a las 48, 96 y 144 horas. NR: Neuroretina, MSV: Mesenchymal Stem from Valladolid (PEI 15-007), Medio: Ham/F12. Significancia estadística: * $p < 0,05$.

-En relación con el CNTF, se observó que las concentraciones de este factor en los sobrenadantes procedentes de la condición experimental 1 (cocultivo de NR con MSV y medio) fue de 26,9043 ($\pm 10,2888$), 18,0869 ($\pm 6,0833$) y 54,713 ($\pm 5,9944$) pg/m a las 48, 96 y 144 horas respectivamente. Hubo una disminución en la concentración de CNTF a las 96

horas no estadísticamente significativa y un aumento en la concentración a las 144 horas estadísticamente significativo ($p < 0,05$) (Fig-8). En los sobrenadantes obtenidos de la condición experimental 2 (cultivo de NR y medio) la concentración de CNTF presentó un aumento progresivo en el tiempo 28,0316 ($\pm 19,2182$), 78,226 ($\pm 29,1529$), 89,3043 ($\pm 6,6953$)pg/ml que no fue estadísticamente significativo (Fig-8). Los sobrenadantes derivados de la condición experimental 3 (MSV y medio) mostraron concentraciones de CNTF que aumentaron de forma no significativa 19,4434 ($\pm 17,413$), 48,3825 ($\pm 16,0617$), 22,1565 ($\pm 15,3938$)pg/ml a las 96 horas para luego disminuir también de forma no significativa a las 144 horas (Fig-8). El medio utilizado para el mantenimiento de los cultivos (condición experimental 4) mostró una concentración de CNTF de 74,8315 ($\pm 20,4328$), 28,713 ($\pm 19,9303$), 97,2173 ($\pm 3,6385$)pg/ml que disminuyó de forma no significativa a las 96 horas y aumento considerablemente pero de forma no significativa a las 144 horas (Fig-8). La concentración hallada en la condición experimental 4 fue estadísticamente mayor a la condición experimental 1 a las 144 horas de forma significativa ($p < 0,05$). De igual manera las condiciones experimentales 2 y 4 mostraron niveles similares de CNTF que superaron de forma significativa las concentraciones de la condición experimental 3 ($p < 0,05$).

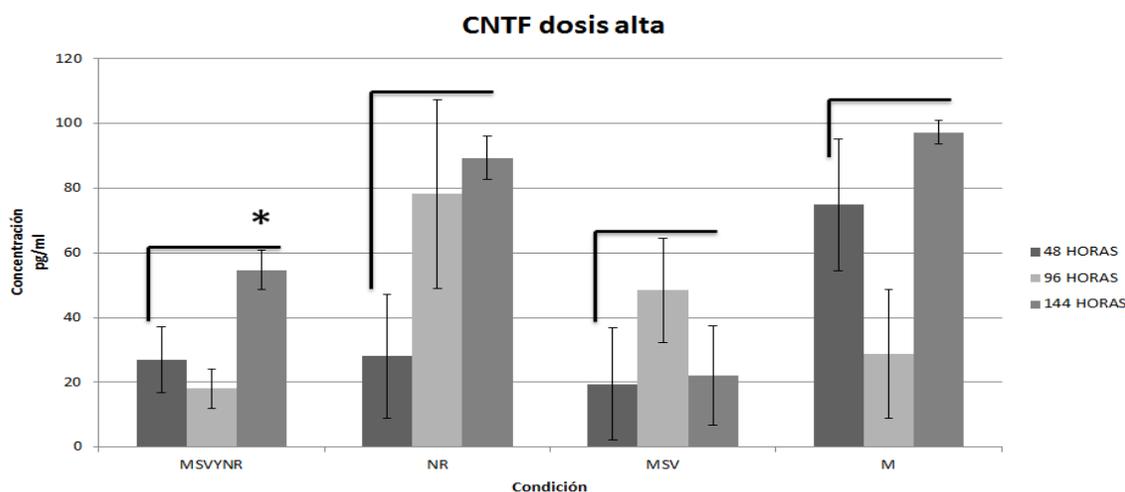


Figura 9. Medias (\pm SEM) de las concentraciones del factor neurotrófico CNTF halladas en los sobrenadantes del cultivo en las diferentes condiciones experimentales a las 48, 96 y 144 horas. NR: Neurorretina, MSV: Mesenchymal Stem from Valladolid (PEI 15-007), Medio: Ham/F12. Significancia estadística: * $p < 0,05$.

6-3 COMPARACIÓN DE DOSIS BAJA CON DOSIS ALTA

-Con respecto a los valores de concentración obtenidos a dosis celulares bajas (15.000 cels/pocillo) se pudo observar que la concentración de BDNF hallada en las 4 condiciones experimentales estudiadas, fue mayor con la dosis celular alta (30.000cels/pocillo), diferencias que fueron estadísticamente significativas en todos los tiempos de estudio ($p \leq 0,05$).

En cuanto al NGF la condición experimental 1 presentó mayores concentraciones en todos los tiempos de estudio pero las diferencias con el resto fueron estadísticamente significativas solo a las 48 y 144 horas. En la condición experimental 2 se observaron concentraciones similares a las 48 y 96 horas y un descenso a las 144 horas que fue estadísticamente significativo. La condición experimental 3 mostró un aumento en la concentración de este factor en todos los tiempos de estudio siendo significativo a las 96 y a las 144 horas. En la condición experimental 4 (medio utilizado para el mantenimiento de los cultivos) se observó una concentración del factor inferior a las 48 horas no estadísticamente significativa y concentraciones similares a las 96 y 144 horas.

En relación a las concentraciones de CNTF se percibió en la condición experimental 1, 2 y 4 un aumento estadísticamente significativo en todos los tiempos de estudio ($p \leq 0,05$). Sin embargo La condición experimental 3 presentó un incremento en la concentración de este factor en los 3 tiempos de estudio que no fue estadísticamente significativo.

7- DISCUSIÓN

7.1- ELECCIÓN DE UN MODELO DE CULTIVO ORGANOTÍPICO DE NEURORRETINA PORCINA.

Los modelos in vivo presentan algunas limitaciones, económicas, éticas y legislativas (13), que limitan su empleo, y entre las técnicas in vitro, aunque los cultivos celulares permiten manipular el comportamiento celular, mediante la adición de sustancias externas, como fármacos, factores de crecimiento, etc. No son capaces de simular las dinámicas celulares que suceden in vivo, ya que se pierden las interacciones celulares que caracterizan a un tejido complejo como es la retina (14).

Por otra parte, dentro de las técnicas in vitro, los modelos de cultivo organotípico de retina poseen la ventaja de simular fiablemente las dinámicas fisiológicas y patológicas de las células retinianas (14).

Entre las distintas especies animales empleadas en investigación en patologías retinianas, para el desarrollo de este trabajo se optó por la utilización de ojos porcinos, ya que comparten varias similitudes con los ojos humanos, como el tamaño del globo ocular, el grosor y la rigidez escleral, y, sobre todo, la estructura, la ultra estructura, el tamaño y la extensión retinianas (15).

Por otra parte, el empleo de neurorretinas procedentes de ojos de cadáver humano para el desarrollo de los experimentos planteados, resulta prácticamente inviable, ya que obviamente, no se puede programar temporalmente la obtención de las muestras, ni planificar con anterioridad el número de muestras de las que se dispondrá.

En el cerdo, al igual que en el resto de especies animales, salvo los primates y las aves, no existe una verdadera mácula, sin embargo, en esta especie es posible identificar una área horizontal, con una elevada densidad de conos, localizada superiormente al nervio óptico, denominada área centralis (15). Además, esta región carece de vascularización directa por parte de los grandes vasos retinianos (15), de forma similar a la mácula de los primates, y se puede identificar fácilmente porque la retina de cerdo posee una evidente asimetría entre la hemiretina superior y la inferior, que es menos extensa (Figura 2).

Además, este modelo de cultivo organotípico ha sido previamente puesto a punto y estandarizado por el Grupo de Retina del IOBA (16, 17). Así, el modelo de cultivo organotípico de retina neural de cerdo supone numerosas ventajas que lo hacen adecuado para la investigación retiniana y como ventajas añadidas, los ojos son económicos y fáciles de obtener en un matadero local.

7.2 DISCUSIÓN DEL MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron explantes de neuroretina porcina de 5x5 mm procedentes del *area centralis*, debido a la elevada concentración de conos y la escasez de vasos presentes en esta zona, para que las modificaciones sean comparables entre experimentos, y para los posibles cambios se asemejaran a lo que podría ocurrir en la retina humana. Además, esto permite comparar cambios en el espesor retiniano a lo largo del cultivo, ya que el espesor inicial varía entre retina central y periférica. Por tanto, de cada ojo se obtuvieron 2 explantes. Se evitó la presencia de bordes irregulares, ya que estas porciones degenerarían rápidamente, y de zonas con vasos visibles, para descartar los posibles efectos de células endoteliales y hematíes en los procesos de degeneración de las células retinianas.

En los cultivos experimento, las células MSV se depositaron en la base de la placa, debajo de la membrana del pocillo Transwell®. De esta manera, la membrana del pocillo con poros de 0,4µm de tamaño permite el paso de los factores secretados por éstas.

Se decidió colocar los explantes de NR con la ILM dispuesta hacia la membrana y cultivar las MSV en el fondo de los pocillos, de modo que los factores secretados actuaran directamente sobre la GCL al contrario de otros cultivos desarrollados por el grupo de Retina del IOBA de otros estudios sobre RGC en cultivos organotípicos (17). El número de células sembradas por pocillo (15.000/pocillo o 1562,5células/cm² y 30.000/pocillo o 3.125 células/cm²), fue suficiente para que las MSV alcanzaran la confluencia celular en los pocillos al inicio del cocultivo, y corresponde con la concentración utilizada en estudios previos [28]. Como medio de cultivo para este estudio, se ha utilizado una dilución 1:1 de medio DMEM/HAM F12 suplementado con un 10% de suero fetal bovino con un 1% de L-

glutamina, y un 1% de antibiótico. (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco®, Paisley, Reino Unido), suplementado con 10% de antibióticos/antimicóticos (100 U/ml de Penicilina, 100 µg/ml de Estreptomicina y 2,5 µg/ml de Anfotericina B, Gibco®, Invitrogen, Paisley, UK), este medio es ideal para el mantenimiento de las MSV y que mantiene en unas condiciones adecuada la neurorretina, en especial la GCL. Sin embargo, no es el mejor medio para los fotorreceptores y otras neuronas de la retina, en este caso es el Neurobasal A con B27, que es el que se ha empleado en estudios previos del grupo de retina.

Los tiempos transcurridos hasta la medición de los factores utilizados en el presente trabajo a diferencia de los utilizados en otros estudios similares realizados por el Grupo de Retina del IOBA (16, 17), fueron más largos con el fin de observar las posibles diferencias en la secreción de estos factores en tiempos más prolongados.

7.3 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados del presente estudio muestran que las MSV son capaces de producir *in vitro* los 3 factores evaluados, el BDNF, el NGF y el CNTF, tanto en cocultivo con neurorretinas como en cocultivo individualizado. No obstante, también se encontraron concentraciones de estos factores en los pocillos que no contenían estas células. Esto puede ser debido a que células presentes en las neurorretinas tengan la capacidad de secretar estos factores o que el suero fetal bovino utilizado para complementar el medio contenga en su composición la presencia de estos factores. En cuanto al BDNF se observó que la concentración de este factor en la condición experimental 1 fue superior al resto de condiciones en ambas dosis celulares, siendo mayor de forma estadísticamente significativa en la dosis celular alta. Además se observó que las células MSV en cultivo individualizado presentaron una concentración de factores mayor a las NR solas y al medio, presentando un aumento significativo a mayor dosis celular. Sin embargo no se evidenciaron variaciones significativas a mayor tiempo de estudio

A diferencia de lo que ocurre con el BDNF, la cantidad de NGF producido por las MSV cultivadas de forma aislada fue similar a la cantidad producida por las MSV cocultivadas

con NR. Esta similitud se observó en ambas dosis celulares, con ligeras variaciones en el tiempo que no llegaron a la significación estadística en ninguno de los casos.

Con respecto al CNTF se produjo un error en la elaboración de la dilución de los sobrenadantes de la curva patrón del ELISA en el experimento de dosis celular baja. Se trató de adaptar la curva patrón de forma manual pero los resultados obtenidos no se pueden considerar fiables, por lo que será necesario repetir este experimento en el futuro.

En cuanto a la dosis celular alta las condiciones que mostraron niveles más elevados de concentración del factor fueron de forma inesperada las NR sin cocultivar y el medio de cultivo. Comparando estos resultados con otro estudio, actualmente bajo revisión, realizado por el grupo de retina del IOBA, en el que las concentraciones de este factor eran mayores en las condiciones experimentales donde habían células MSV se pueden apreciar diferencias marcadas en los datos obtenidos por lo que el análisis de este factor con ambas dosis celulares deben considerarse dudosos y no fiables.

En todos los experimentos realizados, se confirmó que también las NR por sí mismas producen estos factores (BDNF, NGF y CNTF), en una menor cantidad y que el medio de cultivo solo también presenta concentraciones de estos factores.

8- CONCLUSIONES

-Las MSV cocultivadas *in vitro* con o sin NR son capaces de secretar factores neurotróficos tales como el BDNF, el NGF y el CNTF implicados en la supervivencia de las células retinianas en degeneración, por tanto, las MSV pueden ser potencialmente eficaces como terapia neuroprotectora en patologías relacionadas con la degeneración retiniana.

-Las concentraciones de BDNF aumentan de forma significativa al aumentar la dosis celular, en cambio las concentraciones de NGF se mantienen estables al aumentar la dosis. Los resultados del CNTF no son concluyentes.

-Las concentraciones de los factores varían pero de forma no significativa en el tiempo de cultivo, observándose niveles de BDNF y NGF relativamente estables en ambas dosis celulares. Los niveles de CNTF no son concluyentes.

9-BIBLIOGRAFÍA

1. Caffè AR, Visser H, Jansen HG, Sanyal S. Histotypic differentiation of neonatal mouse retina in organ culture. *Current eye research*. 1989 Oct;8(10):1083-92. PubMed PMID: 2612197. Epub 1989/10/01. eng.
2. Feigenspan A, Bormann J, Wässle H. Organotypic slice culture of the mammalian retina. *Visual neuroscience*. 1993 Mar-Apr;10(2):203-17. PubMed PMID: 8485085. Epub 1993/03/01. eng.
3. Hartani D, Belguendouz H, Guenane H, Chachoua L, Lahlou-Boukoffa OQ, Touil-Boukoffa C. [Effect of nitrites and nitrates on bovine retina in vitro]. *Journal francais d'ophtalmologie*. 2006 Jan;29(1):32-6. PubMed PMID: 16465121. Epub 2006/02/09. Effet des nitrites et des nitrates sur les retines de boeuf in vitro. fre.
4. Delyfer MN, Simonutti M, Neveux N, Leveillard T, Sahel JA. Does GDNF exert its neuroprotective effects on photoreceptors in the rd1 retina through the glial glutamate transporter GLAST? *Molecular vision*. 2005 Sep 01;11:677-87. PubMed PMID: 16163265. Epub 2005/09/16. eng.
5. Trichonas G, Murakami Y, Thanos A, Morizane Y, Kayama M, Debouck CM, et al. Receptor interacting protein kinases mediate retinal detachment-induced photoreceptor necrosis and compensate for inhibition of apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010 Dec 14;107(50):21695-700. PubMed PMID: 21098270. Pubmed Central PMCID: PMC3003048. Epub 2010/11/26. eng.
6. Wickham L, Sethi CS, Lewis GP, Fisher SK, McLeod DC, Charteris DG. Glial and neural response in short-term human retinal detachment. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill : 1960)*. 2006 Dec;124(12):1779-82. PubMed PMID: 17159042. Epub 2006/12/13. eng.
7. Fritsche LG, Igl W, Bailey JN, Grassmann F, Sengupta S, Bragg-Gresham JL, et al. A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants. *Nature genetics*. 2016 Feb;48(2):134-43. PubMed PMID: 26691988. Pubmed Central PMCID: PMC4745342. Epub 2015/12/23. eng.
8. Ferrari S, Di Iorio E, Barbaro V, Ponzin D, Sorrentino FS, Parmeggiani F. Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms. *Current genomics*. 2011 Jun;12(4):238-49. PubMed PMID: 22131869. Pubmed Central PMCID: PMC3131731. Epub 2011/12/02. eng.
9. Sorrentino FS, Gallenga CE, Bonifazzi C, Perri P. A challenge to the striking genotypic heterogeneity of retinitis pigmentosa: a better understanding of the pathophysiology using the newest genetic strategies. *Eye (London, England)*. 2016 Dec;30(12):1542-8. PubMed PMID: 27564722. Pubmed Central PMCID: PMC5177762. Epub 2016/08/27. eng.
10. Critchley CR, Bruce G, Farrugia M. The impact of commercialisation on public perceptions of stem cell research: exploring differences across the use of induced pluripotent cells, human and animal embryos. *Stem cell reviews*. 2013 Oct;9(5):541-54. PubMed PMID: 23695820. Epub 2013/05/23. eng.
11. Liang FQ, Aleman TS, Dejneka NS, Dudas L, Fisher KJ, Maguire AM, et al. Long-term protection of retinal structure but not function using RAAV.CNTF in animal models of retinitis pigmentosa. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene*

- Therapy. 2001 Nov;4(5):461-72. PubMed PMID: 11708883. Epub 2001/11/16. eng.
12. Berry M, Ahmed Z, Lorber B, Douglas M, Logan A. Regeneration of axons in the visual system. *Restorative neurology and neuroscience*. 2008;26(2-3):147-74. PubMed PMID: 18820408. Epub 2008/09/30. eng.
 13. Agrawal RN, He S, Spee C, Cui JZ, Ryan SJ, Hinton DR. In vivo models of proliferative vitreoretinopathy. *Nature protocols*. 2007;2(1):67-77. PubMed PMID: 17401340. Epub 2007/04/03. eng.
 14. Kobuch K, Herrmann WA, Framme C, Sachs HG, Gabel VP, Hillenkamp J. Maintenance of adult porcine retina and retinal pigment epithelium in perfusion culture: characterisation of an organotypic in vitro model. *Experimental eye research*. 2008 Apr;86(4):661-8. PubMed PMID: 18295758. Epub 2008/02/26. eng.
 15. Koizumi A, Zeck G, Ben Y, Masland RH, Jakobs TC. Organotypic culture of physiologically functional adult mammalian retinas. *PloS one*. 2007 Feb 21;2(2):e221. PubMed PMID: 17311097. Pubmed Central PMCID: PMC1794165. Epub 2007/02/22. eng.
 16. Fernandez-Bueno I, Garcia-Gutierrez MT, Srivastava GK, Gayoso MJ, Gonzalo-Orden JM, Pastor JC. Adalimumab (tumor necrosis factor-blocker) reduces the expression of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity increased by exogenous tumor necrosis factor alpha in an organotypic culture of porcine neuroretina. *Molecular vision*. 2013;19:894-903. PubMed PMID: 23687426. Pubmed Central PMCID: PMC3654850. Epub 2013/05/21. eng.
 17. Fernandez-Bueno I, Pastor JC, Gayoso MJ, Alcalde I, Garcia MT. Muller and macrophage-like cell interactions in an organotypic culture of porcine neuroretina. *Molecular vision*. 2008;14:2148-56. PubMed PMID: 19052655. Pubmed Central PMCID: PMC2593001. Epub 2008/12/05. eng.