



Universidad de Valladolid

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA VISIÓN

TESIS DOCTORAL

**DESARROLLO DE UN MODELO DE
EXPERIMENTACIÓN TRIDIMENSIONAL DE
CICATRIZACIÓN CORNEAL: FACILITANDO EL
ESTUDIO DE NUEVOS FÁRMACOS**

***DEVELOPMENT OF A 3D CORNEAL WOUND
HEALING EXPERIMENTAL MODEL: HELPING TO
STUDY NEW DRUGS***

Presentada por **Mario Crespo Moral** para optar al grado de
Doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por: Dra. Yolanda Diebold Luque

Valladolid, 2022

AUTORIZACIÓN DE LA DIRECTORA DE LA TESIS



Universidad de Valladolid



Impreso 1T

AUTORIZACIÓN DE LA DIRECTORA DE TESIS

(Art. 7.2 de la Normativa para la presentación y defensa de la Tesis Doctoral en la UVa)

D^a Yolanda Diebold Luque, con D.N.I. 05395644M, Profesora Titular del Departamento de Cirugía, Oftalmología, Otorrinolaringología y Fisioterapia (Área Oftalmología) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, con dirección a efecto de notificaciones en el Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), Universidad de Valladolid, Paseo de Belén 17, 47011, Valladolid, y con e-mail yol@ioba.med.uva.es

Como Directora de la Tesis Doctoral titulada "Desarrollo de un modelo de experimentación tridimensional de cicatrización corneal: facilitando el estudio de nuevos fármacos" / "Development of a 3D corneal wound healing experimental model: helping to study new drugs" realizada por **D. Mario Crespo Moral**, con D.N.I. 12402220E, alumno del Programa de Doctorado en Ciencias de la Visión de la Universidad de Valladolid

Autoriza su presentación, considerando que es APTA para su defensa.

D^a Yolanda Diebold Luque¹:

- ✓ Declara que cumple los requisitos para poder ejercer la dirección de la tesis doctoral que establecen el RD 99/2011 (modificado por el RD 195/2016) y el Acuerdo del Comité de Dirección de la Escuela de Doctorado de la Universidad de Valladolid del 17 de febrero de 2014, es decir, que posee "al menos un período de actividad investigadora reconocido de acuerdo con las previsiones del RD 1086/1989 de 28 de agosto"².

Valladolid, 20 de enero de 2022

La Directora de la Tesis,

DIEBOLD
LUQUE MARIA
YOLANDA - DNI
05395644M

Firmado digitalmente
por DIEBOLD LUQUE
MARIA YOLANDA - DNI
05395644M
Fecha: 2022.01.20
18:40:48 +01'00'

Fdo.: Dra. Yolanda Diebold Luque


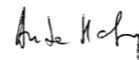

SR/SRA. PRESIDENTE/A DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO

¹ Esta declaración deben realizarla todos los codirectores de la tesis, en el caso de que haya más de un director.

² En el caso de que la figura contractual no sea evaluable por tramos o se trate de un profesor de una universidad extranjera, deberá haber aportado a la Comisión académica del Programa de doctorado un CV u otro documento acreditativo de poseer méritos equivalentes a un tramo de actividad investigadora.

CERTIFICADO DE ESTANCIA EN UNA INSTITUCIÓN EXTRANJERA / *CERTIFICATE OF STAY IN A FOREIGN INSTITUTION*

CERTIFICADO DE ESTANCIA EN UNA INSTITUCIÓN EXTRANJERA CERTIFICATE OF STAY IN A FOREIGN INSTITUTION

1. Becario/ Applicant:
Nombre y apellidos/ Name: Mario Crespo Moral
D.N.I./ National identity Card: 12402220-E
Centro de aplicación de la beca/ Home Institución: Universidad de Valladolid-IOBA
2. Centro en el que se ha realizado la estancia/ Host institution:
Nombre/ Name: University of Zagreb - Department of Pharmaceutical Technology
Dirección/ Adress: A. Kovačića, 1
Localidad/ Country: Zagreb, Croatia
3. Investigador responsable en el centro de la estancia/ Responsible person in the Host
Institución/ Institution: University of Zagreb
Nombre/ Name: Jelena Filipović-Grčić
Cargo/ Post: Head of the department of pharmaceutical technology
<p>CERTIFICO: que el becario arriba mencionado ha realizado una estancia en este centro en las siguientes fechas: desde ____/____/____ hasta ____/____/____</p> <p>THIS IS TO CERTIFY: that the above mentioned person has performed a stay in this Institution in the following dates: From: <u>07/09/17</u> To: <u>09/12/17</u></p> <p style="text-align: center;">Lugar y fecha: City and date:</p>
<p>Firma y Sello/ Signature & Stamp</p> <div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="margin-right: 20px;">  </div> <div style="margin-right: 20px;">  </div> <div style="border: 1px solid black; border-radius: 50%; padding: 10px; text-align: center;">  </div> </div>

AGRADECIMIENTOS / ACKNOWLEDGMENTS

Durante mucho tiempo he pensado que nunca llegaría a escribir estas palabras y, de hecho, si lo estoy haciendo es gracias a todos vosotros, ya que de una forma o de otra habéis colaborado para llevarme hasta este punto.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mi directora de Tesis. Muchas gracias, Yolanda, gracias por tu esfuerzo, por tu infinita paciencia y por haberme guiado durante todo este tiempo. Gracias por haberme dado la oportunidad de conocer la CIENCIA, por haber estado apoyándome durante esos momentos difíciles que hemos vivido, y por tener siempre unas palabras de ánimo que dedicarme para que pudiera seguir adelante con este trabajo de tesis.

Gracias también al director del IOBA, el Dr. Maldonado, ya que gracias a su apoyo y confianza en mí como investigador pude mantenerme unido al IOBA hasta comenzar el desarrollo de esta tesis. Me gustaría también dar las gracias a la Dra. Calonge y al profesor Pastor por haber tenido la idea y las agallas de crear el IOBA, un instituto en el que disfrutar de grandes ejemplos de lo que implica ser un gran profesional dedicado en cuerpo y alma a la clínica, la docencia y la investigación, como lo son ellos tres.

Por supuesto también he de dar las gracias a mi supervisora en el extranjero, la Dra. Jelena Filipović-Grčić. Muchas gracias por la oportunidad y por acogerme en su grupo de investigación como a uno más del equipo. De ese equipo me gustaría destacar a las Dras. Jasmina Lovrić y Anita Hafner por toda su ayuda a nivel científico, a Sabina por haberme enseñado como se vive en Croacia, y a Bisera, gracias por preocuparte de que mi estancia con vosotros fuera lo mejor posible, tanto en el laboratorio como fuera de él.

Como no, también me gustaría agradecer a los Dres. Jesús Pintor (tristemente fallecido en 2019), Gonzalo Carracedo, Fernando Huete y Hanan

Awad Alcozi, de la Universidad Complutense de Madrid por su importante colaboración e implicación en la realización de esta tesis.

Quiero dar las gracias a todos los compañeros que habeis ido recorriendo este viaje conmigo, ha sido mucho tiempo y muchos los que habéis ido pasando por los puestos de la biblioteca: Amar, Marichechu, Toni, Marisa, María, Marina, Ana, Sara, Vicente, Jose, Mariluz, Albertito, Cristina, Elena, Amanda, Alfredo, Marta, Andrea, Nikos, Laura y Pablo, y muchos los ratos que hemos pasado tomando café, hablando de nuestros problemas (en su mayoría científicos) y ayudándonos los unos a los otros. Como habréis visto, faltan aún algunos compañeros, faltan los miembros del NanoTeam. Muchas gracias equipo, habéis sido un gran referente, y un ejemplo a seguir, si bien no siempre lo he conseguido. Muchas gracias a la Dra. Contreras, por tu alegría y desparpajo contagiosos; a Isa, por haberme enseñado que si creo en algo he de mantenerme firme en ello y seguir buscando hasta que aparezca, o no; a Soriano, por haber recorrido este camino durante tanto tiempo conmigo y haberme ayudado con el mundo de la biología; a Jesús, por aportar ese punto de vista diferente al equipo que tantas veces hace falta; a Luna, por enseñarme que el esfuerzo al final tiene su recompensa; y muy especialmente, gracias a García y a Antonio, sin vosotros nunca lo habría conseguido. ¡Cuánto he echado de menos las reuniones de los viernes!

Muchas gracias también al resto de personas que hacéis del IOBA una pequeña-gran familia, a los Dres. López y Nieto por sus consejos, a Carmen, Maripaz, Ana, Nieves, y Charli por todo lo que me habéis enseñado y/o ayudado a lo largo de estos años.

Y, por supuesto, gracias a mi familia. Gracias a mis padres por haber estado empujándome por el camino para que no desistiera, a mis hermanos, a mis primos y a mi sobrinillo, por todos los buenos y malos momentos que hemos pasado juntos, y por los que pasaremos, a mis tíos/as por haberme ayudado

a no perder el objetivo, especialmente a ti, Je, que si no hubiera sido por tu insistencia ... También, me gustaría dar las gracias de forma muy especial a mis abuelas, que con su trabajo y esfuerzo han construido estas vidas que tanta felicidad me han dado.

Cómo no, me gustaría dar las gracias a mis amigos, tanto a los de Ciguñuela, como a los de Zaratán, y a esa otra familia que formamos Okurwa, ya que siempre puedo contar con vosotros, y da igual el tiempo que pasemos sin vernos, que cuando conseguimos juntarnos es como si hubiéramos estado tomando unas cañas el día anterior.

Por último, quiero darte las gracias a ti, Sonia, y a la familia que estamos creando. Gracias por ser como eres, por tu apoyo incondicional, por tu paciencia infinita, por aguantarme en mis malos momentos y por disfrutar conmigo al máximo de los buenos, gracias, en definitiva, porque me haces ser mejor. Y gracias, como no, a ti, Dafne, porque con tu alegría llenas nuestra casa, porque eres la fuente de energía, que hace que, aunque haya que despertarse a darte el bibi por las noches, al día siguiente nos levantemos con ganas de dar un paso más, y de darlo cada vez más grande y de hacerlo todos juntos. Os amo.

En definitiva, gracias a todas y cada una de las personas que me habéis acompañado a lo largo de estos años, porque ya haya sido en el apartado personal, en el profesional, o en ambos, me habéis ido guiando poco a poco hasta llegar a este punto.

A mis familias, tanto de las que provengo,
como a la que estamos construyendo.

“La felicidad puede ser hallada, incluso en los momentos más oscuros, si uno solo se acuerda de encender la luz”

“Happiness can be found, even in the darkest of times, if one only remembers to turn on the light”

- Albus Dumbledore. “Harry Potter and the Prisoner of Azkaban” J.K. Rowling

ÍNDICE / TABLE OF CONTENTS

Prefacio / Preface	1
Biografía breve	3
<i>Biographical sketch</i>	4
Financiación	5
<i>Funding</i>	7
Contribuciones científicas	9
<i>Scientific dissemination</i>	13
Abreviaturas / <i>Abbreviations</i>	17
Resumen de la Tesis en español	21
Sinopsis del trabajo	23
Organización de la tesis doctoral	25
Introducción	29
1. Concepto de superficie ocular	29
2. Regeneración del epitelio corneal	34
3. Modelos de estudio de la regeneración corneal	36
4. Melatonina y regeneración corneal	38
5. Tratamientos farmacológicos oculares	39
6. La melatonina como tratamiento ocular	43
Justificación	47
Hipótesis	49
Objetivos	49
Material y métodos	51
1. Obtención y preparación de los globos oculares	51
2. Análisis morfológico de los tejidos de la so porcina	55
3. Evaluación de la funcionalidad del modelo <i>ex vivo</i>	59
4. Preparación y caracterización de nanopartículas cargadas con melatonina	61

5. Análisis estadístico	62
Resultados y discusión	63
Estudio 1. Caracterización histológica e inmuno-histoquímica de la superficie ocular porcina.	63
Estudio 2. Detección de los receptores de melatonina MT ₁ y MT ₂ y de su molécula precursora aanat.	64
Estudio 3. Establecimiento y caracterización del modelo.	66
Estudio 4. Evaluación de la cicatrización corneal tras la exposición a diferentes sustancias moduladoras.	67
Estudio 5. Evaluación de la cicatrización corneal tras exposición a diferentes formulaciones de melatonina.	68
Conclusiones	71
<i>Thesis Report Summary in English</i>	73
<i>Abstract</i>	75
<i>Thesis report structure</i>	77
<i>Introduction</i>	81
1. <i>Ocular surface concept</i>	81
2. <i>Regeneration of the corneal epithelium</i>	85
3. <i>Corneal wound healing models</i>	88
4. <i>Melatonin and corneal wound healing</i>	90
5. <i>Ocular pharmacological treatments</i>	91
6. <i>Melatonin as an eye treatment</i>	95
<i>Motivation</i>	97
<i>Hypothesis</i>	99
<i>Objectives</i>	99
<i>Materials and methods</i>	101
1. <i>Preparation of porcine eyeballs</i>	101
2. <i>Morphological analysis of porcine os tissues</i>	105
3. <i>Evaluation of the functionality of the ex vivo model</i>	108

4. <i>Preparation and characterization of np formulations loaded with melatonin</i>	110
5. <i>Statistical analysis</i>	111
<i>Results and discussion</i>	113
<i>Study 1. Histological and immunohistochemical characterization of the porcine ocular surface.</i>	113
<i>Study 2. Detection of MT1 and MT2 melatonin receptors and their precursor molecule aanat on the porcine ocular surface.</i>	114
<i>Study 3. Establishment and characterization of the model.</i>	116
<i>Study 4. Evaluation of corneal healing after exposure to different modulating molecules.</i>	117
<i>Study 5. Evaluation of corneal wound healing after exposure to different melatonin formulations.</i>	118
<i>Conclusions</i>	121
<i>Bibliografía / References</i>	123
<i>Study 1. Histological and immunohistochemical characterization of the porcine ocular surface</i>	137
Estudio 2. Detección de los receptores de melatonina MT₁ y MT₂ y de su molécula precursora aanat en la superficie ocular porcina	141
Resumen	143
Introducción	145
Material y métodos	146
Resultados	151
Discusión	156
Bibliografía	158
Estudio 3. Establecimiento y caracterización del modelo	163
Resumen	163
Introducción	165
Material y métodos	166
Resultados	169

Discusión	176
Bibliografía	177
Estudio 4. Evaluación de la cicatrización corneal tras la exposición a diferentes sustancias moduladoras	181
Resumen	181
Introducción	183
Material y métodos	184
Resultados	188
Discusión	189
Bibliografía	191
<i>Study 5. Evaluation of melatonin effect on corneal wound healing</i>	197
<i>Abstract</i>	199
<i>Introduction</i>	201
<i>Material and methods</i>	202
<i>Results and discussion</i>	207
<i>References</i>	212
Limitaciones	217
Futuras investigaciones	218
<i>Limitations</i>	219
<i>Future work</i>	220
Conclusiones	223
<i>Conclusions</i>	224

Prefacio / *Preface*

BIOGRAFÍA BREVE

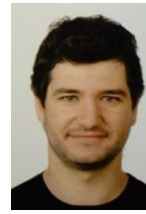


Diplomado en Óptica y Optometría por la Universidad de Valladolid en 2009.

Comencé mi contacto con la investigación gracias a cursar en el Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA) el Máster en Investigación en Ciencias de la Visión y a realizar mi Trabajo Fin de Máster bajo la dirección de la Dra. Yolanda Diebold Luque. Tras finalizar el Máster conseguí adentrarme más en la investigación gracias a que fui contratado como investigador en formación para participar en la realización del proyecto “Combinación de hidrogeles biomiméticos y nanopartículas (NPs) como plataformas terapéuticas avanzadas para enfermedades oculares (BioHydroNano)” y posteriormente como investigador iniciado para colaborar en la realización del proyecto “Evolución de un nuevo método de diagnóstico no invasivo de la córnea a través de la medición de la bioimpedancia utilizando micro-nano-tecnologías. Parte II (CORBI II)”. Posteriormente he podido seguir formándome como investigador predoctoral en el Programa de Doctorado en Ciencias de la Visión dentro del Grupo de Investigación Reconocido (GIR) de Superficie Ocular del IOBA-UVa, centrando mi investigación en el desarrollo y caracterización de un modelo *ex vivo* de cicatrización corneal.

Durante mi formación doctoral he podido realizar una estancia de 3 meses en el Departamento de Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Zagreb (Zagreb, Croacia) y he asistido a los congresos internacionales de la *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO) en los años 2016 y 2017. También he podido colaborar en tareas docentes del Grado en Óptica y Optometría y en el Máster en Rehabilitación Visual, y he sido parte del Consejo de Instituto del IOBA, del Comité de Dirección de la EsDUVa, del Comité Ético de la UVa y del Comité de Empresa del PDI de la UVa.

BIOGRAPHICAL SKETCH



Graduated in Optics and Optometry by the University of Valladolid in 2009.

My first contact with research was at the Institute of Applied Ophthalmobiology (IOBA) when I studied the Master's Degree in Research in Visual Sciences. I did my Master's Thesis under the direction of Dr. Yolanda Diebold. After finishing the Master's Degree, I managed to continue doing research thanks to be hired as a researcher in training to collaborate in the project "Combination of biomimetic hydrogels and nanoparticles as advanced therapeutic platforms for eye diseases (BioHydroNano)" and later as initiated researcher to collaborate in the project "Evolution of a new method of non-invasive diagnosis of the cornea through the measurement of bioimpedance using micro-nano-technologies. Part II (CORBI II)". Subsequently, I was able to continue my training as a predoctoral student in the Doctoral Programme in Visual Sciences as a member of the IOBA-UVa Ocular Surface Research Group, focusing my research on the development and characterization of an *ex vivo* model of healing corneal.

During my doctoral training I was able to carry out a 3-month stay at the Department of Pharmaceutical Technology of the University of Zagreb (Zagreb, Croatia). Also, I attended twice the International Congresses of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) in 2016 and 2017. I was also able to collaborate in teaching tasks of the Degree in Optics and Optometry and in the Master's Degree in Visual Rehabilitation. Finally, I have been part of the IOBA Institute Council, the EsDUVa Management Committee, the UVa Ethics Committee and the UVa PDI Company Committee until 2021.

FINANCIACIÓN

El trabajo de investigación de esta tesis ha sido posible gracias a la financiación conseguida con los siguientes proyectos:

- Desarrollo de aproximaciones terapéuticas basadas en plataformas nanotecnológicas avanzadas diseñadas específicamente para combatir la ceguera corneal (NanoCorneal). Ministerio de Economía y Competitividad (Ref.: CICYT MAT2013-47501-C02-1-R). Duración: 01/01/2014 - 31/12/2017. Investigador responsable: Dra. Yolanda Diebold Luque (IOBA-UVa)
- *Delivery* de exosomas artificiales para el tratamiento de enfermedades oculares conducentes a la ceguera (ARTEX4EYE). Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (Ref.: RTI2018-094071-B-C21). Duración: 01/01/2019 – 31/12/2022. Investigadoras responsables: Dra. Yolanda Diebold Luque y Dra. Laura García Posadas (IOBA-UVa)

Además, en lo concerniente a la financiación personal, he podido disfrutar de las siguientes ayudas económicas para mi formación y el desarrollo de esta Tesis Doctoral:

- Ayuda de viaje concedida por la *Science Foundation Ireland*. Asistencia y participación en el *Workshop New Frontiers in Ocular Therapeutics* celebrado en la *University College Dublin* (junio 2018)
- Ayudas para estancias breves en el desarrollo de tesis doctorales de la Universidad de Valladolid (convocatoria 2017). Estancia breve en el Departamento de Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Zagreb, Zagreb, Croacia. Duración: 3 meses (07/09/2017-09/12/2017)
- Ayuda de movilidad para prácticas en empresas ERASMUS+. Realización de prácticas de investigación en el Departamento de Tecnología

Prefacio / *Preface*

Farmacéutica de la Universidad de Zagreb, Zagreb, Croacia. Duración: 3 meses (07/09/2017-09/12/2017)

- Ayudas para financiar la contratación predoctoral de personal investigador de la Junta de Castilla y León y el Fondo Social Europeo (convocatoria 2015). Investigador predoctoral contratado en el IOBA-UVa. Duración: 4 años y un mes (24/11/2015-29/12/2019)

FUNDING

The research work of this thesis has been possible thanks to the funding obtained with the following projects:

- Development of therapeutic approaches based on novel advanced nanotechnological platforms specifically designed to fight corneal blindness (NanoCorneal). Ministry of Economy and Competitiveness (Ref.: CICYT MAT2013-47501-C02-1-R). Duration: 01/01/2014 - 12/31/2017. Responsible researcher: Dr. Yolanda Diebold Luque (IOBA-UVa)
- Delivery of artificial exosomes to treat blinding eye diseases (ARTEX4EYE). Ministry of Science, Innovation and Universities (Ref.: RTI2018-094071-B-C21). Duration: 01/01/2019 – 12/31/2022. Responsible researchers: Dr. Yolanda Diebold Luque and Dr. Laura García Posadas (IOBA-UVa)

In addition, I received financial support for my training and the development of this Doctoral Thesis from the following:

- Travel grant awarded by the Science Foundation Ireland. Attendance and participation in the New Frontiers in Ocular Therapeutics Workshop held at University College Dublin (June 2018)
- Grant for short stays during the development of doctoral theses at the University of Valladolid (2017 call). Short stay at the Department of Pharmaceutical Technology of the University of Zagreb, Zagreb, Croatia. Duration: 3 months (09/07/2017-12/09/2017)
- Mobility grant for internships in ERASMUS+ companies. Realization of research practices in the Department of Pharmaceutical Technology of the University of Zagreb, Zagreb, Croatia. Duration: 3 months (09/07/2017-12/09/2017)

Prefacio / *Preface*

- A 4 year contract for predoctoral training of research staff from the Junta de Castilla y León and the European Social Fund (2015 call). Predoctoral researcher hired at the IOBA-UVa. Duration: 4 years and one month (11/24/2015-12/29/2019)

CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS

Este trabajo de tesis ha dado lugar a la siguiente publicación:

- Crespo-Moral M, García-Posadas L, López-García A, Diebold Y. Histological and immunohistochemical characterization of the porcine ocular surface. *Plos one*. 2020 Jan 13;15(1):e0227732. Índice de Impacto (JCR 2020) = 3,24; Posición de la revista y área: 26/73 Multidisciplinary Science (**Q2**)

Además, los protocolos desarrollados para la utilización de los globos oculares porcinos han sido puestos en práctica y han formado parte de los experimentos realizados en las siguientes publicaciones:

- Jurišić Dukovski B, Juretić M, Bračko D, Randjelović D, Savić S, **Crespo-Moral M**, Diebold Y, Filipović-Grčić J, Pepić I, Lovrić J. Functional ibuprofen-loaded cationic nanoemulsion: Development and optimization for dry eye disease treatment. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020 Feb 21;576:118979. Índice de Impacto (JCR 2020) = 5,875; Posición de la revista y área: 36/275 Pharmacology & Pharmacy (**Q1**)
- Soriano-Romaní L, Vicario-de-la-Torre M, **Crespo-Moral M**, López-García A, Herrero-Vanrell R, Molina-Martínez IT, Diebold Y. Novel anti-inflammatory liposomal formulation for the pre-ocular tear film: *In vitro* and *ex vivo* functionality studies in corneal epithelial cells. *Experimental Eye Research*. 2017 Jan;154:79-87. Índice de Impacto (JCR 2017) = 3,152; Posición de la revista y área: 14/59 Ophthalmology (**Q1**)

También ha dado lugar a las siguientes comunicaciones en congresos internacionales:

- **Mario Crespo-Moral**; Laura Soriano-Romani; Antonio López-García; Yolanda Diebol. Título: *“An ex vivo model using porcine eyeballs for wound healing studies”*. Presentación tipo póster en el congreso: ARVO 2017 Annual Meeting (Baltimore, Md, USA), del 7 al 11 de mayo de 2017. Publicado: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2017; 58(8):164.
- **Mario Crespo-Moral**; Hanan Awad Alkozi; Antonio López-García; Jesus J Pintor; Yolanda Diebold. Título: *“Melatonin receptors are present in the porcine ocular surface and are involved in ex vivo corneal wound healing”*. Presentación tipo póster en el congreso: ARVO 2018 Annual Meeting (Honolulu, Hawaii, USA), del 29 de abril al 3 de mayo de 2018. Publicado: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2018; 59(9):4371.
- **Mario Crespo-Moral**; Hanan Awad Alkozi; Antonio López-García; Jesus J Pintor; Yolanda Diebold. Título: *“Involvement of melatonin receptors in the ex vivo porcine ocular surface wound healing”*. Presentación oral en el Workshop: New Frontiers in Ocular Therapeutics organizado por el Conway Institute de la University College Dublin (Dublin, Irlanda), del 7 al 8 de junio de 2018.
- Yolanda Diebold; Laura García-Posadas; Antonio López-García **Mario Crespo-Moral**. *“Morphofunctional study of porcine ocular surface for preclinical research”*. Presentación tipo póster en el congreso: ARVO 2019 Annual Meeting (Vancouver, B.C., Canada), del 28 de abril al 2 de mayo de 2019. Publicado: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2019; 60(9):6266.

Finalmente, esta tesis también ha dado lugar a varios artículos de divulgación científica:

- Mario Crespo Moral, Laura García Posadas, Antonio López García, Yolanda Diebold Luque. Caracterización Histológica e Inmunohistoquímica de la Superficie Ocular Porcina. Revista "Gota a Gota", editada por la Asociación Española del Síndrome de Sjögren (AESS). Volumen: Edición XVI. Páginas, inicial: 26, final: 28 (Año 2020). Lugar de publicación: Madrid (NILO Industria Gráfica, S.A.).
- Manuel Belver. "Cerdos y humanos, un poco más parecidos". El Día de Valladolid, 13 de junio de 2020.
- Estíbaliz Lera. "La mirilla de la investigación". Suplemento Innovadores, El Mundo de Castilla y León, 23 de junio de 2020.

SCIENTIFIC DISSEMINATION

Publications out of this thesis:

- Crespo-Moral M, García-Posadas L, López-García A, Diebold Y. Histological and immunohistochemical characterization of the porcine ocular surface. *Plos one*. 2020 Jan 13;15(1):e0227732. Impact Factor (JCR 2020) = 3,24; Journal position and area: 26/73 Multidisciplinary Science (**Q2**)

In addition, the protocols developed for the use of porcine eyeballs were part of the experimental setup in the following publications:

- Jurišić Dukovski B, Juretić M, Bračko D, Randjelović D, Savić S, **Crespo-Moral M**, Diebold Y, Filipović-Grčić J, Pepić I, Lovrić J. Functional ibuprofen-loaded cationic nanoemulsion: Development and optimization for dry eye disease treatment. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020 Feb 21;576:118979 Impact Factor (JCR 2020) = 5,875; Journal position and area: 36/275 Pharmacology & Pharmacy (**Q1**)
- Soriano-Romaní L, Vicario-de-la-Torre M, **Crespo-Moral M**, López-García A, Herrero-Vanrell R, Molina-Martínez IT, Diebold Y. Novel anti-inflammatory liposomal formulation for the pre-ocular tear film: *In vitro* and *ex vivo* functionality studies in corneal epithelial cells. *Experimental Eye Research*. 2017 Jan;154:79-87. Impact Factor (JCR 2017) = 3,152; Journal position and area: 14/59 Ophthalmology (**Q1**)

International congress contributions:

- **Mario Crespo-Moral**; Laura Soriano-Romani; Antonio López-García; Yolanda Diebol. Título: *“An ex vivo model using porcine eyeballs for wound healing studies”*. Poster presentation at the congress: ARVO 2017 Annual Meeting (Baltimore, Md, USA), 7 to 11 of May 2017. Published: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2017; 58(8):164.
- **Mario Crespo-Moral**; Hanan Awad Alkozi; Antonio López-García; Jesus J Pintor; Yolanda Diebold. Título: *“Melatonin receptors are present in the porcine ocular surface and are involved in ex vivo corneal wound healing”*. Poster presentation at the congress: ARVO 2018 Annual Meeting (Honolulu, Hawaii, USA), 29 April to 3 May 2018. Published: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2018; 59(9):4371.
- **Mario Crespo-Moral**; Hanan Awad Alkozi; Antonio López-García; Jesus J Pintor; Yolanda Diebold. Título: *“Involvement of melatonin receptors in the ex vivo porcine ocular surface wound healing”*. Oral presentation at the workshop: New Frontiers in Ocular Therapeutics organized by Conway Institute of the University College Dublin (Dublin, Irlanda), 7 and 8 of June 2018.
- Yolanda Diebold; Laura García-Posadas; Antonio López-García **Mario Crespo-Moral**. *“Morphofunctional study of porcine ocular surface for preclinical research”*. Poster presentation at the congress: ARVO 2019 Annual Meeting (Vancouver, B.C., Canada), 28 April to 2 May 2019. Published: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2019; 60(9):6266.

Scientific communications to the lay public:

- Mario Crespo Moral, Laura García Posadas, Antonio López García, Yolanda Diebold Luque. *Caracterización Histológica e Inmunohistoquímica de la Superficie Ocular Porcina*. Journal *“Gota a Gota”*, edited by the Sjögren Syndrome Spanish Association (AESS).

Volume: XVI Edition. Pages, initial: 26, final: 28 (year 2020).
Publishing location: Madrid (NILO Industria Gráfica, S.A.).

- Manuel Belver. "*Cerdos y humanos, un poco más parecidos*". El Día de Valladolid newspaper, 13 June 2020.
- Estíbaliz Lera. "*La mirilla de la investigación*". Suplement Innovadores, of the newspaper "*El Mundo de Castilla y León*", 23 June 2020.

ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS

AANAT	Aralquilamina N-acetiltransferasa	<i>Aralkylamine N-acetyltransferase</i>
AB/PAS	Tinción de azul alcian y ácido peryódico de Schiff	<i>Alcian blue and periodic acid-Schiff staining</i>
ANOVA	Análisis de la varianza	<i>Analysis of Variance</i>
Anti-Anti	Mezcla comercial de antibiótico y antimicótico	<i>Commercial mixture of antibiotic and antimicrobial</i>
BCA	Ácido bicinónico	<i>Bicinchoninic acid</i>
CALT	Tejido linfoide asociado a la conjuntiva	<i>Conjunctival associated lymphoid tissue</i>
CD	Grupo de diferenciación	<i>Cluster of differentiation</i>
CF o DL	Carga de fármaco	<i>Drug loading</i>
DMEM/F12	Medio Eagle modificado por Dulbecco suplementado con F12	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
EE	Eficacia de encapsulación	<i>Encapsulation efficiency</i>
EGF	Factor de crecimiento epidérmico	<i>Epidermal growth factor</i>
FAE	Epitelio asociado a un folículo	<i>Follicle associated epithelium</i>
FBS	Suero fetal bovino	<i>Fetal bovine serum</i>
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos	<i>Fibroblast growth factor</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
GCD	Densidad de células caliciformes	<i>Goblet cell density</i>
H-E	Tinción de hematoxilina y eosina	<i>Hematoxylin and eosin staining</i>

Prefacio / Preface

HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HEVs	Vénulas de endotelio alto	<i>High endothelial venules</i>
HPA	<i>Helix pomatia</i> aglutinina	<i>Helix pomatia agglutinin</i>
IL	Interleuquina	<i>Interleukin</i>
IMF	Inmunofluorescencia	<i>Immunofluorescence</i>
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas	<i>Mucosa associated lymphoid tissue</i>
MPPs	Metaloproteinasas	<i>Metalloproteinase</i>
MUC5AC	Mucina 5AC	<i>Mucin 5AC</i>
NPs	Nanopartículas	<i>Nanoparticles</i>
NP-L	Nanopartículas blancas de lecitina	<i>Blank lecithin nanoparticles</i>
NP-L Mel	Nanopartículas de lecitina cargadas con melatonina	<i>Melatonin loaded lecithin nanoparticles</i>
NP-L+Q o NP-L+C	Nanopartículas blancas de lecitina/quitosano	<i>Blank lecithin/chitosan nanoparticles</i>
NP-L+Q Mel o NP-L+C Mel	Nanopartículas de lecitina quitosano cargadas con melatonina	<i>Melatonin loaded lecithin/chitosan nanoparticles</i>
PBS	Tampón fosfato salino	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDI	Polidispersidad	<i>Polydispersity</i>
PNA	<i>Arachis hypogaea</i> aglutinina	<i>Arachis hypogaea agglutinin</i>
RIPA	Ensayo de radioinmunoprecipitación	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
rpm	Revoluciones por minuto	<i>Revolutions per minute</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	Error estándar de la media	<i>Standard error of the mean</i>

SO o OS	Superficie ocular	<i>Ocular surface</i>
TA o RT	Temperatura ambiente	<i>Room temperature</i>
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TRITC	Tetrametilrodamina	<i>Tetramethylrhodamine</i>
TSP-1	Trombospondina 1	<i>Trombospondin 1</i>
uPa	Activador del plasminógeno tipo uroquinasa	<i>Urokinase-type plasminogen activator</i>
WB	<i>Western blotting</i>	<i>Western blotting</i>

Resumen de la Tesis en español

SINOPSIS DEL TRABAJO

En esta tesis doctoral se presenta un modelo *ex vivo* porcino de cicatrización corneal. Es necesario desarrollar este tipo de modelos para reducir el número de animales experimentales utilizados en la investigación en general y en la que afecta a la superficie ocular, en particular.

En primer lugar, se realizó un estudio de la superficie ocular (SO) porcina desde el punto de vista histopatológico que permitiera confirmar que los hallazgos que se derivasen de la tesis podrían ser extrapolables al ser humano. Para ello se utilizaron exenteraciones oculares junto con sus párpados de animales que habían sido sacrificados para consumo humano.

Seguidamente, se refinó un protocolo para dañar el epitelio corneal porcino y cultivar los anillos esclerocorneales durante un tiempo suficiente para que se produjera una cicatrización completa del tejido epitelial. Estas heridas fueron expuestas a diferentes moléculas para evaluar el efecto que estas producían en el proceso de cicatrización del epitelio corneal.

Una de las moléculas evaluadas ha sido la melatonina, que previamente había demostrado favorecer la cicatrización corneal en un modelo de daño corneal en conejo. Previo a exponer el modelo desarrollado a la melatonina, se realizó un estudio completo de la distribución de sus receptores principales (MT₁ y MT₂) y de la molécula precursora de la melatonina (AANAT) en la SO porcina. Se expuso el modelo *ex vivo* de cicatrización corneal a la melatonina, tanto en solución como encapsulada en NPs.

Los resultados obtenidos en los distintos estudios realizados confirman la similitud entre la SO del ojo porcino y del humano, así como la utilidad de este tipo de modelos para evaluar el potencial de nuevos fármacos dirigidos a la SO, a la vez que se reduce el número de animales de experimentación utilizados.

ORGANIZACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

La tesis se presenta en la modalidad “ordinaria” y opta a la mención de “Doctor Internacional”, por lo que se organiza siguiendo la Normativa para la presentación y defensa de la tesis doctoral en la Universidad de Valladolid (BOCYL de 15 de junio de 2016) para dichas modalidades. Parte de la tesis ha sido redactada en castellano y parte en inglés, si bien, para que esta pueda ser bien comprendida en ambos idiomas se incluyen dos resúmenes, uno en cada lengua que contienen los apartados principales de la tesis. Para una mejor comprensión de la tesis doctoral se ha redactado una introducción específica, que se espera ayude a seguir la relación temática de los estudios.

El cuerpo de la tesis está formado por **5 Estudios** que se agrupan en **3 Capítulos**. El Capítulo 1 se centra en la descripción anatómica del ojo porcino, el Capítulo 2 en el establecimiento de un modelo de cicatrización epitelial corneal con dicho material y de su utilización para evaluar la acción sobre la córnea de diferentes moléculas y fármacos, mientras que el Capítulo 3 versa sobre la utilización de la melatonina como acelerador de la cicatrización corneal en dicho modelo.

El **Estudio 2** ha sido realizado en colaboración con los Dres. Jesús J. Pintor Just, Hanan Alkozi, J. Gonzalo Carracedo Rodríguez y Fernando Huete Toral del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Óptica y Optometría de la Universidad Complutense de Madrid.

El **Capítulo 3** fue realizado durante la estancia de tres meses efectuada en el Departamento de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Zagreb (Croacia), bajo la supervisión de la Dra. Jelena Filipović-Grčić, cumpliendo de esta forma con los requisitos para optar a la mención de “Doctor internacional”.

Los títulos de los estudios y su relación con los distintos objetivos de la tesis se presentan a continuación de forma esquemática:

Capítulo 1. Análisis histológico de la superficie ocular porcina.

Estudio 1. Caracterización histológica e inmunohistoquímica de la superficie ocular porcina.

OBJETIVO 1. *Estudio realizado en la UVa*

Estudio 2. Detección de los receptores de melatonina MT₁ y MT₂ y de su molécula precursora AANAT en la superficie ocular porcina.

OBJETIVO 2. *Estudio realizado en colaboración con la UCM*

Capítulo 2. Desarrollo de un modelo *ex vivo* de cicatrización corneal.

Estudio 3. Establecimiento y caracterización del modelo.

OBJETIVO 3. *Estudio realizado en la UVa*




Estudio 4. Evaluación de la cicatrización corneal tras la exposición a diferentes sustancias moduladoras.

OBJETIVO 4. *Estudio realizado en la UVa*

Capítulo 3. Evaluación del efecto de la melatonina en la cicatrización corneal.

Estudio 5. Evaluación de la cicatrización corneal tras exposición a diferentes formulaciones de melatonina.

OBJETIVO 5. *Estudio realizado en colaboración con la Universidad de Zagreb (Croacia)*

<p>Análisis histológico</p>	<p>Modelo <i>ex vivo</i> de cicatrización corneal</p>	<p>Efecto de la melatonina en la cicatrización</p>
<p><u>Estudio 1:</u> Descripción morfológica de la superficie ocular porcina</p> <p><u>Estudio 2:</u> Detección de los receptores y el precursor de la melatonina</p>	<p><u>Estudio 3:</u> Establecimiento y caracterización del modelo</p> <p><u>Estudio 4:</u> Evaluación de la cicatrización corneal tras exposición a diferentes sustancias moduladoras</p>	<p><u>Estudio 5:</u> Evaluación de la cicatrización corneal tras exposición a diferentes formulaciones de melatonina</p>
		

INTRODUCCIÓN

1. CONCEPTO DE SUPERFICIE OCULAR

La evolución ha llevado a los humanos a desarrollar uno de los sistemas visuales más complejos de toda la naturaleza. Dentro de él interesa destacar para el propósito de esta tesis la denominada Unidad Funcional Lagrimal, descrita en 1998 (Stern et al., 1998). Esta unidad está compuesta por la SO, las glándulas que secretan los diferentes componentes de la lágrima, así como por los mecanismos de comunicación y regulación encargados de mantener su homeostasis. Dichos mecanismos involucran a los sistemas nervioso, hormonal, vascular e inmunitario. El complejo funcionamiento de esta unidad mantiene en un delicado equilibrio a todos los elementos integrantes del sistema para que funcione de forma correcta en todo momento. Se considera que es una unidad anatómica, histológica, fisiológica y patológica.

Dentro de la Unidad Funcional Lagrimal, la SO está compuesta por los epitelios de la córnea y la conjuntiva, la lágrima que los recubre, y el tejido conectivo subyacente. Su función principal es permitir que la luz penetre en el ojo con la menor distorsión posible para hacer llegar a la retina toda la información que esta contiene. También, como buena puerta de entrada, sirve para proteger lo que hay en su interior, constituyendo una primera barrera entre el entorno y el interior del ojo.

A continuación, se describen de forma breve las principales características de los componentes de la Unidad Funcional Lagrimal.

1.1. La película lagrimal

La película lagrimal o lágrima es el gel muco-acuoso que sirve de interfaz entre los tejidos de la SO y el exterior del ojo. Está compuesta por una capa

externa de origen lipídico, secretada por las glándulas de Meibomio, y una fase acuosa con consistencia de gel en la que se encuentran disueltas una enorme diversidad de péptidos y proteínas, entre las que destacan complejas glucoproteínas, como son las mucinas, enzimas y péptidos con actividad antimicrobiana (Pflugfelder y Stern, 2020).

1.2. La córnea

Es la estructura más altamente inervada de todo el cuerpo humano, lo que da una idea de lo importante que es que se mantenga sana para el correcto funcionamiento del sistema visual. Es un tejido transparente y altamente especializado, por lo que carece tanto de vasos sanguíneos como de linfáticos, así que sus requerimientos fisiológicos tienen que ser satisfechos por los medios que la rodean: la lágrima en su cara anterior y el humor acuoso en la posterior. La córnea es responsable de la mayor parte de la refracción ocular, de la transmisión y el enfoque de la luz en la retina. Desde el punto de vista anatómico, en el ser humano tiene una forma ligeramente ovalada, con un diámetro horizontal de 11,8 mm y un diámetro vertical de 11,2 mm, y su espesor va aumentando progresivamente desde los 500 μm de la zona central hasta los 650-700 μm de la periferia. Desde el punto de vista estructural, la córnea se divide en 5 capas: el epitelio, la capa de Bowman, el estroma, la membrana de Descemet y el endotelio (Fine y Yanoff, 1979).

El epitelio es la capa más externa de la córnea y tiene un grosor medio de 50 μm . Esta capa está en continua renovación generándose dos movimientos celulares, uno desde la zona del limbo, donde residen las células madre del epitelio corneal, hacia la córnea central y otro desde las capas más basales hasta las más externas. El epitelio de la córnea está compuesto por entre 5 y 7 capas de células que van cambiando su morfología a medida que van avanzando desde la capa basal hasta la capa más superficial, donde finalmente se desprenden. Estas diferencias morfológicas se corresponden

con 3 subtipos de células epiteliales diferentes presentes en las distintas capas: una capa de células basales con una forma columnar, 2 o 3 capas de células aladas o intermedias, y otras 2 o 3 capas de células escamosas con forma aplanada.

La capa de Bowman es una estructura acelular de 8 a 12 μm de espesor, situada debajo de la membrana basal del epitelio corneal. Su función principal es actuar como barrera frente a organismos que hayan conseguido atravesar la barrera epitelial. Se ha demostrado su existencia en el humano (Dewitt, 1931), en primates (Merandana et al., 2001; Hayashi et al., 2002), en determinados mamíferos ungulados, en leones marinos, en pez cebra, en codorniz y en gallina, pero no ha sido hallada en cánidos, felinos, conejos, cerdos, vacas, cabras ni caballos (Streeten et al., 1999; Merayo-Llives et al., 2001; Merandana et al., 2001; Hayashi et al., 2002; Marchan et al., 2002; Gealy et al., 2009; Miller et al., 2010; Gonçalves et al., 2016; Nautscher et al., 2016).

El estroma corneal es la capa de mayor grosor de la córnea, unos 500 μm en el ser humano, y representa en torno al 90% del tamaño total. Está compuesta principalmente por fibras de colágeno de tipos I y V, perfectamente distribuidas, orientadas y ordenadas en lamelas superpuestas que permiten tener un tejido completamente transparente. Este tejido es sintetizado y mantenido por los queratocitos que se encuentran distribuidos en todo el espesor estromal.

La membrana de Descemet es la membrana basal producida por el endotelio corneal, tiene un espesor entre 8 y 12 μm y está compuesta principalmente por fibronectina y colágeno IV.

Finalmente, el endotelio corneal es una monocapa de células que tapiza completamente la cara interior de la córnea. Su función principal es crear un nivel de deshidratación muy alto en el estroma corneal, para de esa forma

conseguir que las lamelas de colágeno que lo componen tengan una estructura fija que mantenga la transparencia y permita la correcta refracción de la luz. En el ser humano estas células no tienen capacidad mitótica, por lo que aquellas que van muriendo no son reemplazadas, obligando a las células vecinas a aumentar su tamaño para poder ocupar ese espacio y que su función de mantener el estroma deshidratado no se vea alterada. Este fenómeno se denomina polimegatismo.

1.3. El limbo esclerocorneal

El limbo esclerocorneal es la zona de transición entre la córnea, por un lado, y la esclerótica y la conjuntiva por otro. Tiene una anchura de entre 1 y 2 mm y rodea completamente a la córnea a modo de anillo. Es una zona de especial importancia, ya que en ella residen las células madre del epitelio corneal, imprescindibles para su continua renovación. Estas células se encuentran alojadas en un nicho especializado formado por unas estructuras en forma de crestas denominadas empalizadas de Vogt donde tienen un microambiente adecuado para mantener su fenotipo indiferenciado.

El epitelio limbar está compuesto por hasta 10 capas de células, de las cuales las 2 primeras se corresponderían con células escamosas, las 6-7 siguientes con células aladas, que se encuentran en un estado intermedio de diferenciación, mientras que la capa basal estaría constituida por células madre. Estas células madre tienen una alta capacidad proliferativa y capacidad de autorrenovación. Para ello se dividen de forma asimétrica, dando lugar a dos células hijas, una de las cuales mantiene las características de célula madre, mientras que la otra proseguirá migrando y diferenciándose a células del epitelio corneal (Zieske, 1994).

El estroma limbar es un tejido conectivo que posee una gran inervación y vascularización. Está formado principalmente por fibras de colágeno tipo IV y VII secretadas por las células estromales que lo componen, que en su

mayoría son fibroblastos con unas características similares a las de los queratocitos corneales. En el estroma limbar también se ha hallado una pequeña población de células madre mesenquimales (Polisetty et al., 2008), las cuales se cree que puedan tener dos funciones principales: ser responsables de la reposición de los queratocitos corneales y participar en el mantenimiento del fenotipo indiferenciado de las células madre epiteliales limbares.

1.4. La conjuntiva

La conjuntiva es el tejido mucoso que se extiende desde el limbo esclerocorneal hasta el margen palpebral, recubriendo tanto el globo ocular como el tarso palpebral. Anatómicamente se puede dividir en tres zonas: la zona bulbar que tapiza el globo ocular, la zona palpebral que recubre el tarso palpebral y la zona del fórnix o fondo de saco que une ambas regiones. Histológicamente la conjuntiva está compuesta por un epitelio estratificado escamoso no queratinizado y un estroma laxo (Snell et al., 2013).

En el epitelio conjuntival hay distintos subtipos de células epiteliales, entre las que se encuentran las de tipo I, que serían las células caliciformes, unas células altamente especializadas en la secreción de mucinas, y los tipos II-V, que son células escamosas estratificadas no caliciformes, también con cierta capacidad de secreción de mucinas, que representan entre un 85 y un 90% de todas las células epiteliales de la conjuntiva (Steuhl, 1989). Las células caliciformes son las responsables de secretar de forma específica la mucina MUC5AC, de enorme importancia en la homeostasis de la película lagrimal y cuyas alteraciones se correlacionan con patología de la SO.

El estroma conjuntival está formado por un tejido conectivo laxo vascularizado en el que también están presentes elementos de la inmunidad regional, concretamente el tejido linfoide asociado a la conjuntiva (CALT) (Knop & Knop, 2000). El CALT se presenta en diversas regiones de la

conjuntiva como una capa difusa de linfocitos o como folículos linfoides complejos, compuestos por linfocitos B y T, macrófagos y células dendríticas. Gracias a la presencia del CALT la conjuntiva es capaz de producir una respuesta inmunitaria completa (Knop & Knop, 2000)

2. REGENERACIÓN DEL EPITELIO CORNEAL

El epitelio corneal está en continua renovación. Este hecho hace que, de todas las capas de la córnea, el epitelio sea la que más rápidamente se pueda reparar y regenerar tras sufrir una agresión. Se entiende la reparación del epitelio corneal (Liu et al., 2015) como la capacidad que tienen sus células de cerrar una herida, es decir, de crear una monocapa celular sobre su membrana basal o sobre el estroma corneal de forma rápida tras haber sufrido un daño y, preferentemente, sin que queden secuelas. Es necesario recordar aquí que la córnea es un tejido transparente y que cualquier cicatriz que aparezca como consecuencia del proceso de reparación puede producir una opacidad y, consecuentemente, tener un impacto negativo en su transparencia.

La opacidad corneal es una de las principales causas de pérdida de visión a nivel mundial, como demuestra que en el año 2001 los casos de ceguera monocular, atribuible a opacidad corneal causados por traumatismo o ulceración de la córnea, se estimaran en una incidencia mundial de 1,5 a 2,0 millones de casos por año (Whitcher et al., 2001). La opacidad de la córnea puede ocurrir por diferentes motivos, bien sea por un traumatismo, lesiones, infecciones, cirugías, o secundaria a otras enfermedades o trastornos de la córnea, como pueden ser las distrofias corneales. Los procesos fisiopatológicos que conducen a la aparición de opacidad en la córnea después de la lesión son los factores principales para determinar si la opacidad podrá resolverse espontáneamente o cual será el tiempo probable

que tarde en resolverse. Dichos procesos suelen involucrar en su gran mayoría a los queratocitos del estroma corneal, si bien existe una patología concreta, el síndrome de insuficiencia límbica, que provoca defectos epiteliales, opacidad corneal y vascularización que involucra exclusivamente a las células progenitoras del epitelio corneal. Por otra parte, la regeneración del epitelio corneal (Ashby et al., 2014) la comprenderían los procesos encargados de devolver al epitelio a su estado funcional normal, involucrando para ello la expansión de las células madre epiteliales presentes en el limbo esclerocorneal.

Para que la cicatrización epitelial se produzca de forma satisfactoria se debe de producir la interacción entre diversas citoquinas (IL-6, IL-1 α , etc.), factores de crecimiento (EGF, TGF- β , FGF, etc.), integrinas (α 2 β 1) y proteasas (MPPs, uPA). De forma muy esquemática, el proceso de cicatrización del epitelio corneal (Agrawal et al., 2003) puede dividirse en 4 fases:

1. Fase latente, en la que las células dañadas entran en apoptosis, las uniones intercelulares se rompen y las uniones con la membrana basal se vuelven más débiles para permitir comenzar la fase siguiente.
2. Fase de migración, en la que las células cercanas a la herida se aplanan y migran hacia la zona dañada para restaurar la integridad de la capa celular y cubrir la zona de la lesión.
3. Fase de proliferación y diferenciación, en la que las células madre del limbo proliferan para dar lugar a células amplificadoras que se diferencian y migran hacia la zona de la herida para seguir dividiéndose y conseguir sustituir las células dañadas.
4. Fase de anclaje, en la que la nueva capa epitelial se une fuertemente a la membrana basal mediante hemidesmosomas quedando la integridad corneal restaurada.

Hay diferentes causas relacionadas con la producción de una lesión en la córnea (Figura 1). De ellas, las quemaduras tanto químicas como térmicas producen la liberación de una serie de factores ($TNF\alpha$, $IL1\alpha$ e $IL1\beta$) que desencadenan un proceso inflamatorio a nivel local.

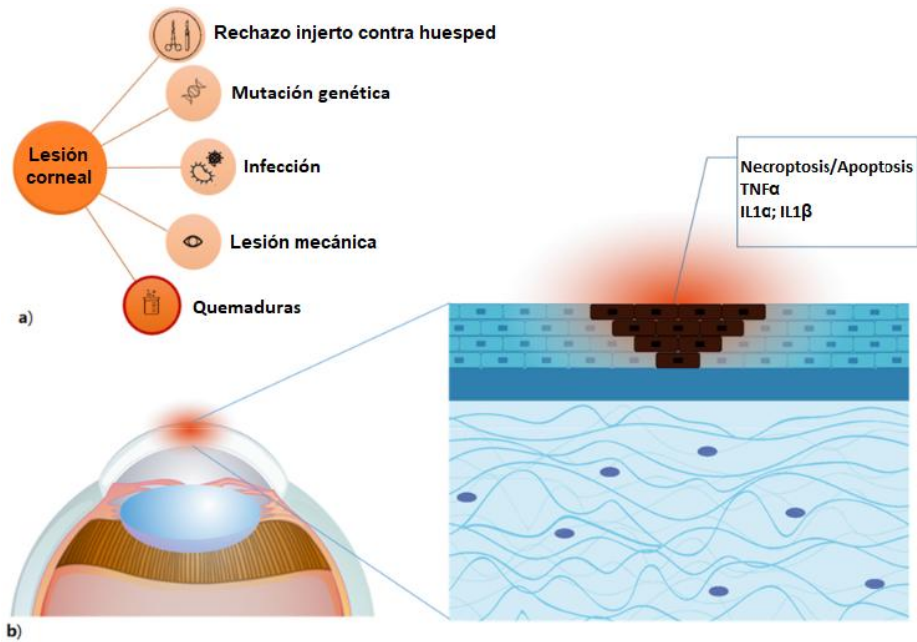


Figura 1. Representación esquemática de una lesión corneal. (a) Posibles causas de lesiones en la córnea. (b) En la zona epitelial lesionada por una quemadura las células estarían en estado apoptótico o necroptótico y se producirían varias moléculas inflamatorias. Imagen modificada de la original de Saccu et al., 2021.

3. MODELOS DE ESTUDIO DE LA REGENERACIÓN CORNEAL

Actualmente hay disponibles diferentes modelos de estudio que permiten evaluar la regeneración corneal. Estos modelos se pueden dividir en tres grandes grupos: modelos *in vitro*, modelos en animales de laboratorio y modelos *ex vivo*.

Dentro de los modelos *in vitro*, el más utilizado consiste en hacer crecer una línea celular de epitelio corneal hasta su confluencia, para posteriormente realizar una herida rascando levemente con la punta de una pipeta de 200 μl e inmediatamente después hacer un seguimiento del crecimiento y migración de las células epiteliales hasta que se cierra la herida (Jabbehdari et al., 2021). Otro modelo *in vitro* utilizado para evaluar el crecimiento del epitelio corneal consiste en la siembra de las células epiteliales corneales en pocillos con diferentes condiciones para controlar el tiempo que tardan las células en llegar a confluencia obteniendo una estimación del efecto que estas condiciones tienen en el crecimiento celular (Ding et al., 2015).

Dentro de los modelos *in vivo* descritos en la literatura para estudiar la regeneración del epitelio corneal se aprecia el uso de diferentes especies animales. Hay descritos modelos desarrollados principalmente en ratón, rata, cobaya y conejo (Stepp et al., 1993; Moshirfar et al., 2008; Cintron et al., 1979). En general, consisten en la realización manual de una herida en el epitelio corneal cuya cicatrización se sigue mediante el uso de fluoresceína sódica. Hay publicada una gran variedad de formas de realización de las heridas que se pueden dividir en dos grupos principales: aquellas que causan un lesión físico (Djalilian et al., 2008; Jabbehdari et al., 2021) o las que están provocadas por el uso de agentes químicos (Matysik-Woźniak et al., 2021; Crooke et al., 2015). Aparte de los modelos de regeneración epitelial mencionados, también existe una variedad de cerdo miniatura, el *minipig* de Göttingen (*The Göttingen minipig*), desarrollado en la Universidad de Göttingen (Alemania) en la década de los 60 del siglo pasado. Esta variedad se ha popularizado hace pocos años y se ha empezado a utilizar también en la investigación ocular (Shrader et al., 2018). No hay demasiados artículos publicados, pero se ha empleado en investigación sobre glaucoma y retina. También se ha realizado algún estudio sobre reparación corneal (Chen et al.,

2015; Telinius et al., 2020) y su globo ocular ha sido descrito desde el punto de vista histológico (Shrader et al., 2019).

Finalmente, el uso de modelos *ex vivo* está teniendo un gran desarrollo y aceptación a lo largo de los últimos años (Wehrman et al., 2021; Schumann et al., 2021; Berkowski et al., 2020) debido, en gran parte, a su utilización como nexo entre la realización de experimentos *in vitro* y los experimentos *in vivo*. Estos modelos han supuesto un nuevo paso en el cribado del uso de nuevas moléculas para la cicatrización corneal, ayudando a que el número de experimentos realizados en animales de laboratorio sea menor y con una mayor expectativa de éxito. Los estudios *ex vivo*, al igual que los llevados a cabo *in vitro*, se pueden dividir en dos grupos: aquellos que realizan una herida mecánica y aquellos en los que la herida se realiza mediante un agente químico. Por otro lado, también se encuentra cierta variedad en la procedencia de los ojos utilizados en estos experimentos, ya que se utilizan ojos de conejo, de caballo, de oveja y de cerdo.

4. MELATONINA Y REGENERACIÓN CORNEAL

La melatonina es una indolamina producida principalmente por la glándula pineal y que participa en una gran variedad de procesos celulares. Su producción varía con los cambios en la iluminación ambiental y los hábitos de sueño de cada persona, observándose cómo comienzan a incrementarse sus niveles plasmáticos 2 horas antes de la hora habitual de sueño y alcanzando su nivel máximo entre las 3 - 4 AM, desde donde comienza a disminuir paulatinamente hasta alcanzar su nivel plasmático mínimo entorno a las 12 PM (Khullar, 2012; Waller et al., 2016). Hay diversos tipos celulares oculares que también sintetizan melatonina, entre ellos los fotorreceptores en la retina y las células epiteliales del cuerpo ciliar. En esos tejidos la

melatonina interviene en diferentes funciones, como la sensibilidad a la luz de las células horizontales, la liberación de dopamina o el equilibrio entre la producción y la eliminación del humor acuoso.

Los principales receptores de la melatonina son dos receptores acoplados a proteínas G denominados MT₁ y MT₂. Estos dos receptores poseen diferente estructura molecular, están compuestos por 350 y 362 aminoácidos, respectivamente, y poseen un peso molecular de 39-40 kDa (Reppert et al., 1996).

Se ha observado que los receptores de melatonina MT₁ y MT₂ se encuentran en el epitelio corneal de los humanos (Meyer et al., 2002), de los pollos (Rada et al., 2006) y de la rana (*Xenopus laevis*) (Wiechmann et al., 2003). A lo largo de los años se han sugerido diferentes roles para la melatonina en la SO. Entre ellos los más importantes serían la modulación del nivel de hidratación corneal (Wahl et al., 2011), el control en la producción de lágrima (Hoyle et al., 2003), la protección frente a especies reactivas del oxígeno (Ciuffi et al., 2003) y la participación en el proceso de migración celular del epitelio corneal (Crooke et al., 2015).

Recientemente, se ha sugerido que la acción de la melatonina sobre la cicatrización del epitelio corneal sigue la vía de los receptores MT₁ y MT₂ al observar que tanto la utilización de melatonina como de IIK7, molécula agonista del receptor MT₂ y agonista parcial de MT₁, producen un aumento de la velocidad de cierre de una herida epitelial en la córnea de conejo (Crooke et al., 2015).

5. TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS OCULARES

Las principales vías de aplicación de fármacos sobre el polo anterior ocular son la tópica y la subconjuntival. La más extendida de ambas es la vía tópica

en forma de colirio por no ser invasiva y resultar de fácil aplicación. La vía subconjuntival, por el contrario, implica realizar una inyección a través de la conjuntiva para crear una bulla con el fármaco en cuestión entre esta y la esclera, por lo que debe de ser realizada por personal cualificado y puede ser algo incómoda para el paciente.

Sin embargo, la vía de aplicación tópica tiene determinadas limitaciones debido a la anatomía y a la fisiología ocular. Una de las principales funciones de la SO es evitar la entrada de agentes externos al interior ocular, para lo cual dispone de la barrera corneal, que también limita la entrada de fármacos (Urtti, 2006). La fuerte adherencia de las uniones intercelulares del epitelio corneal (uniones estrechas, uniones tipo gap y desmosomas) evita el paso de sustancias de más de 500 Da, por lo que como máximo se consigue que un 5% de un fármaco instilado sobrepase esta barrera y llegue a sus células diana. También se debe de tener en cuenta que al instilar un colirio en el ojo este no solo puede pasar a través del epitelio corneal al interior del ojo, sino que también entrará en contacto con el epitelio conjuntival, un epitelio más laxo y permeable que permite que las sustancias administradas puedan traspasarlo con mayor facilidad llegando hasta la circulación sanguínea sistémica (Urtti, 2006). Por estas circunstancias se disminuye la cantidad de fármaco disponible de forma local y pueden darse posibles efectos secundarios a nivel sistémico, lo que constituye un aspecto muy importante a tener en cuenta. Por otra parte, la particular composición de la lágrima hace que sea un medio agresivo frente a cualquier agente extraño, incluidos los fármacos (Novack et al., 2016). Por último, la dinámica de la renovación lagrimal y su eliminación a través del sistema de drenaje lagrimal va a limitar el tiempo de permanencia de un fármaco en la SO y, por consiguiente, su acceso a los tejidos diana.

Debido a todas estas dificultades aparece la necesidad de buscar diferentes formulaciones farmacéuticas que puedan aumentar la biodisponibilidad de las sustancias activas aplicadas de forma tópica, a la vez que se respeten las características fisicoquímicas de la lágrima, para de esa forma minimizar los posibles efectos irritantes que estas puedan tener sobre la SO. Para dar una solución a esta problemática la tecnología farmacéutica ofrece diferentes estrategias, entre ellas los sistemas de liberación controlada de fármacos.

5.1. Sistemas de liberación controlada de fármacos

Se han desarrollado múltiples estrategias tecnológicas para conseguir mejorar las condiciones de distribución de los fármacos, especialmente para conseguir superar las barreras existentes para la administración tópica ocular. Entre estas estrategias destaca la tecnología desarrollada para transportar y liberar de forma eficiente las sustancias activas sobre la zona deseada. Las importantes ventajas que suponen estas estrategias estarían relacionadas con la reducción en la cantidad de sustancia activa necesaria para alcanzar su efecto terapéutico, su protección y estabilización para la administración, y la disminución de los posibles efectos secundarios que la sustancia activa pudiera tener a nivel sistémico. Dentro de los diferentes sistemas desarrollados los más utilizados a nivel ocular serían las NPs, los liposomas, las nanoemulsiones y los dendrímeros (Figura 2) (Sahoo et al., 2008; Gaudana et al., 2009; Rodríguez Villanueva et al., 2016; Vaneev et al., 2021).

Los liposomas son pequeñas esferas formadas por bicapas lipídicas con un diámetro que oscila entre 20 nm y 10 μ m, y que pueden encapsular tanto sustancias hidrofílicas como lipofílicas. El principal problema es su inestabilidad y consiguiente ruptura, por lo que se han estudiado diferentes moléculas que mejoran su estabilidad estructural, como por ejemplo el quitosano (Liu et al., 2015). Los liposomas han demostrado ser capaces de

mejorar la penetración de fármacos a través de la córnea, así como mejorar el tiempo de retención. Generalmente los liposomas penetran en los tejidos mediante endocitosis celular, por lo que este proceso depende de la composición de los liposomas, su carga eléctrica y su tamaño. En muchas ocasiones se modifica la composición de los liposomas para mejorar su capacidad mucoadhesiva, o se aplica una capa externa que recubre los liposomas para mejorar su penetración.

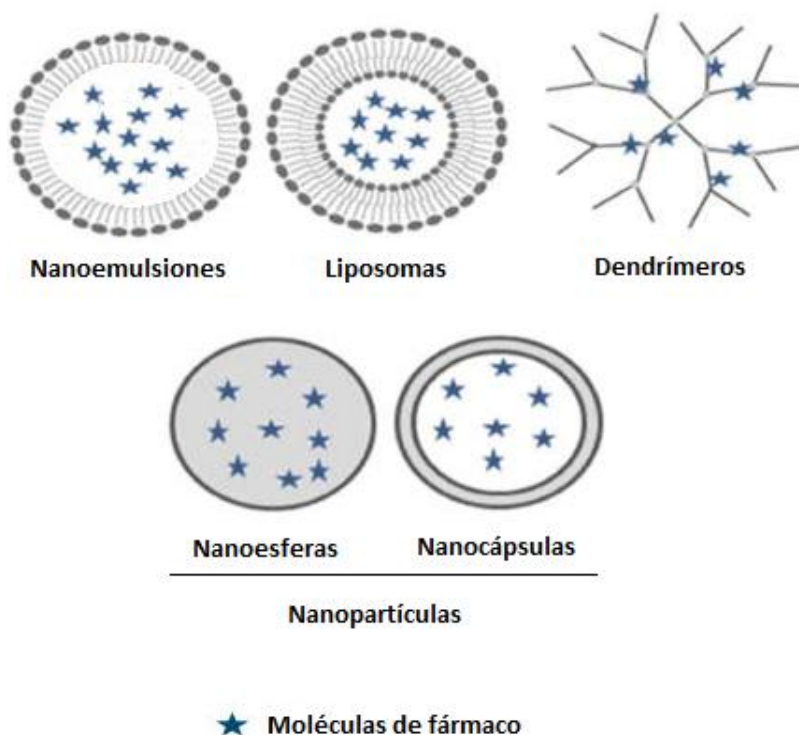


Figura 2. Representación esquemática de las principales soluciones nanotecnológicas utilizadas a nivel ocular. Imagen modificada de la original de Patel et al., 2013.

Las NPs son capaces de encapsular sustancias activas a la vez que permiten una liberación sostenida en el tiempo (Swathi et al., 2010). Frente a los liposomas, las NPs presentan una mayor capacidad de carga, una mayor

estabilidad a largo plazo, así como la posibilidad de liofilizarlas, esterilizarlas y de ser fabricadas en masa (Liu et al., 2010; Chime et al., 2013).

Por su lado las nanoemulsiones son una dispersión bifásica de dos líquidos inmiscibles, están formadas por nanogotas de unos 100 nm de agua en aceite o de aceite en agua, estabilizadas mediante el uso de uno o varios surfactantes anfífilicos. Las nanoemulsiones se caracterizan por tener una mayor superficie relativa con respecto a otras formulaciones y por tener una estabilidad física a mayor largo plazo, ya que el pequeño tamaño de las gotas evita su agrupamiento o sedimentación (Bonferoni et al., 2019).

Por último, los dendrímeros son polímeros nanoestructurados en tres ramas de entre 3 y 20 nm (Xu et al., 2013) que pueden tener diferentes grupos funcionales en las partes finales de sus ramas (Kompella et al., 2013). Los dendrímeros tienen la capacidad de encapsular sustancias activas en su interior, o de que estas queden unidas a las terminaciones de sus ramas. De las diferentes aproximaciones farmacológicas que se han presentado, los dendrímeros son las que tienen una menor capacidad de carga (Honda et al., 2013). Sin embargo, se puede disponer de dendrímeros de diferente tamaño, con diferente forma, son más flexibles que otros nanosistemas y pueden tener un mayor o menor grado de plegado (Kannan et al., 2014), lo que los hace muy fácilmente adaptables a diferentes necesidades. Gracias a estas características, los dendrímeros se sitúan como una herramienta útil para superar los obstáculos que presenta la aplicación de fármacos a nivel ocular (Rodríguez Villanueva et al., 2016).

6. LA MELATONINA COMO TRATAMIENTO OCULAR

Se ha comprobado que los efectos de la melatonina a nivel ocular son múltiples, demostrando su potencial para actuar como tratamiento de

diversas patologías. Se ha demostrado su capacidad para reducir la formación de cataratas en ratas (Abe et al., 1994; Taysi et al., 2008), para reducir la presión intraocular tanto en modelos animales de ratón, conejo y mono (Martinez-Aguila et al., 2016; Pintor et al., 2003; Serle et al., 2004), como en pacientes glaucomatosos (Pescosolido et al., 2015). También, se ha demostrado la capacidad de la melatonina para proteger el epitelio pigmentario de la retina frente al estrés oxidativo (Liang et al., 2004), por lo que podría ser utilizada en el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad. Esta capacidad concreta de protección frente al estrés oxidativo ha permitido realizar estudios que evaluaron a la melatonina como agente protector frente a la retinopatía diabética en modelos en rata de diabetes (Salido et al., 2013; Ozdemir et al., 2014), con resultados prometedores.

A pesar de las múltiples funciones que se ha comprobado tiene la melatonina a nivel ocular, actualmente tan solo están aprobadas en el mercado español preparaciones farmacéuticas que contengan melatonina para el tratamiento del insomnio a corto plazo en pacientes de más de 55 años. Sin embargo, existen diversos estudios en los que su uso está siendo probado para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer, en el síndrome de fatiga crónica, así como en diversos trastornos del sueño.

Las posibilidades de formulación de la melatonina son amplias, pudiendo utilizarse para su encapsulación desde nanosistemas lipídicos (liposomas, niosomas, etc.) hasta NPs metálicas, pasando por NPs poliméricas sintéticas o incluso el grafeno (Chuffa et al., 2021), por lo que dependiendo de la aplicación para la que vaya a ser utilizada el proceso de formulación será muy diferente. A nivel ocular, se han realizado estudios para la administración de melatonina mediante la utilización de microesferas de PLGA (Arranz-Romera et al., 2019) y de NPs de lecitina/quitosano (Hafner et

al., 2015) principalmente para el tratamiento del glaucoma, observándose un efecto hipotensivo más duradero en comparación con el tratamiento con melatonina no encapsulada (Leonardi et al., 2015).

JUSTIFICACIÓN

La regeneración del epitelio corneal es esencial para el mantenimiento de una buena calidad visual, como demuestran los últimos datos de la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization., 2019), según los cuales las opacidades corneales son responsables de la ceguera o la baja visión de 1,6 y 2,5 millones de personas, respectivamente.

Para lograr tratamientos eficaces contra la ceguera corneal relacionada con una regeneración inadecuada del tejido se hace imprescindible el desarrollo de modelos complejos que repliquen de forma fiable el proceso de regeneración corneal y que nos permitan probar de forma eficaz los nuevos fármacos que se puedan desarrollar para combatirla. Para realizar estos modelos sería ideal poder utilizar material de origen humano, pero las donaciones de córneas humanas se utilizan en casi su totalidad para trasplantes y es prácticamente anecdótico poder disponer en el laboratorio de córneas inservibles para trasplante. Es por ello y también por la similitud con el ser humano por lo que el tejido de origen porcino podría ser una buena opción para el desarrollo de modelos de regeneración corneal.

Actualmente el modelo más habitual para el estudio de la cicatrización epitelial corneal es un modelo celular *in vitro* en el que se realiza manualmente una herida sobre una monocapa de células de epitelio corneal y se hace un seguimiento del tiempo que esta tarda en cerrar. Pero en los últimos años se ha observado un gran incremento en el número de estudios *ex vivo* que utilizan globos oculares de diferentes animales para evaluar el proceso de cicatrización realizando una herida sobre la córnea en el globo ocular intacto. En esta tesis se ha trabajado en el desarrollo y la caracterización de un modelo *ex vivo* de cicatrización corneal empleando ojos de origen porcino procedentes de mataderos autorizados. El propósito fue desarrollar un modelo de características

adecuadas de tal manera que pudiera permitir evaluar el potencial de nuevos tratamientos para acelerar la recuperación funcional de una córnea herida. Una de las moléculas más prometedoras para ser utilizada como moduladora de la cicatrización corneal es la melatonina (Pintor et al., 2003) y uno de los grupos con mayor reconocimiento internacional en la investigación de dicha molécula a nivel ocular es, precisamente, el grupo de investigación del Dr. Jesús Pintor Just (fallecido en abril de 2019) de la Universidad Complutense de Madrid (España). Es por ello por lo que se estableció una colaboración con este grupo de investigación con el objetivo de poder evaluar si la melatonina mejoraba la cicatrización del epitelio corneal en el modelo porcino.

Además de desarrollar y caracterizar el modelo de cicatrización es necesario demostrar su adecuación para realizar un estudio funcional con una formulación farmacéutica potencialmente terapéutica. Para ello se estableció una colaboración con el grupo de la Profesora Jelena Filipović-Grčić de la Universidad de Zagreb (Croacia), que son expertos en el desarrollo de nuevos sistemas de liberación controlada para mejorar la aplicación tópica de fármacos oculares. Gracias a esta colaboración se pudo desarrollar una formulación de NPs cargadas con melatonina y evaluar su efecto sobre la cicatrización corneal en el modelo porcino *ex vivo*.

Finalmente, pero no por ello menos importante, esta tesis doctoral pretende conseguir una herramienta de laboratorio asequible para evaluar el efecto que las nuevas formulaciones farmacológicas oftálmicas que se desarrollen puedan tener sobre la integridad de la superficie ocular y su proceso de regeneración de forma previa a la realización de estudios en animales de experimentación. Es decir, el propósito último sería conseguir iniciar un método alternativo al uso de animales para, de esta forma, avanzar en el cumplimiento con el principio de las “tres erres” en el uso de animales de laboratorio: reemplazar, reducir, refinar.

HIPÓTESIS

Es posible establecer un modelo de cicatrización corneal *ex vivo* mediante la utilización de ojos de origen porcino que sea útil para evaluar la acción de moléculas de potencial terapéutico, entre ellas la melatonina.

OBJETIVOS

Objetivo general

Establecer un modelo de cicatrización corneal *ex vivo* mediante el uso de globos oculares porcinos.

Objetivos específicos

1. Caracterizar morfológicamente la SO porcina para establecer las similitudes y las diferencias que tiene con la SO humana.
2. Determinar la presencia de los principales receptores de la melatonina (MT₁ y MT₂) y de su precursor (AANAT) en la SO porcina.
3. Establecer un modelo *ex vivo* de herida corneal usando globos oculares de cerdo.
4. Comprobar la funcionalidad del modelo *ex vivo* desarrollado mediante el estudio del efecto de moléculas o formulaciones de potencial terapéutico.
5. Determinar el efecto de la melatonina en el modelo de cicatrización corneal *ex vivo* desarrollado.

Resumen de la Tesis en español

MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación, se presentan los materiales y la metodología empleados en el desarrollo de esta tesis de forma resumida. Ambos se describirán de forma más completa en cada Capítulo específico.

Todos los experimentos llevados a cabo para la realización de esta tesis doctoral fueron aprobados por la Comisión de Investigación del IOBA. También se siguieron las recomendaciones de la *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO) para el uso de animales en investigación en oftalmología y ciencias de la visión.

1. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS GLOBOS OCULARES

Para el desarrollo de esta tesis se han utilizado en total 130 ojos de cerdo común (*Sus scrofa domestica*) obtenidos de animales que habían sido sacrificados para consumo humano en el matadero local de Valladolid (Justino Gutierrez S.L.) y en el matadero local de Zagreb (Croacia) (Klaonica 32 d.o.o.). En ambos casos los animales eran tanto machos como hembras, tenían una edad comprendida entre los 6 y los 8 meses, y un peso de entre 90 y 150 kg.

Los globos oculares se recogieron de los mataderos en medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham* (DMEM/F12) estéril suplementado con 10% de una mezcla de antibiótico y antimicótico (Anti-Anti) y 0,25 µg/ml de anfotericina B. Como excepción, los ojos utilizados para el análisis histológico, que conservaban los párpados, se recogieron directamente en el fijador paraformaldehído tamponado al 4%.

Una vez en el laboratorio se retiró todo el tejido adyacente a los globos (músculo, grasa y tejido conectivo) mediante el uso de fórceps y tijeras

quirúrgicas, posteriormente se efectuaron 2 lavados con povidona yodada al 2% durante 2 minutos, seguidos de 2 lavados en PBS suplementado con un 1% de Anti-Anti.

1.1. Globos oculares utilizados en los estudios histopatológicos

Una vez fijados los globos oculares se tallaron y cortaron en dos mitades en el plano supero-inferior y, posteriormente, se procesaron en un procesador automático de tejidos siguiendo los siguientes ciclos: 20 minutos a temperatura ambiente (TA) en alcohol al 60%, 20 minutos a TA en alcohol al 70%, 2 pasos de 20 minutos cada uno a TA en alcohol al 95%, 2 pasos de 20 minutos cada uno a TA en alcohol al 100%, 2 pasos de 20 minutos cada uno a TA en alcohol al 100% con xileno, 2 pasos de 20 minutos cada uno a TA en xileno y, por último, 4 pasos de 15 minutos cada uno a 60°C con presión y vacío en parafina. A continuación, las muestras se incluyeron en parafina, se cortaron con un micrótopo con un espesor de 4-5 μm y las secciones histológicas se recogieron sobre portaobjetos.

1.2. Globos oculares utilizados en la detección de proteínas

Los globos oculares destinados a la extracción de proteína diferenciada de las diversas capas corneales, epitelio, estroma y endotelio, así como del epitelio y del estroma conjuntival fueron procesados de la siguiente forma. Se extrajeron en primer lugar los botones corneales de 12 mm de diámetro mediante la utilización de un trépano, sobre la cara interna de cada uno de estos botones corneales se vertieron 20 μl del tampón de extracción y lisis del ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA por sus siglas en inglés), que está compuesto por HEPES 50 mM, pH 8, NaCl 150mM, NP-40 al 1% (p/v), desoxicolato de sodio al 0,5%, SDS al 0,1% y un cóctel inhibidor de proteasas. Seguidamente se procedió a extraer las células endoteliales corneales mediante desbridamiento mecánico utilizando un cuchillete tipo crescent.

Posteriormente, se procedió de forma similar con el epitelio corneal, en este caso se utilizaron 50 µl de tampón RIPA y se obtuvieron los lisados del epitelio corneal mediante desbridamiento mecánico. Para finalizar, se realizó la extracción proteica del estroma corneal. Tras retirar el endotelio y el epitelio de los botones corneales estos se cortaron en trozos más pequeños que fueron introducidos en un mortero cónico junto con 70 µl de tampón RIPA.

Se separó de cada globo ocular la conjuntiva bulbar mediante el uso de fórceps y tijeras quirúrgicas, y se extrajeron de forma diferenciada los lisados proteicos del epitelio y el estroma conjuntival. Para ello se utilizó un cuchillito tipo crescent y un desbridamiento mecánico del epitelio conjuntival con 50 µl de tampón RIPA. Para extraer el lisado proteico del estroma conjuntival fueron introducidos en un motero cónico junto con 70 µl de tampón RIPA.

Posteriormente, todos los lisados celulares fueron incubados durante 30 minutos en hielo, se centrifugaron a 15.000 rpm a 4°C durante 30 minutos y, por último, se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron hasta su utilización a -80°C.

1.3. Globos oculares utilizados para el desarrollo del modelo *ex vivo* de cicatrización corneal

Tras los lavados en povidona yodada y PBS (Figura 2) los globos oculares se introdujeron en una campana de flujo laminar y se procedió a realizar la herida en la zona central del epitelio corneal, como se describirá en la sección 1.4.

Una vez realizadas las heridas se aislaron las superficies oculares anteriores. Se utilizó una aguja de 21G para hacer un primer agujero en la esclera, a unos 5 mm del limbo esclerocorneal, seguidamente con la ayuda de unos fórceps y unas tijeras quirúrgicas se procedió a cortar la esclera, intentando

mantener unos 4 mm con el limbo para de esa forma aislar el polo anterior del ojo. Una vez separado el polo anterior se utilizaron una pareja de fórceps para retirar el iris y cuerpo ciliar que quedaban adheridos a la zona perilimbar. Se colocaron las superficies oculares con la cara interna hacia arriba sobre un tapón de tubo de centrífuga de 15 ml relleno de PBS para de esta forma rellenar su cámara anterior con una solución de agar-agar al 4% en medio de cultivo DMEM-F12, dejándolas en esa posición hasta que se producía la gelificación de la solución. De esta forma, se podía mantener la curvatura normal de la SO.

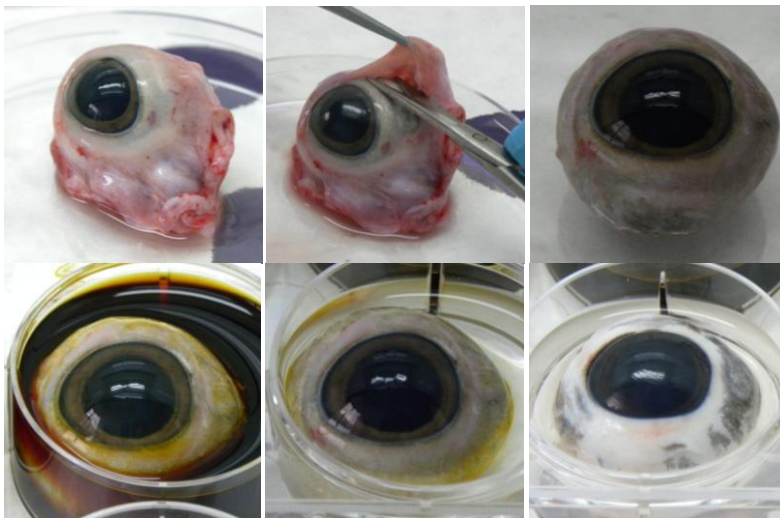


Figura 3. Proceso de limpieza y desinfección de los globos oculares porcinos.

Posteriormente, se colocaron las superficies oculares en placas de cultivo de 6 pocillos con su cara externa hacia arriba y se añadió medio de cultivo en cada uno de los pocillos hasta que este alcanzara el limbo. El mantenimiento de los botones se llevó a cabo en un incubador a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad.

1.4. Realización de las heridas para el desarrollo del modelo *ex vivo* de cicatrización corneal

Las heridas realizadas en el epitelio corneal fueron producidas antes de aislar los anillos corneoesclerales del globo ocular, como ya se ha mencionado. Las lesiones se produjeron mediante 1) una lesión química con n-heptanol, o 2) una lesión mecánica con un cuchillete. Como control negativo se utilizaron tejidos corneales a los que no se les produjo ninguna alteración.

Para realizar la herida mediante n-heptanol se utilizó un disco de papel de 9 mm impregnado en ese agente químico del que se retiraba el exceso pasándolo por un papel de filtro. Inmediatamente después se colocaba sobre el centro de la córnea durante 30 segundos. Tras retirar el papel los globos oculares se lavaban con PBS.

Para realizar la herida de forma mecánica se utilizó un cuchillete tipo crescent para desbridar el epitelio de la córnea central manualmente sin dañar el estroma subyacente. Primero se delimitaba la zona a lesionar mediante el uso de un trépano para posteriormente eliminar el epitelio.

2. ANÁLISIS MOFOLÓGICO DE LOS TEJIDOS DE LA SO PORCINA

2.1. Análisis histológico

Antes de realizar las diferentes tinciones, se desparafinaron las secciones de tejido para permitir la entrada en su interior de las soluciones acuosas utilizadas durante la tinción. A partir de aquí se realizaron 3 tinciones histológicas diferentes: hematoxilina-eosina (H-E), azul alcian/ácido peryódico de Schiff (AB/PAS) y Giemsa, siguiendo los protocolos establecidos en el Grupo de Superficie Ocular para cada una de ellas. Brevemente, la

tinción mediante H-E se utilizó para identificar y describir los diferentes estructuras en las secciones de tejido, el AB/PAS para identificar las células caliciformes y sus diferentes tipos, mientras que la tinción con Giemsa se empleó para analizar la presencia de células inflamatorias y caracterizar el tejido linfoide asociado a la conjuntiva porcina.

Tras finalizar cada tinción todos los portaobjetos se deshidrataron y cubrieron con cubreobjetos. Las muestras se visualizaron en un microscopio Leica DM4000 B o se escanearon mediante el sistema automático de toma de imágenes celulares ACIS III, tomándose fotografías representativas de las diferentes zonas de las muestras histológicas en estudio. Se tomaron al menos 3 imágenes representativas por cada ojo y por cada región anatómica analizada (córnea, limbo, conjuntiva, membrana nictitante, y párpados).

2.2. Localización de proteínas mediante inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es una técnica de detección de proteínas basada en la reacción antígeno-anticuerpo. En este trabajo se quiso identificar los linfocitos mediante su marcador CD3, así como los receptores de la melatonina MT_1 y MT_2 y su molécula precursora AANAT. Para ello se utilizaron diversos anticuerpos primarios (Tabla 1) que se unieron de manera específica a la proteína de interés. Las condiciones de incubación dependieron del anticuerpo, siendo las más comunes 1 hora a 37° C o toda la noche a 4° C. Después se realizaron tres lavados con PBS para retirar el exceso de anticuerpo primario y se añadió a continuación un anticuerpo secundario marcado con un fluoróforo (Tabla 1). El anticuerpo secundario se incubó durante 1 hora a TA para su unión al anticuerpo primario, marcando así de manera fluorescente la proteína estudiada. Los núcleos celulares se identificaron con Hoechst 33342, dilución 1:1000, incubando durante 10 minutos a TA. Las preparaciones se observaron en el microscopio Leica CTR6000 donde se realizaron fotografías a distintos aumentos.

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para realizar las técnicas de inmunofluorescencia (IMF) y *western blotting* (WB).

Nombre del anticuerpo	Referencia	Dilución IMF	Dilución WB
Anti-MT₁	sc-13179, Santa Cruz, Dallas, TX, EE.UU.	1:50*	1:100
Anti-MT₂	ABIN122307, antibodies-online GmbH, Aachen, Alemania	1:500 [#]	1:1000
Anti-AANAT	ab3505, Abcam, Cambridge, Reino Unido	1:500 [#]	1:1000
Anti-β-Actina	Anti-β-Actin, Santa Cruz, Dallas, TX, EE.UU.	X	1:200
Anti-CD3	ab16669, Abcam, Cambridge, Reino Unido	1:200 [§]	X
Donkey Anti-IgG mouse-FITC	AB_2340791, Jackson ImmunoResearch, West Grove, Reino Unido	1:100	X
Donkey Anti-IgG rabbit-FITC	AB_2340598, Jackson ImmunoResearch, West Grove, Reino Unido	1:100	X
Donkey Anti-IgG rabbit-Alexafluor® 488	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.	1:200	X

Anticuerpos secundarios utilizados: * Anti-IgG mouse-FITC; [#] Anti-IgG rabbit-FITC; [§] Anti-IgG rabbit-Alexafluor® 488

2.3. Identificación de proteínas mediante electroforesis y *Western blotting*

El *Western blotting* es una técnica de determinación de proteínas que consiste en transferir a una membrana las proteínas previamente separadas por su tamaño mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida. Para ello es necesario previamente conocer la concentración de proteínas extraídas de células o tejidos, que en este trabajo se determinó mediante el ensayo de BCA.

Los extractos proteicos se prepararon a partir de cada tejido de la SO porcina según lo descrito en el apartado 1.2. de esta sección. Los extractos (50 µg de proteínas) se diluyeron en tampón de muestra de Laemmli, se cargaron en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico al 15% y se separaron las proteínas según su movilidad electroforética (en función de su tamaño). Posteriormente, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, que se bloquearon con leche en polvo desnatada sin grasa al 5% durante 1 hora a TA y luego se incubaron durante toda la noche a 4°C en TBS 1X 0.1% Tween 20 que contenía leche sin grasa al 5% (tampón de bloqueo) y el anticuerpo primario (Tabla 1). Las membranas se incubaron con anticuerpos de conejo o ratón anti-IgG de cabra conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 1 hora a TA. Posteriormente, se revelaron las proteínas mediante quimioluminiscencia usando el sistema de detección de quimioluminiscencia mejorada (ECL). Las películas se escanearon con el lector Gel Logic 200 Imaging System. El análisis densitométrico de las bandas obtenidas se realizó utilizando el software Kodak Molecular Imaging. Los valores de densitometría de cada muestra se normalizaron a los respectivos valores densitométricos de la β -actina.

3. EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DEL MODELO *EX VIVO*

3.1. Evaluación del tamaño de la herida corneal

Se siguió la evolución de la cicatrización de las heridas corneal durante diferentes tiempos (24, 48, 72 y 96 horas tras la realización de las heridas, salvo en determinados casos en los que estos tiempos se vieron prolongados hasta 10 días más), realizando evaluaciones cada 24 horas mediante el uso de una solución de fluoresceína sódica al 2% (p/v) en PBS. Las evaluaciones se realizaron mediante la utilización de unos anillos cónicos de silicona, que se situaban sobre la córnea y permitían mantener la solución de fluoresceína sobre la zona de la herida durante un tiempo de 30 segundos. Posteriormente, los botones esclerocorneales se lavaban con PBS y se tomaban 3 imágenes por ojo mediante el uso de un filtro amarillo y una lámpara de luz azul cobalto.

El tamaño de las heridas se midió en relación con el tamaño total de la córnea de cada ojo utilizando el programa de procesamiento de imagen *ImageJ* (www.imagej.edu). Los resultados se expresaron como el porcentaje del área de la herida en cada uno de los tiempos medidos respecto del área corneal total y comparados con dicho *ratio* tras la medición inicial (área de la herida a tiempo 24 horas = 100%).

3.2. Evaluación del efecto de diferentes moléculas en la cicatrización corneal.

Se utilizaron diferentes moléculas, tanto control como experimentales (Tabla 2) para valorar su efecto sobre el cierre de la herida corneal efectuada en el modelo *ex vivo*. Inmediatamente después de haber realizado las heridas se introducían los ojos en el incubador hasta el día siguiente para que se estabilizaran los anillos esclerocorneales. A las 24 horas se realizaba la

primera evaluación del tamaño de la herida y se realizaba la exposición a la molécula a estudiar durante 1 hora. Para ello se colocaba un anillo de silicona sobre la superficie redondeada de la córnea y se administraban en su interior 200 µl de las diferentes diluciones a evaluar durante los distintos tiempos a observar. Esta administración se llevaba a cabo en el interior del incubador. Transcurrido el tiempo de exposición se retiraba la solución, se lavaba la superficie ocular irrigando con 1 ml de PBS y se reintroducían los anillos en el incubador hasta la siguiente evaluación.

Los tiempos de evaluación fueron de nuevo 24, 48, 72 y 96 horas tras la realización de las heridas.

Tabla 2. Moléculas cuyo efecto sobre la cicatrización corneal se evaluó en el modelo *ex vivo* porcino.

Nombre de la molécula	Función	Referencia	Concentración
EGF	Estimulante del crecimiento epitelial	Invitrogen, Eugene, OR, EE.UU.	10 µg/ml
TSP-1	Factor antiangiogénico y antiinflamatorio relacionado con ojo seco	R&D Systems. Inc. Mineapolis, MN, EE.UU.	110 µg/ml
Anti-TSP-1	Anticuerpo específico que bloquea la acción de TSP-1	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.	110 µg/ml
TGF-β2	Modulador de la proliferación y diferenciación de células presentadoras de antígeno controlado por TSP-1	Sigma Aldrich, San Luis, MO, EE.UU.	5 µg/ml

EGF: factor de crecimiento epitelial; TSP-1: trombospondina 1; TGF-β2: factor de crecimiento transformante beta 2.

4. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NPS CARGADAS CON MELATONINA

4.1. Preparación de las NPs cargadas con melatonina

Las NPs se prepararon con quitosano, lecitina de soja sin grasa con un 45% de fosfatidil colina y melatonina, en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Zagreb (Croacia). Se prepararon NPs de lecitina (NP-L) y de lecitina/quitosano (NP-LQ) cargadas o sin cargar con melatonina. Se midió la eficacia de encapsulación (EE%) mediante la determinación de la cantidad de melatonina libre usando la técnica de la diálisis (Hafner et al., 2009). La melatonina libre (no encapsulada) en las muestras se analizó mediante espectrofotometría. El experimento finalizaba cuando se detectaban valores constantes en la concentración de melatonina en muestras tomadas de forma consecutiva de la fase receptora, teniendo siempre en cuenta la progresiva dilución del medio. Posteriormente, se calculaba la eficiencia de encapsulación siguiendo la siguiente ecuación:

$$EE\% = \frac{[\text{melatonina total}] - [\text{melatonina difundida}]}{[\text{melatonina total}]} \times 100$$

La carga de fármaco (CF%) fue calculada siguiendo la siguiente ecuación:

$$CF\% = \frac{[\text{melatonina total}] - [\text{melatonina difundida}]}{\text{cantidad examinada de NPs}} \times 100$$

Las NPs obtenidas después del proceso de diálisis (sin melatonina libre) se utilizaron en todos los estudios realizados posteriormente.

4.2. Caracterización de las NPs cargadas con melatonina

El tamaño medio y la distribución del tamaño de las partículas (índice de polidispersidad; PDI) se determinaron mediante espectroscopía de

correlación de fotones. Las medidas se realizaron con un ángulo de dispersión de 90° y a una temperatura de 25° C. Las muestras se midieron después de haber sido diluidas con 0,45 ml de agua destilada filtrada para evitar la dispersión múltiple. El diámetro hidrodinámico se calculó partiendo de la función de autocorrelación de la intensidad de la luz dispersada por las partículas asumiendo que estas tienen una forma esférica. El potencial zeta, que hace referencia a la carga electrostática, se obtuvo mediante anemometría láser Doppler utilizando el Zetasizer 3000 HS. Para estas medidas, las muestras se introdujeron en una célula electroforética, en la que se estableció un potencial de 150 mV. Las muestras de las suspensiones de NPs se midieron tras haber sido diluidas en una solución 10 mM de NaCl.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores recogidos en la presente memoria de tesis corresponden con el valor medio de los resultados obtenidos en los diferentes experimentos realizados \pm el error estándar de la media (SEM). Los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences software* 20.0 para Windows, SPSS Inc.). Los valores de $p \leq 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

De forma general las diferencias entre dos condiciones se calcularon mediante la *t* de Student de muestras independientes.

En el estudio de la expresión de los receptores de la melatonina, así como de su precursor AANAT, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) y un test de comparación múltiple de Dunnett considerando el epitelio corneal como control.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esta memoria de tesis se ha estructurado en 3 Capítulos con 5 Estudios diferentes. A continuación, se presenta un resumen de los resultados obtenidos en cada uno de ellos, que se describirán en mayor profundidad y convenientemente discutidos más adelante en cada Capítulo específico.

ESTUDIO 1. CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA E INMUNO-HISTOQUÍMICA DE LA SUPERFICIE OCULAR PORCINA.

En este estudio se describió que la córnea porcina tiene entre 6 y 8 capas de células epiteliales, las cuales se pueden dividir en 2-3 capas de células basales, 2-3 capas de células intermedias o aladas, y 2 capas de células escamosas, un estroma, la membrana de Descemet y una monocapa de células endoteliales. El grosor corneal total medido fue de $1131,0 \pm 87,5 \mu\text{m}$ en la zona central, y se iba engrosando hacia la periferia llegando a las $1496,9 \pm 138,2$ micras en la zona del limbo esclerocorneal.

La densidad media de células caliciformes para la conjuntiva en su conjunto fue de $71,25 \pm 12,29$ células/mm, variando desde una densidad máxima de $113,04 \pm 37,21$ células/mm en la conjuntiva palpebral inferior a una densidad mínima de $12,69 \pm 4,29$ células/mm en la conjuntiva bulbar.

Además, se observó que el tejido linfoide asociado a la conjuntiva estaba distribuido por la conjuntiva en forma de linfocitos intraepiteliales y como tejido linfoide difuso subepitelial. También se pudieron observar folículos linfoides con forma lenticular en el estroma conjuntival, encontrándose aproximadamente 8 folículos por sección histológica analizada.

Poniendo en conjunto todos estos datos se puede afirmar que las estructuras oculares porcinas analizadas son similares a las que equivalentes en el ojo

humano, lo cual apoya el uso de los ojos porcinos en el estudio de la fisiología y la fisiopatología de la SO.

ESTUDIO 2. DETECCIÓN DE LOS RECEPTORES DE MELATONINA MT_1 Y MT_2 Y DE SU MOLÉCULA PRECURSORA AANAT.

En este estudio se analizaron los niveles de expresión y la distribución de los dos receptores principales de la melatonina, MT_1 y MT_2 , así como de la molécula precursora de la melatonina AANAT, en diferentes tejidos de la SO porcina. Para ello se realizó un análisis de proteínas empleando las técnicas de electroforesis y *Western blotting* e inmunofluorescencia. Se analizaron 4 ojos diferentes con cada una de las dos técnicas.

Mediante la inmunofluorescencia se pudo localizar la presencia del receptor MT_1 en el epitelio y el estroma conjuntivales y del receptor MT_2 en las cinco estructuras estudiadas, observándose una expresión más intensa en el epitelio conjuntival. Además, la máxima expresión de AANAT se localizó en el estroma conjuntival y el epitelio corneal, no observando su presencia ni en el endotelio ni en el estroma corneales.

La expresión del receptor MT_1 en el epitelio y el endotelio de la córnea fue prácticamente indetectable, mientras que sí se detectó tanto en el estroma corneal como en el epitelio y el estroma conjuntivales. La expresión de MT_1 se vio, por lo tanto, preferentemente asociada a los tejidos conjuntivales. Por otro lado, el receptor MT_2 se detectó en cada una de las 5 estructuras tisulares estudiadas, si bien su expresión fue significativamente menor en el estroma conjuntival y tanto en el estroma como el endotelio corneales con respecto al epitelio de la córnea, mientras que en el epitelio conjuntival la expresión era similar a la del epitelio corneal.

En cuanto a la distribución de AANAT, si bien se detectaba en los 5 tejidos, se observó que su expresión era prácticamente nula en el estroma corneal y que estaba disminuida tanto en el endotelio corneal como en el epitelio conjuntival con respecto al epitelio corneal. Sin embargo, se observó un incremento estadísticamente significativo en sus niveles de expresión en el estroma conjuntival.

La Tabla 3 resume los resultados sobre la presencia de los receptores de melatonina y AANAT obtenidos mediante inmunofluorescencia y Western blot.

Tabla 3. Resumen de resultados de la detección de MT₁ y MT₂ mediante inmunofluorescencia y Western blotting en los diferentes tejidos oculares evaluados.

	Inmunofluorescencia			Western blotting		
	MT ₁	MT ₂	AANAT	MT ₁	MT ₂	AANAT
Epitelio conjuntival	+	++	-	*** ↑	equivalente al epitelio corneal	*** ↓
Estroma conjuntival	+	+	++	*** ↑	* ↓	** ↑
Epitelio corneal	-	+	+	100%	100%	100%
Estroma corneal	-	+	-	*** ↑	*** ↓	*** ↓
Endotelio corneal	-	+	-	casi indetectable	*** ↓	*** ↓

Intensidad subjetiva de la expresión: - ausente; + media; ++ fuerte.
 $p \leq 0,05^*$; $\leq 0,01^{**}$; $\leq 0,001^{***}$. ↑ Aumento; ↓ Disminución

En conjunto, los resultados de este trabajo apuntan a una expresión regional de cada una de estas moléculas y, posiblemente, a una especialización de cada tejido en la realización de funciones asociadas con la melatonina y sus receptores.

ESTUDIO 3. ESTABLECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL MODELO.

En este estudio se estableció el protocolo para desarrollar de forma sistemática el modelo *ex vivo* porcino de cicatrización corneal para posteriormente poder comprobar su funcionalidad.

En primer lugar, se comprobó que el epitelio corneal no se veía dañado por el hecho de mantener los anillos corneoesclerales en cultivo hasta un máximo de 5 días. A partir de este momento se pudo observar que algunos de los ojos comenzaban a presentar alteraciones a nivel epitelial.

Se aplicaron dos métodos para realizar la herida: uno mecánico mediante el uso de un cuchillete y otro químico utilizando un papel de filtro impregnado en n-heptanol. De los dos métodos, el que tuvo una mayor repetibilidad fue el mecánico, ya que la herida realizada con el agente químico presentaba una morfología más variable y unos límites de la zona lesionada más irregulares. También se observó que la cicatrización de las heridas realizadas con n-heptanol era más lenta, obteniéndose unos porcentajes de cierre epitelial medio del $59,04 \pm 16,24\%$ y del $77,53 \pm 18,65\%$ transcurridas 72 y 96 horas, respectivamente, desde la realización de la herida, mientras que cuando la herida se realizaba con el cuchillete a los mismos tiempos de evaluación se observó un porcentaje medio de cierre epitelial de $94,72\%$ y un 100% , respectivamente.

Por último, se observó un mayor nivel de expresión del marcador de apoptosis TUNEL en el estroma corneal en aquellos casos en los que la herida se realizaba con el agente químico.

Con todo ello, se decidió realizar la herida de forma mecánica en el modelo y no mantenerlo en cultivo más de 5 días (120 horas) para garantizar que el

posible deterioro en las estructuras corneales se debía exclusivamente a las sustancias que se fueran a evaluar y no al tiempo en cultivo.

ESTUDIO 4. EVALUACIÓN DE LA CICATRIZACIÓN CORNEAL TRAS LA EXPOSICIÓN A DIFERENTES SUSTANCIAS MODULADORAS.

En este estudio se analizó la funcionalidad del modelo *ex vivo* desarrollado para evaluar la posible acción moduladora de diferentes moléculas sobre la cicatrización del epitelio corneal.

En primer lugar, se comprobó si las moléculas que se iban a probar (EGF, TSP-1, TGF- β 2 y el anticuerpo anti-TSP-1) producían alguna lesión en el epitelio corneal íntegro tras una exposición de 24 horas. Ninguna de las moléculas evaluadas produjo daño alguno observable mediante tinción con fluoresceína.

Posteriormente, se expuso el modelo de herida corneal *ex vivo* establecido en el estudio 3 a dichas moléculas durante un periodo de 24 horas. Transcurrido el tiempo de exposición a PBS, EGF o TSP-1 se observó que las heridas se cerraban completamente al tercer día. No obstante, ni EGF ni TSP-1 aceleraban el ritmo de cierre de la herida comparado con el control (PBS) como se esperaba. Sin embargo, tanto la exposición a TGF- β 2, como al anticuerpo anti-TSP-1 sí que alteraban el ritmo de la cicatrización normal del epitelio. Se observó una disminución de la tasa de cicatrización respecto del control en los días 2 y 3 de evaluación en los ojos expuestos a TGF- β 2, mientras que en el caso de los ojos expuestos a anti-TSP-1 se comprobó un incremento del tamaño de la herida desde el primer día de evaluación, llegando a duplicar el tamaño inicial al tercer día.

Por lo tanto, el modelo *ex vivo* respondió al efecto de las diferentes moléculas estudiadas y podemos considerarlo funcional. No obstante, el hecho de no producirse el efecto acelerador de la reepitelización esperado de la exposición a EGF y a TSP-1 justifica una optimización del modelo y estudios adicionales morfológicos y moleculares que permitan mejorar el su desempeño.

ESTUDIO 5. EVALUACIÓN DE LA CICATRIZACIÓN CORNEAL TRAS EXPOSICIÓN A DIFERENTES FORMULACIONES DE MELATONINA.

En este estudio se evaluó cómo la melatonina podía afectar a la cicatrización del epitelio corneal en el modelo *ex vivo* de herida corneal porcina establecido en el Estudio 3.

Se observó que, tras la exposición del modelo a diferentes concentraciones de melatonina (0, 5, 30, 60, 90, 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$) preparadas en agua bidestilada durante 1 hora, no había diferencias estadísticamente significativas que indicaran un aumento en el porcentaje de cierre epitelial, si bien se podía observar cierta tendencia a un mayor cierre epitelial en las concentraciones de 30, 60 y 90 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Tras estos resultados se decidió encapsular la melatonina en NPs de lecitina (NP-L-MEL) o de lecitina-quitosano (NP-L+Q-MEL) y exponer el modelo a las formulaciones de melatonina desarrolladas para observar si de esta forma el efecto sobre la cicatrización epitelial variaba.

Se prepararon NPs blancas (sin melatonina) y cargadas con melatonina para cada formulación de NPs y se realizó una caracterización fisicoquímica de cada una de ellas. La Tabla 4 resume los resultados obtenidos en relación al

tamaño (nm), potencial zeta (mV), polidispersidad y porcentaje de encapsulación de la melatonina.

Tabla 4. Caracterización de las diferentes formulaciones de NPs.

Tipo de NP	Tamaño (nm)	Potencial zeta (mV)	Polidispersidad	% de encapsulación
NP-L	75,5 ± 2,6	-29,7 ± 1,0	0,471 ± 0,010	
NP-L Mel	90,5 ± 1,4	-43,9 ± 3,5	0,369 ± 0,023	20,88 ± 0,20
NP-L+Q	269,3 ± 3,5	31,6 ± 1,2	0,370 ± 0,038	
NP-L+Q Mel	264,5 ± 5,9	19,8 ± 0,4	0,316 ± 0,011	21,85 ± 0,24

NP-L: NPs de lecitina; NP-L Mel: NPs de lecitina cargadas con melatonina; NP-L+Q: NPs de lecitina-quitosano; NP-L+Q Mel: NPs de lecitina-quitosano cargadas con melatonina.

Las preparaciones de córnea porcina a las que se le había practicado una herida de forma mecánica se expusieron a las NP blancas y cargadas, además de a los controles, durante 5, 30 o 240 minutos (4 horas). Ninguna de las formulaciones mejoraba el porcentaje de cierre epitelial comparado con el control en los tiempos de evaluación. Dentro de eso, se observó que las NP-L-MEL eran las que más aceleraban el cierre epitelial, independientemente del tiempo de exposición, e incluso eran ligeramente superiores al control en la evaluación a los días 3 y 4, pero nunca de forma significativa. Por otra parte, la solución de quitosano utilizada como control fue la que más ralentizó el cierre epitelial. Por lo tanto, el quitosano libre retrasa de forma significativa la cicatrización corneal, mientras que si se encuentra formando parte de las NPs ese efecto se matiza.

Resumen de la Tesis en español

Como conclusión de este estudio se puede decir que ninguna de las formulaciones cargadas con melatonina desarrolladas mejora el porcentaje de cierre de la herida corneal en los tiempos de exposición y de evaluación analizados, si bien las NP-L-MEL parecen ser las de mayor potencial. También es posible que el modelo empleado no sea adecuado para el estudio de la eficacia de las formulaciones de estas NPs para ayudar en la reparación de heridas corneales. Sin duda es necesario replantear este estudio y quizá reformular las NP-L-MEL.

CONCLUSIONES

1. La similitud de la SO porcina y la humana confirman que la primera es un material adecuado para realizar estudios fisiopatológicos relacionados con las estructuras de la SO humana.
2. Los subtipos principales de receptores de melatonina MT_1 y MT_2 y la molécula precursora AANAT están presentes en los tejidos de la córnea y de la conjuntiva del cerdo, lo que lleva a pensar que la melatonina podría estar involucrada en diferentes procesos en la SO porcina. La conjuntiva podría tener cierta capacidad de regulación a nivel local, dada la mayor presencia de estas moléculas, especialmente MT_1 y AANAT, en sus tejidos que en los de la córnea.
3. Se ha podido establecer un modelo porcino *ex vivo* de herida corneal realizada de forma mecánica repetible y útil para evaluar la cicatrización *ex vivo* del epitelio corneal porcino en un periodo corto de 5 días.
4. El modelo porcino *ex vivo* utilizado en este trabajo de tesis permite comprobar la funcionalidad de moléculas activas con potencial terapéutico, si bien requiere de optimización para extender su uso.
5. Se ha encapsulado con éxito la melatonina en varias formulaciones de NPs cuyo efecto sobre el ritmo de cicatrización del epitelio en el modelo porcino *ex vivo* de herida corneal no ha sido el esperado, si bien las NPs de lecitina cargadas con melatonina parecen ser las de mayor potencial.

Thesis Report Summary
in English

ABSTRACT

In this doctoral thesis, an *ex vivo* porcine corneal wound healing model is presented. Currently, it is necessary to develop this type of models to reduce the number of laboratory animals used in research and particularly in visual science research.

First, a study of the porcine OS was carried out from the histopathological point of view to confirm that the findings derived from the thesis could be extrapolated to humans. To do so, we used ocular exenterations with their eyelids from animals that had been sacrificed for human consumption.

Next, a protocol to damage the porcine corneal epithelium and to culture the sclerocorneal rings for enough time to produce a full corneal epithelial healing was defined. Epithelial wounds were exposed to different molecules to evaluate the performance of the model from a functional point of view measuring changes in the healing rate.

One of the molecules evaluated was melatonin, which had previously been shown to promote corneal wound healing in a rabbit corneal damage model. Prior to evaluate the impact of melatonin exposure, we performed a complete study of the distribution of its main receptors (MT₁ and MT₂) and the precursor molecule AANAT in porcine OS. The *ex vivo* model of corneal healing was then exposed to melatonin, both in solution and encapsulated in novel lecithin and lecithin-chitosan based NP formulations.

Our results confirmed 1) the similarity between porcine and human OS, 2) the presence and regional distribution of melatonin receptors and AANAT in different tissues of porcine OS, 4) the usefulness of the model to test active molecules, and 3) the successful melatonin encapsulation in the NP formulation, although we could not find differences in the percentage of epithelial healing between encapsulated melatonin and its controls.

THESIS REPORT STRUCTURE

This Doctoral Thesis report (equivalent to a Ph.D. thesis) is elaborated using chapter structure and applies for the International-awarded Doctorate Degree. It has been organized under the Regulations of the Doctoral School for the presentation and defense of the doctoral thesis at the University of Valladolid (*BOCYL de 15 de 2016*). Part of the report has been written in Spanish and part in English, and it includes a summary section of the whole work in each language that contains the main sections of the thesis, which is expected to help to follow the thematic relationship of the studies.

In this thesis five different studies are included arranged into 3 thematic chapters. **Chapter 1** focuses on the anatomical description of the porcine eye and is composed of **Studies 1 and 2**. **Chapter 2** deals with the establishment of an *ex vivo* corneal epithelial wound healing model using porcine eyeballs and its performance to evaluate the action of different active molecules on the epithelial healing process. Chapter 2 is composed of **Studies 3 and 4**. Finally, **Chapter 3** evaluates melatonin as a potential modulator of corneal wound healing using the above mentioned model in a single study (**Study 5**)

The Study 2 was carried out in collaboration with Drs. Jesús J. Pintor Just, Hanan Alkozi, J. Gonzalo Carracedo Rodríguez and Fernando Huete Toral, from the Department of Biochemistry and Molecular Biology IV at the Complutense University of Madrid (Madrid, Spain).

The Study 5 was performed during my three-month stay at the Department of Pharmaceutical Technology (Faculty of Pharmacy and Biochemistry) at the University of Zagreb (Zagreb, Croatia), under the supervision of Professor Jelena Filipović-Grčić, thus fulfilling the requirements to apply for the International-awarded Doctorate Degree.

The titles of the studies and their relationship with the different objectives of the thesis are presented in the following schematic:

Chapter 1. Histological analysis of the porcine ocular surface.

Study 1. Histological and immunohistochemical characterization of the porcine ocular surface.

OBJECTIVE 1. *Study carried out at the University of Valladolid*

Study 2. Detection of MT₁ and MT₂ melatonin receptors and their precursor molecule AANAT on the porcine ocular surface.

OBJECTIVE 2. *Study carried out in collaboration with the Complutense University of Madrid*

Chapter 2. Development of a porcine *ex vivo* model of corneal wound healing.

Study 3. Establishment and characterization of the model.

OBJECTIVE 3. *Study carried out at the University of Valladolid*



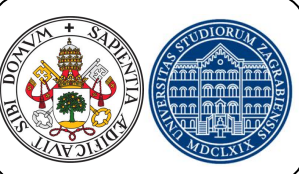
Study 4. Evaluation of corneal wound healing after exposure to different modulating molecules.

OBJECTIVE 4. *Study carried out at the University of Valladolid*

Chapter 3. Evaluation of the effect of melatonin on corneal wound healing.

Study 5. Evaluation of corneal wound healing after exposure to different melatonin formulations.

OBJECTIVE 5. *Study carried out in collaboration with the University of Zagreb (Croatia)*

<p>Histological analysis</p>	<p>Ex vivo model of corneal wound healing</p>	<p>Effect of melatonin on corneal wound healing</p>
<p><u>Study 1:</u> Morphological description of the porcine ocular surface</p> <p><u>Study 2:</u> Detection of melatonin receptors and precursor</p>	<p><u>Study 3:</u> Establishment and characterization of the model</p> <p><u>Study 4:</u> Evaluation of corneal wound healing after exposure to different modulating substances</p>	<p><u>Study 5:</u> Evaluation of corneal wound healing after exposure to different melatonin formulations</p>
		

INTRODUCTION

1. OCULAR SURFACE CONCEPT

Evolution has provided humans with one of the most complex visual systems in all Nature. In this framework, it is interesting to highlight the so called Lacrimal Functional Unit, described in 1998 (Stern et al., 1998). This unit is composed of the OS, the different glands that secrete components of the tear film, as well as the communication and regulation mechanisms responsible for maintaining their homeostasis. These mechanisms involve the nervous, hormonal, vascular, and immune systems. The complex functioning of this unit keeps all the components of the system in a delicate balance so that it works correctly at all times. This functional unit is described as an anatomical, histological, physiological, and pathological unit.

Within the Lacrimal Functional Unit, the OS is composed of the epithelia of the cornea and conjunctiva, the tear film that moistens the epithelia, and the underlying connective tissue. The main function of the OS is to protect the inside structures of the eyeball, constituting the first barrier between the environment and the interior of the eye. Also, it allows light to penetrate the eye and reach the retina with the least possible distortion.

The main characteristics of the different components of the Lacrimal Functional Unit are briefly described below.

1.1. The tear film

The tear film is the muco-aqueous gel that serves as an interface between the tissues of the OS and the exterior environment. It is composed of an outer layer of lipid origin, secreted by the Meibomian glands, and an aqueous phase with gel consistency in which a huge diversity of peptides and proteins are dissolved, among which complex glycoproteins such as mucins,

enzymes, and peptides with antimicrobial activity (Pflugfelder and Stern, 2020) are highlighted.

1.2. The cornea

It is the most highly innervated structure in the entire human body, which gives an idea of the importance of the cornea to remain healthy for the correct functioning of the visual system. It is a transparent and highly specialized tissue that lacks both blood and lymphatics vessels, so its physiological requirements must be satisfied by means of the surrounding tissues: the tear film on its anterior side and the aqueous humor on the posterior side. The cornea is responsible for most of the ocular refraction, transmission, and focus of light on the retina. From the anatomical point of view, human cornea has a slightly oval shape, with a horizontal diameter of 11.8 mm and a vertical diameter of 11.2 mm, and its thickness increases progressively from 500 μm in the central area up to 650-700 μm at the periphery. From a structural point of view, the cornea is divided into 5 layers: the epithelium, Bowman's layer, the stroma, Descemet's membrane, and the endothelium (Fine and Yanoff, 1979).

The epithelium is the outermost layer of the cornea and has a mean thickness of 50 μm . This layer is in continuous renewal, generating two cell movements, one from the limbus area (where the stem cells of the corneal epithelium reside), towards the central cornea and another from the most basal layers to the most external ones. The corneal epithelium has between 5 to 7 layers of cells that change their morphology as they progress from the basal layer to the most superficial layer, where they finally detach. These morphological differences correspond to 3 different epithelial cell subtypes present in the different layers: a basal cell layer with a columnar shape, 2 or 3 layers of winged or intermediate cells, and another 2 or 3 layers of squamous cells with a flattened shape.

Bowman's layer is an acellular structure 8 to 12 μm thick, located below the basement membrane of the corneal epithelium. Its main function is to act as a barrier against organisms that have managed to cross the epithelial barrier. Its existence was demonstrated in humans (Dewitt, 1931), primates (Merandana et al., 2001; Hayashi et al., 2002), certain ungulate mammals, sea lions, zebrafish, quail and hens, but it has not yet been found in canids, cats, rabbits, pigs, cows, goats or horses (Streeten et al., 1999; Merayo-Llives et al., 2001; Merandana et al., 2001; Hayashi et al., 2002; Marchan et al., 2002; Gealy et al., 2009; Miller et al., 2010; Gonçalves et al., 2016; Nautscher et al., 2016).

The corneal stroma is the thickest layer of the cornea, about 500 μm in humans, and represents about 90% of its total size. It is mainly composed of types I and V collagen fibers, perfectly distributed, oriented, and arranged in superimposed lamellae that allow a completely transparent mesh. This tissue is synthesized and maintained by keratocytes that are distributed throughout the stromal thickness.

Descemet's membrane is a basement membrane produced by the corneal endothelium. It is between 8 to 12 μm thick and is composed mainly of fibronectin and collagen IV.

Finally, the corneal endothelium is a cell monolayer that completely covers the inside of the cornea. Its main function is to create a very high level of dehydration in the corneal stroma, in order to achieve that the collagen lamellae have a fixed structure that maintains transparency and allows the correct refraction of light. In humans, these cells do not have mitotic capacity, so those that die are not replaced, forcing neighboring cells to increase their size to fill the space so that their function of maintaining dehydrated the stroma is not altered. This phenomenon is called polymegatism.

1.3. The sclerocorneal limbus

The sclerocorneal limbus is the transition zone between the cornea and the sclera and conjunctiva. It is 1 to 2 mm wide and completely surrounds the cornea like a ring. It is an area of special importance, since the corneal epithelium stem cells reside there, essential for its continuous renewal. These cells are housed in a niche formed by ridge-shaped structures called Vogt palisades where they have a suitable microenvironment to maintain their undifferentiated phenotype.

The limbal epithelium is composed of up to 10 layers of cells, of which the first 2 would correspond to squamous cells, the next 6-7 to winged cells, which are in an intermediate state of differentiation, while the basal layer would be constituted by stem cells. Limbal stem cells have a high proliferative and self-renewal capacities. To do this, they divide asymmetrically, giving rise to two daughter cells, one of which maintains the characteristics of a stem cell, while the other will continue to migrate and differentiate itself into cells of the corneal epithelium (Zieske, 1994).

The limbar stroma is a connective tissue greatly innervated and vascularized. It is mainly formed by type IV and VII collagen fibers secreted by resident stromal cells, which are mostly fibroblasts with similar characteristics to those of corneal keratocytes. A small population of mesenchymal stem cells was also found in the limbar stroma (Polisetty et al., 2008), which are believed to have two main functions: to be responsible for the replacement of corneal keratocytes and to participate in the maintenance of the corneal keratocytes undifferentiated phenotype of limbal epithelial stem cells.

1.4. The conjunctiva

The conjunctiva is the mucous tissue that extends from the sclerocorneal limbus to the palpebral margin, covering both the eyeball and the palpebral

tarsus. Anatomically it can be divided into three areas: the bulbar area that lines the eyeball, the palpebral area that covers the palpebral tarsus and the fornix area or *cul-de-sac* that joins both regions. Histologically, the conjunctiva is composed of a non-keratinized squamous stratified epithelium and a loose stroma (Snell et al., 2013).

In the conjunctival epithelium there are five different reported epithelial subtypes: type I cells would correspond to goblet cells, which are cells highly specialized in secreting mucin, and types II-V cells, which are non-goblet, stratified squamous cells with some mucin secretion capacity that represent 85-90% of all conjunctival epithelial cells (Steuhl, 1989). Goblet cells are responsible for specifically secreting mucin MUC5AC, which is extremely important in tear film homeostasis and whose alterations are correlated with OS pathology.

The conjunctival stroma is formed by a loose vascularized connective tissue in which elements of regional immunity are also present, specifically conjunctival-associated lymphoid tissue (CALT) (Knop & Knop, 2000). CALT appears in various regions of the conjunctiva as a diffuse layer of lymphocytes or as complex lymphoid follicles, composed of B and T lymphocytes, macrophages, and dendritic cells. Thanks to the presence of CALT, the conjunctiva can locally produce a complete immune response (Knop & Knop, 2000)

2. REGENERATION OF THE CORNEAL EPITHELIUM

The corneal epithelium constantly renews to confront the possibility of an aggression that may impair its barrier function. Corneal epithelium repair (Liu et al., 2015) is understood as the ability of its cells to close a wound, that is, to create a cell monolayer that quickly covers the basement membrane or

the corneal stroma after being damaged leaving no trace of the process. It is important to note that the cornea is a transparent tissue and that any scar that appears as a result of the repair process can produce opacity and, consequently, have a negative impact on its transparency.

Corneal opacity is one of the main causes of vision loss worldwide, as shown by the fact that in 2001 the cases of monocular blindness, attributable to corneal opacity caused by corneal trauma or ulceration, were estimated at a world incidence of 1.5 to 2.0 million cases per year (Whitcher et al., 2001). The opacity of the cornea can occur for different reasons, either due to trauma, injuries, infections, surgeries, or secondary to other diseases or disorders of the cornea, such as corneal dystrophies. The pathophysiologic processes that lead to corneal opacity after injury are the primary factors in determining whether the opacity will resolve spontaneously and how long would take it to resolve. Most of these processes usually involve corneal stromal keratocytes, although there is a disease, the limbal stem cell deficiency, which causes epithelial defects, corneal opacity and vascularization that exclusively involves corneal epithelial progenitor cells.

On the other hand, the regeneration of the corneal epithelium (Ashby et al., 2014) would be the processes responsible for returning the epithelium to its normal functional state, involving the expansion of the limbal stem cells present.

To properly heal an epithelial corneal wound a complex interplay of many different factors such as cytokines (IL-6, IL-1 α , etc.), growth factors (EGF, TGF- β , FGF, etc.), integrins (α 2 β 1) and proteases (MPPs, uPA) is necessary. In a very schematic way, the wound healing process of corneal epithelium can be divided into 4 phases (Agrawal et al., 2003):

1. Latent phase, in which damaged cells enter apoptosis, intercellular junctions are broken, and junctions with the basement membrane become weaker to allow the next phase to begin.
2. Migration phase, in which cells near the wound edges flatten and migrate towards the damaged area to restore the integrity of the cell layer and cover the injured area .
3. Proliferation and differentiation phase, in which limbal stem cells proliferate to give rise to amplifying cells that differentiate and migrate towards the wounded area to continue dividing and replacing damaged cells.
4. Anchorage phase, in which the new epithelial layer is strongly attached to the basement membrane through hemidesmosomes, leaving the corneal integrity restored.

Corneal damage can occur for different causes (Figure 1). Of the different causes, both chemical and thermal burns produce the release of a series of factors (TNF α , IL1 α and IL1 β) that trigger an inflammatory process at the local level.

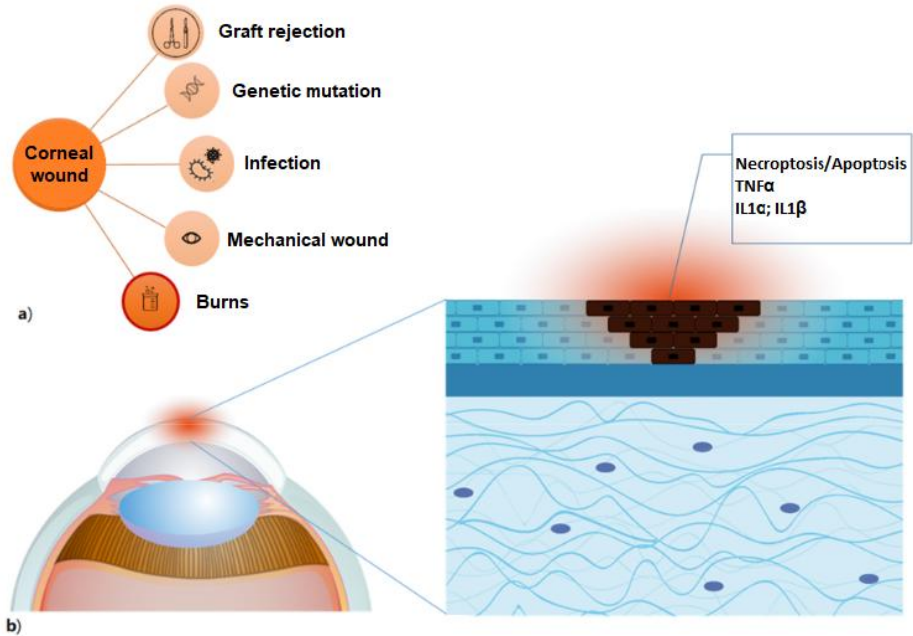


Figure 1. Schematic representation of a corneal wound. (a) List of possible causes of corneal lesion. (b) In the epithelial wounded area produced by burns cells would be in apoptotic or necroptotic state. Modified image of the original from Saccu et al., 2021.

3. CORNEAL WOUND HEALING MODELS

Currently, there are different *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* models available to evaluate corneal wound healing.

Among the *in vitro* models, the most widely used one consists in growing a corneal epithelial cell line until its confluence, to later make a wound by lightly scratching with the tip of a 200 μ l pipette and immediately after that to follow growth and migration of the epithelial cells until the wound is closed (Jabbehdari et al., 2021). Another *in vitro* model seeds corneal epithelial cells in multi-well plates with different conditions to control the time it takes the cells to reach confluence, obtaining an estimate of the effect that these conditions have on cellular growth (Ding et al., 2015).

Indeed, these methods pose important limitations related to the fact that they just use a cell monolayer and not a stratified epithelium.

There are different *in vivo* models described in the literature to study corneal wound healing. Reported models mainly used mice, rats, guinea pigs, and rabbits (Stepp et al., 1993; Moshirfar et al., 2008; Cintron et al., 1979). In general, they consist in producing a wound in the corneal epithelium by different means, the healing of which is followed using sodium fluorescein. A great variety of methods to induce the corneal wound are published, but the most frequently used belong to two main groups: wound produced by a mechanical lesion (Djalilian et al., 2008; Jabbehdari et al., 2021) wounds caused by chemical agents (Matysik-Woźniak et al., 2021; Crooke, et al., 2015). Apart from the epithelial regeneration models mentioned, there are miniature swine breeds, such as the Göttingen minipig, developed in the University of Göttingen (Germany) in 1960', that has become popular in recent years as an alternative animal model. There are several publications using these minipigs in the field of ocular research (Schrader et al., 2018), one of them related to the histological description of the eyeball (Shrader et al., 2019). The Göttingen minipig model is used in research on glaucoma and retina, although we can also find some studies related to corneal damage (Chen et al., 2015; Telinius et al., 2020).

Finally, the use of *ex vivo* models is experiencing a great development and acceptance in recent years (Wehrman et al., 2021; Schumann et al., 2021; Berkowski et al., 2020) as a link between conducting *in vitro* and *in vivo* experiments. These models represent a new step in the screening of new therapies for corneal wound healing, helping to reduce the number of living animals used in research according to the 3Rs guidelines. Eyes from different species such as rabbit, horse, sheep, and pig can be used to develop a

corneal wound healing model. *Ex vivo* models can be done either inducing a mechanical wound or using a chemical agent.

4. MELATONIN AND CORNEAL WOUND HEALING

Melatonin is an indolamine produced primarily by the pineal gland and is involved in a wide variety of cellular processes. Its production varies with changes in the ambient lighting and the sleeping habits of each person, and plasma levels begin to increase 2 hours before the usual sleep time reaching their maximum level between 3 - 4 AM, from where it begins to gradually decrease until reaching its minimum plasma level around 12 PM (Khullar, 2012; Waller et al., 2016). There are several ocular cell types that also synthesize melatonin, including photoreceptors in the retina and epithelial cells of the ciliary body. In these tissues, melatonin participates in different functions, such as the sensitivity to light of horizontal cells, the release of dopamine or the balance between the production and elimination of aqueous humor.

The main receptors for melatonin are two G protein-coupled receptors called MT_1 and MT_2 . These two receptors have different molecular structure; they are composed of 350 and 362 amino acids, respectively, and have a molecular weight of 39-40 kDa (Reppert et al., 1996).

MT_1 and MT_2 receptors were found in the corneal epithelium of humans (Meyer et al., 2002), chickens (Rada et al., 2006), and frogs (*Xenopus laevis*) (Wiechmann et al., 2003). Different roles for melatonin in OS have been suggested over the years. Among them the most important would be the modulation of the corneal hydration level (Wahl et al., 2011), the control of tears production (Hoyle et al., 2003), the protection against reactive oxygen

species (Ciuffi et al., 2003), and the participation in the cell migration process of the corneal epithelium (Crooke et al., 2015).

Recently, melatonin involvement in the healing of the corneal epithelium using MT₁ and MT₂ receptors has been suggested (Crooke et al., 2015). In that work, both melatonin and IIK7, an agonist molecule of the MT₂ receptor and partial agonist of MT₁, induced a faster closure of an epithelial wound in the rabbit cornea compared to that of controls (Crooke et al., 2015).

5. OCULAR PHARMACOLOGICAL TREATMENTS

The main routes of drug administration to the anterior segment of the eye are topical and subconjunctival. The topical route is most used in the form of eye drops because it is not invasive and is easy to apply. The subconjunctival route, on the other hand, involves making an injection through the conjunctiva to create a bleb between the conjunctiva and the sclera that contains the drug, so it must be performed by qualified personnel and can be uncomfortable for the patient.

However, ocular drug administration using the topical route has certain limitations due to ocular anatomy and physiology. One of the main functions of OS is to prevent the entry of foreign agents into the eye acting as a complex barrier (the tear film plus the corneal barrier), which also limits the entry of drugs (Urtti, 2006). The strong adherence of the intercellular junctions of the corneal epithelium (tight junctions, gap junctions and desmosomes) prevents the passage of substances of more than 500 Da, and consequently a maximum of 5% of an instilled drug can pass the barrier and reach target cells. It is also important to keep in mind that instilled drugs come in contact not only with the corneal epithelium but also with the conjunctival epithelium, a looser and more permeable epithelium that allows

the substances administered to go through it easily, reaching the systemic blood circulation (Urtti, 2006). Due to these circumstances, the amount of drug locally available is reduced and possible systemic side effects may occur, which is a very important aspect to consider. On the other hand, the composition of the tear film makes it an aggressive medium against any foreign agent, including drugs (Novack et al., 2016). Finally, the dynamics of tear film renewal and its elimination through the tear drainage system will limit the residence time of a drug in the OS and, consequently, its access to target tissues.

Due to all these challenges, there is a need to develop pharmaceutical formulations that can increase the bioavailability of the active substances applied topically, while respecting the physicochemical characteristics of the tear film to minimize potential irritating effects on the OS. To provide a solution to this problem, pharmaceutical technology offers different strategies, including drug delivery systems to control drug release.

5.1. Drug delivery systems

Multiple technological strategies have been developed to improve drug release conditions, especially to overcome existing barriers to ocular topical administration. Among these strategies, the technology developed to efficiently transport and deliver the active substance on the desired area stands out. The important advantages of drug delivery strategies are related to the i) reduction in the amount of the active molecule necessary to achieve its therapeutic effect; ii) protection and stabilization of the active molecule during its administration; and iii) reduction of the possible side effects that the active molecules could have at the systemic level. Currently, among the different systems developed, the most used at the ocular level are nanoparticles (NPs), liposomes, nanoemulsions, and dendrimers (Figure 2)

(Sahoo et al., 2008; Gaudana et al., 2009; Rodríguez Villanueva et al., 2016; Vaneev et. al., 2021).

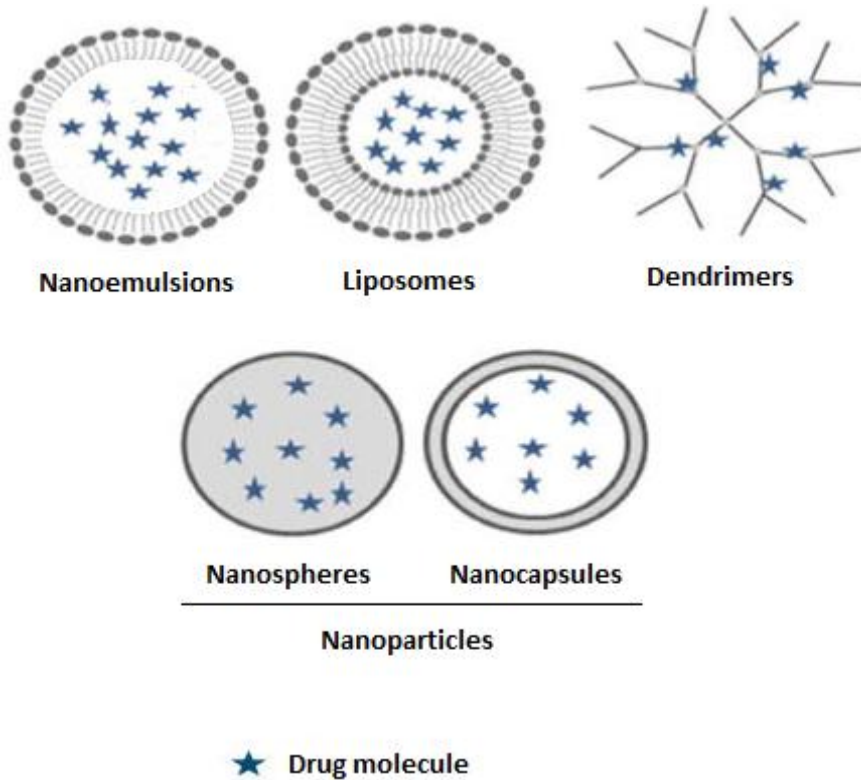


Figure 2. Schematic representation of the main nanotechnological solutions used at the ocular level. Image modified from original by Patel et al., 2013

NPs can encapsulate active molecules while allowing a sustained release over time (Swathi et al., 2010). Compared to liposomes, NPs have a higher loading capacity, greater long-term stability, as well as the possibility of being lyophilized, sterilized, and mass-manufactured (Liu et al., 2010; Chime et al., 2013).

Liposomes are small spheres formed by lipid bilayers with a diameter ranging between 20 nm and 10 μ m, and which can encapsulate both hydrophilic and lipophilic substances. The main problem is its instability and consequent breakdown, which is the reason why different molecules that improve its

structural stability have been studied, such as chitosan (Liu et al., 2015). Liposomes have been shown to be capable of improving drug penetration through the cornea, as well as improving retention time. In general, liposomes penetrate tissues through cellular endocytosis, so this process depends on the composition of the liposomes, their electrical charge and their size. On many occasions, the composition of the liposomes is modified to improve their mucoadhesive capacity, or an external layer is applied to cover the liposomes to improve their penetration.

On the other hand, nanoemulsions are a biphasic dispersion of two immiscible liquids, they are formed by nano-droplets of about 100 nm of water in oil or oil in water, stabilized by using one or more amphiphilic surfactants. Nanoemulsions are characterized by having a greater relative surface area with respect to other formulations and by having a longer-term physical stability, since the small size of the droplets prevents their clumping or sedimentation (Bonferoni et al., 2019).

Finally, dendrimers are nanostructured polymers in three branches of between 3 and 20 nm (Xu et al., 2013) that can have different functional groups in the final parts of their branches (Kompella et al., 2013). Dendrimers can encapsulate active molecules inside or attach them to the terminations of their branches. Of the different technological approaches that have been studied, dendrimers are the ones with the lowest loading capacity (Honda et al., 2013). However, dendrimers of different sizes, with different shapes, are more flexible than other nanosystems and can have a greater or lesser degree of folding (Kannan et al., 2014), which makes them very easily adaptable to different needs. Thanks to these characteristics, dendrimers are positioned as a useful tool to overcome the obstacles presented by the application of drugs at the ocular level (Rodríguez Villanueva et al., 2016).

6. MELATONIN AS AN EYE TREATMENT

It has been proven that the effects of melatonin at the ocular level are multiple, demonstrating its potential to act as a treatment for various pathologies. There are published studies about its ability to reduce cataract formation in rats (Abe et al., 1994; Taysi et al., 2008), and to decrease intraocular pressure in mouse, rabbit and monkey animal models (Martinez-Aguila et al., 2016; Pintor et al., 2003; Serle et al., 2004), and in glaucomatous patients (Pescosolido et al., 2015). Also, the ability of melatonin to protect the retinal pigment epithelium against oxidative stress has been demonstrated (Liang et al., 2004), so it could be used in the treatment of age-related macular degeneration. This specific ability to protect against oxidative stress has allowed to evaluate melatonin as a protective agent against diabetic retinopathy in rat models of diabetes with promising results (Salido et al., 2013; Ozdemir et al., 2014),.

Despite the multiple functions that melatonin develops at the ocular level, currently pharmaceutical preparations containing melatonin are approved only in the Spanish market for the treatment of short-term insomnia in patients over 55 years of age. However, there are several studies in which its use is being tested for the treatment of certain types of cancer, in chronic fatigue syndrome, as well as in various sleep disorders.

The formulation possibilities for melatonin are diverse, and there are examples of its association to lipid nanosystems (liposomes, NPs, niosomes, etc.), metallic NPs, synthetic polymeric NPs, or even graphene (Chuffa et al., 2021). Therefore, depending on the application for which melatonin is going to be used, the formulation process will be very different. At the ocular level, studies have been carried out for the administration of melatonin using PLGA microspheres (Arranz-Romera et al., 2019) and lecithin-chitosan NPs (Hafner et al., 2015), mainly for the treatment of glaucoma, observing a longer

Thesis Report Summary in English

lasting hypotensive effect compared to non-encapsulated melatonin treatment (Leonardi et al., 2015).

MOTIVATION

A neat corneal epithelium healing process is essential for the maintenance of good visual quality, as shown by the latest data published by the World Health Organization (World Health Organization., 2019), according to which corneal opacities are responsible for blindness or low vision of 1.6 and 2.5 million people, respectively.

To achieve effective treatments against corneal blindness related to failures in tissue regeneration, it is essential to develop reliable, complex models in which is possible to study more in depth the corneal regeneration process. To develop such a model, it would be ideal to be able to use material of human origin, but donations of human corneas are used almost entirely for transplants, and it is practically impossible to have corneas in the laboratory that are not usable for transplantation. Considering the similarity that porcine tissues share with those of humans, it could be a good option for the development of corneal regeneration models.

Currently, the most used model to study corneal epithelial healing is an *in vitro* cellular model in which a wound is manually made on a monolayer of corneal epithelial cells and the time to wound closure is monitored. In recent years, an increase in the number of *ex vivo* studies using eyeballs from different animal species has been observed. In those models the healing process is evaluated by making a wound on the cornea in intact eyeballs.

This thesis was focused on the development and characterization of an *ex vivo* model of corneal wound healing using porcine eyes from authorized slaughterhouses. The main purpose was to develop a suitable model to evaluate the potential of new treatments to accelerate the functional recovery of an injured cornea. One of the most promising molecules to be used as a modulator of corneal healing is melatonin (Pintor et al., 2003) and

one of the groups with the greatest international recognition in the investigation of this molecule at the ocular level is Dr. Jesús Pintor Just group (died in April 2019) from the Complutense University of Madrid (Spain). We were fortunate enough to establish a collaboration with this group in order to evaluate whether melatonin improves the healing of the corneal epithelium in the porcine *ex vivo* model.

To perform a functional study with a potentially therapeutic melatonin pharmaceutical formulation we established a collaboration with Professor Jelena Filipović-Grčić group from the University of Zagreb (Croatia), who are experts in the development of new drug delivery systems to improve the topical application of ocular drugs. Thanks to this collaboration, it was possible for me to visit their laboratory for a 3-month research stay and help in the development of NP-based melatonin formulations and to evaluate their effect on corneal healing in the *ex vivo* porcine model.

Finally, this doctoral thesis aims to achieve an affordable laboratory tool to test the effect that new ophthalmic pharmacological formulations may have on the integrity of the OS and its regeneration process prior to conducting studies in experimental animals. In other words, the ultimate purpose would be to initiate an alternative method to the use of animals in order to advance in compliance with the principle of the "three R's" in the use of laboratory animals: replace, reduce, refine.

HYPOTHESIS

It is possible to establish an *ex vivo* corneal wound healing model using eyeballs of porcine origin that is useful to evaluate the action of molecules with therapeutic potential, including melatonin.

OBJECTIVES

General objective

To establish a functional *ex vivo* corneal healing model using porcine eyeballs.

Specific objectives

1. To morphologically characterize the porcine OS in order to establish similarities and differences with regard human OS.
2. To determine the presence of the main melatonin receptors (MT₁ and MT₂) and the melatonin precursor AANAT in porcine OS.
3. To establish an *ex vivo* corneal wound healing model using porcine eyeballs.
4. To test the functionality of the *ex vivo* model developed by studying the effect on the corneal healing process of several molecules with therapeutic potential.
5. To determine the effect of melatonin on the *ex vivo* corneal wound healing model developed.

MATERIALS AND METHODS

Next, we present a summary of the materials and methods used for this thesis work. Both will be exhaustively described in each specific Study.

All the experiments carried out in this doctoral thesis were approved by the IOBA Research Committee. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) recommendations for the use of research animals in ophthalmology and vision sciences were also followed.

1. PREPARATION OF PORCINE EYEBALLS

We used a total of 130 common pig eyes (*Sus scrofa domestica*) obtained from animals that had been slaughtered for human consumption in the local slaughterhouse of Valladolid (Justino Gutierrez SL) and in the local slaughterhouse of Zagreb (Croatia) (Klaonica 32 doo) for the whole thesis work. Animals were both male and female, had an age between 6 and 8 months, and a weight between 90 and 150 kg.

The eyeballs were collected from the slaughterhouses in sterile Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM / F12) culture medium supplemented with 10% of a mixture of antibiotic and antifungal (Anti-Anti) and 0.25 µg / ml amphotericin B. As an exception, the eyes used for histological analysis, which retained the lids, were harvested directly into 4% buffered paraformaldehyde fixative.

Once in the laboratory, all the tissue adjacent to the eyeballs (muscle, fat, and connective tissue) was removed by using forceps and surgical scissors. Clean eyeballs subsequently received 2 washes with 2% povidone iodine for 2 minutes, followed by 2 washes in PBS supplemented with 1% Anti-Anti.

1.1. Eyeballs used in histopathological studies

Once the eyeballs were fixed, they were cut into two halves in the superior-inferior plane and processed in an automatic tissue processor (Leica Biosystems ASP300, Nussloch, Germany) using the following cycles: 20 minutes at room temperature (RT) in 60% alcohol, 20 minutes at RT in 70% alcohol, 2 steps of 20 minutes each at RT in 95% alcohol, 2 steps of 20 minutes each at RT in 100% alcohol, 2 steps of 20 minutes each at RT in 100% alcohol with xylene, 2 steps of 20 minutes each at RT in xylene and, and finally, 4 steps of 15 minutes each at 60 ° C with pressure and vacuum in paraffin. The samples were then embedded in paraffin, cut with a microtome (Microm, Walldorf, Germany) and 4-5 µm histological sections collected on slides.

1.2. Eyeballs used in protein detection

The eyeballs used for protein extraction from specific corneal (epithelium, stroma, and endothelium), and conjunctival (epithelium and stroma) layers were processed as follows. The 12 mm diameter corneal buttons were first extracted using a trephine. Then, 20 µl of the extraction and lysis buffer of the radioimmunoprecipitation assay (RIPA), which is composed of 50 mM HEPES, pH 8, 150mM NaCl, 1% NP-40 (w / v), 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS and an inhibitor cocktail of proteases (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain), were poured on the inside of each corneal button. The corneal endothelial cells were then removed by mechanical debridement using a crescent-type knife. Subsequently, a similar procedure was carried out with the corneal epithelium, using in this case 50 µl of RIPA buffer and lysates of the corneal epithelium were obtained by mechanical debridement. Finally, protein extraction from the corneal stroma was carried out. After removing the endothelium and the epithelium of the corneal buttons, they

were cut into smaller pieces and introduced in a conical mortar together with 70 µl of RIPA buffer.

The bulbar conjunctiva was excised from each eyeball by using forceps and surgical scissors, and the protein lysates of the epithelium and conjunctival stroma were extracted in a differentiated way. For the epithelium, a crescent-type knife and mechanical debridement of the conjunctival epithelium with 50 µl of RIPA buffer were used. For the conjunctival stroma, tissue was minced and pieces introduced into a conical mortar together with 70 µl of RIPA buffer.

Subsequently, all cell lysates were incubated for 30 minutes on ice, centrifuged at 15,000 rpm at 4 °C for 30 minutes and, finally, the supernatants were collected and stored until use at -80 °C.

1.3. Eyeballs used for the development of the ex vivo model of corneal wound healing

After washing in povidone iodide and PBS (Figure 2), the eyeballs were introduced into a laminar flow hood and the wound was made in the central area of the corneal epithelium, following the procedure described in section 1.4.

Once the wounds were made, the anterior ocular surfaces were isolated. A 21G needle was used to make a first hole in the sclera, about 5 mm from the sclerocorneal limbus, then with the help of forceps and surgical scissors the sclera was cut, trying to maintain about 4 mm with the limbus to thus isolating the anterior segment of the eye. Once the anterior segment was separated, two pairs of forceps were used to remove the iris and ciliary body adhered to the perilimbar area. The ocular surfaces were then placed with the inner face up on a 15 ml centrifuge tube tap filled with PBS in order to fill its anterior chamber with a 4% agar-agar solution in DMEM-F12 culture

medium, leaving them in that position until gelation of the solution occurred. In this way, the normal curvature of the SO could be maintained.

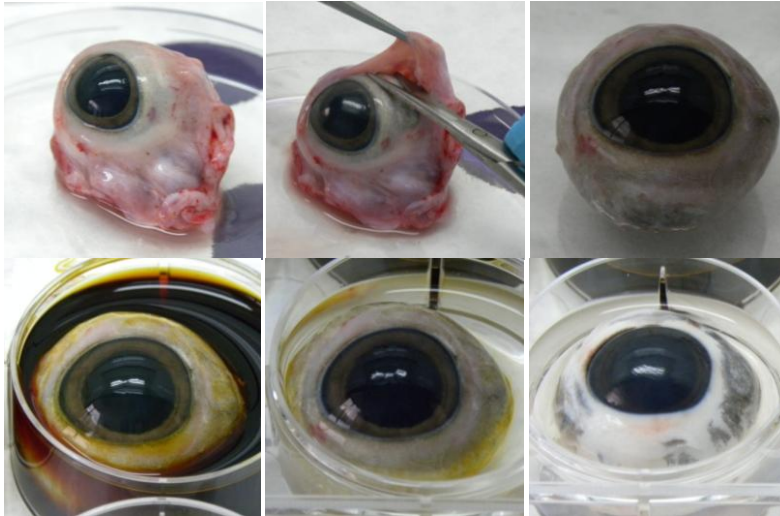


Figure 3. Cleaning and disinfection process of the used eyeballs.

Subsequently, the ocular surfaces were placed in 6-well culture plates with their outer face up and culture medium was added in each of the wells until it reached the limbus. Wounded buttons were then maintained in an incubator at 37 °C, 5% CO₂ and 95% humidity.

1.4. Wounding procedure to develop the ex vivo model of corneal wound healing

Corneal epithelium wounds were done before isolating the corneoscleral rings of the eyeball, as already mentioned. Injuries were produced by either 1) chemical injury with n-heptanol, or 2) mechanical injury with a surgical knife. Undamaged corneal tissues were used as negative controls.

To injure the corneal epithelium using n-heptanol, a 9 mm paper disc impregnated with this chemical agent was used, the excess of it was removed by passing the paper disk through a filter paper. Immediately

afterwards, the disc was placed on the center of the cornea for 30 seconds and then eyeballs washed with PBS.

To perform the mechanical injury, a crescent-type knife was used to manually debride the epithelium of the central cornea without damaging the underlying stroma. First, the area to be injured was delimited by using a trephine to subsequently remove the epithelium.

2. MOPHOLOGICAL ANALYSIS OF PORCINE OS TISSUES

2.1. Histological analysis

Tissue sections were deparaffinized to allow the aqueous solutions used during staining to enter. Three different histological stainings were performed: hematoxylin-eosin (H-E), alcian blue/periodic acid Schiff (AB/PAS) and Giemsa, following the protocols established in the Ocular Surface Group for each of them. H-E staining was used to evaluate general tissue morphological details, AB/PAS staining to identify different types of goblet cells, and Giemsa staining to analyze the presence of inflammatory cells and characterize the lymphoid tissue associated with the porcine conjunctiva.

After staining, all slides were dehydrated and coverslipped. The samples were viewed on a Leica DM4000 B microscope (Leica, Wetzlar, Germany) or scanned using the automatic cell imaging system ACIS III (Dako, Glostrup, Denmark), taking representative photographs in the different tissue areas evaluated. At least 3 representative images were taken for each eye and for each anatomical region analyzed (cornea, limbus, conjunctiva, nictitating membrane, and eyelids).

2.2. Protein location by immunofluorescence

Immunofluorescent protein detection technique is based on the antigen-antibody reaction. In this work we wanted to identify lymphocytes (CD3+), as well as MT₁ and MT₂ melatonin receptors and melatonin precursor molecule AANAT. For this, fixed tissue sections were incubated with various specific primary antibodies (Table 1). Incubation conditions depended on the antibody, the most common being 1 hour at 37 °C or overnight at 4 °C. Three washes with PBS were then done to remove primary antibody excess and incubated with a fluorescent-label secondary antibody (Table 1). The secondary antibody was then incubated for 1 hour at RT. Cell nuclei were identified with Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich), 1: 1000 dilution, incubating for 10 minutes at RT. The preparations were then observed and photographed in a Leica CTR6000 fluorescence microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

2.3. Protein identification by electrophoresis and Western blotting

Western blotting allows protein identification from protein extracts previously separated by size by electrophoresis on a polyacrylamide gel by transferring proteins to a membrane and incubating with specific antibodies. Protein extracts were prepared from each porcine OS tissue as described in section 1.2. of this section. Total protein concentration in tissue extracts was determined using the BCA Pierce protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain).

Table 1. Antibodies used to perform immunofluorescence (IMF) and western-blotting (WB) techniques.

Antibody	Provider	IMF dilution	WB dilution
Anti-MT₁	sc-13179, Santa Cruz, Dallas, TX, USA	1:50*	1:100
Anti-MT₂	ABIN122307, antibodies-online GmbH, Aachen, Alemania	1:500 [#]	1:1000
Anti-AANAT	ab3505, Abcam, Cambridge, UK	1:500 [#]	1:1000
Anti-β-Actina	Anti-β-Actin, Santa Cruz, Dallas, TX, USA	X	1:200
Anti-CD3	ab16669, Abcam, Cambridge, UK	1:200 [§]	X
Donkey Anti-IgG mouse-FITC	AB_2340791, Jackson ImmunoResearch, West Grove, UK	1:100	X
Donkey Anti-IgG rabbit-FITC	AB_2340598, Jackson ImmunoResearch, West Grove, UK	1:100	X
Donkey Anti-IgG rabbit-Alexafluor® 488	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	1:200	X

Secondary antibodies used: * Anti-IgG mouse-FITC; [#] Anti-IgG rabbit-FITC; [§] Anti-IgG rabbit-Alexafluor® 488

The extracts (50 µg of proteins) were diluted in Laemmli's sample buffer, loaded onto polyacrylamide gels with 15% sodium dodecyl sulfate, and proteins resolved according to their electrophoretic mobility (based on their

size). Subsequently, they were transferred to nitrocellulose membranes that were blocked with 5% nonfat skimmed milk powder (Bio-Rad, Madrid, Spain) for 1 hour at RT and then incubated overnight at 4°C in TBS 1X 0.1% Tween 20 containing 5% nonfat milk (blocking buffer) and the primary antibody (Table 1). Membranes were then incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated rabbit or mouse anti-goat IgG antibodies (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) for 1 hour at RT. Subsequently, the proteins were revealed by chemiluminescence using the enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (Amersham Pharmacia Biotech, Barcelona, Spain). Films were scanned with the Gel Logic 200 Imaging System reader (Kodak). Densitometric analysis of the obtained bands was performed using Kodak Molecular Imaging software (v 4.0.3, Kodak, Rochester, NY, USA). The densitometry values of each sample were normalized to the respective densitometric values of β -actin.

3. EVALUATION OF THE FUNCTIONALITY OF THE EX VIVO MODEL

3.1. Corneal wound size assessment

The evolution of the corneal wound healing was registered at different times (24, 48, 72, and 96 hours after wounding, except in certain cases in which these times were prolonged up to 10 more days), using a 2% (w/v) sodium fluorescein solution in PBS. The evaluations were carried out using conical silicone rings that were placed on the cornea and allowed to keep the fluorescein solution on the wound area for a time of 30 seconds. Subsequently, the sclerocorneal buttons were washed with PBS and 3 images were taken per eye using a yellow filter and a cobalt blue light lamp (Conóptica, Barcelona, Spain).

Wound size was measured in relation to the total size of the cornea of each eye using the ImageJ image processing program (www.imagej.edu). The results were expressed as the percentage of the wound area at each evaluation time measured with respect to the total corneal area and compared with the wounded area at 24 hours (100%).

3.2. Evaluation of the effect of different molecules on corneal wound healing.

The molecules used to assess the functionality of the *ex vivo* model of corneal wound healing are collected in Table 2.

Table 2. Molecules used on the *ex vivo* porcine model of corneal wound healing.

Molecule	Function	Provider	Concentration
EGF	Promotes epithelial growth	Invitrogen, Eugene, OR, USA	10 µg/ml
TSP-1	Antiangiogenic and antiinflammatory factor related to dry eye	R&D Systems. Inc. Mineapolis, MN, USA	110 µg/ml
Anti-TSP-1	TSP-1 blocker antibody	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	110 µg/ml
TGF-β2	Modulator of proliferation and differentiation of antigen-presenting cells controlled by TSP-1	Sigma Aldrich, San Luis, MO, USA	5 µg/ml

EGF: epithelial growth factor; TSP-1: trombospondin 1; TGF-β2: transforming growth factor beta 2

Immediately after making the wounds, the eyes were placed in the incubator until the next day to stabilize the sclerocorneal rings. At 24 hours, the first measurement of wound size was done, and wounds exposed to either control or test molecule for 1 hour. To do this, a silicone ring was placed on the rounded surface of the cornea and 200 µl of the solution to be evaluated administered on the tissue surface inside the ring. The administration was always performed inside the incubator. After exposure time the solution was removed, the ocular surface washed by irrigating with 1 ml of PBS, and tissues with the rings in place reintroduced in the incubator until the next evaluation. The evaluation times were 24, 48, and 72, and 96 hours after wounding.

4. PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF NP FORMULATIONS LOADED WITH MELATONIN

4.1. Preparation of melatonin-loaded NPs

The NPs were prepared with chitosan, non-fat soy lecithin with 45% phosphatidyl choline and melatonin, at the Faculty of Pharmacy and Biochemistry of the University of Zagreb (Croatia). Lecithin (NP-L) and lecithin/chitosan (NP-LC) NPs blank or loaded with melatonin were prepared. Encapsulation efficiency (EE%) was measured by determining the amount of free melatonin using the dialysis technique (Hafner et al., 2009). Free (unencapsulated) melatonin in the samples was analyzed by spectrophotometry. The experiment ended when constant values in the melatonin concentration were detected in samples taken consecutively from the receptor phase, always taking into account the progressive dilution of the medium. Subsequently, the encapsulation efficiency was calculated using the following equation:

$$EE\% = [\text{total melatonin}] - [\text{diffused melatonin}] / [\text{total melatonin}] \times 100$$

The drug load (DL%) was calculated using the following equation:

$$DL\% = [\text{total melatonin}] - [\text{diffused melatonin}] / \text{quantity of NPs examined} \times 100$$

NPs obtained after the dialysis process (without free melatonin) were used in all subsequent studies.

4.2. Characterization of NPs loaded with melatonin

The mean size and size distribution of the particles (polydispersity index; PDI) were determined by photon correlation spectroscopy (Zetasizer 3000 HS, Malvern Instruments, Malvern, UK). Measurements were done with a dispersion angle of 90° and at a temperature of 25° C. The samples were measured after having been diluted with 0.45 ml of filtered distilled water to avoid multiple dispersion. The hydrodynamic diameter was calculated starting from the autocorrelation function of the intensity of the light scattered by the particles, assuming that they had a spherical shape. The zeta potential, which refers to the electrostatic charge, was obtained by laser Doppler anemometry using the Zetasizer 3000 HS. For those measurements, the samples were introduced into an electrophoretic cell, in which a potential of 150 mV was established. NPs suspensions were measured after having been diluted in a 10 mM NaCl solution.

5. STATISTICAL ANALYSIS

Data in this thesis report are presented as the mean value of the results \pm the standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed using the SPSS software (Statistical Package for the Social Sciences software 20.0

Thesis Report Summary in English

for Windows, SPSS Inc.). Values of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant.

In most cases, the differences between two conditions were calculated using a Student's *t*-test for independent samples.

To analyze the expression levels of melatonin receptors and AANAT, an analysis of variance (ANOVA) and a Dunnett's multiple comparison test were performed, considering values of the corneal epithelium as control.

RESULTS AND DISCUSSION

This thesis report has been organized in 3 Chapters with 5 different Studies. A summary of the main results obtained in each of them is presented below. Results will be thoroughly described and discussed later in each specific Study.

STUDY 1. HISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE PORCINE OCULAR SURFACE.

In this study we described themorphological details of the porcine OS. The porcine cornea had between 6 and 8 layers of epithelial cells, which were identified as 2-3 layers of basal cells, 2-3 layers of intermediate or winged cells, and 2 layers of squamous cells, stroma, Descemet's membrane, and an endothelial cell monolayer. The total corneal thickness measured was $1131.0 \pm 87.5 \mu\text{m}$ in the central area, and it thickened towards the periphery, reaching $1496.9 \pm 138.2 \mu\text{m}$ in the sclerocorneal limbal area.

The mean density of goblet cells for the whole conjunctiva was 71.25 ± 12.29 cells/mm, varying from a maximum density of 113.04 ± 37.21 cells/mm in the lower palpebral conjunctiva to a minimum density of 12.69 ± 4.29 cells/mm in the bulbar conjunctiva.

Also, the presence of lymphoid tissue associated with the conjunctiva was observed. Its distribution throughout the conjunctiva varied and this tissue appeared as intraepithelial lymphocytes and as diffuse subepithelial lymphoid tissue. Lenticular-shaped lymphoid follicles could also be observed in the conjunctival stroma, with approximately 8 follicles per histological section analyzed.

All together, we demonstrated that the analyzed porcine ocular structures are similar to those of humans, confirming the potential usefulness of pig eyes to study ocular surface pathophysiology

STUDY 2. DETECTION OF MT1 AND MT2 MELATONIN RECEPTORS AND THEIR PRECURSOR MOLECULE AANAT ON THE PORCINE OCULAR SURFACE.

In this study, the distribution and expression levels of the two main melatonin receptors, MT₁ and MT₂, as well as the melatonin precursor molecule AANAT, were analyzed in different tissues of porcine OS. We performed a protein analysis using electrophoresis and Western blotting and immunofluorescent detection techniques. Eyes from domestic white pigs were obtained from a local slaughterhouse and processed for each of the two techniques (n = 8, 4 for the distribution analysis and 4 for the protein expression level analysis).

In general, all three studied molecules, mainly MT₁ and AANAT, were more present in conjunctival than in the corneal tissues. We detected the presence of the MT₁ receptor in the conjunctival epithelium and stroma, and of the MT₂ receptor in all five structures studied, observing a more intense expression in the conjunctival epithelium. In addition, the maximum expression of AANAT was located in the conjunctival stroma and the corneal epithelium, not being present in the endothelium or in the corneal stroma.

Expression levels of MT₁ receptor were almost undetectable in corneal epithelium and endothelium, while it has a significantly higher expression in conjunctival epithelium and stroma and corneal stroma compared to corneal epithelium. Regarding MT₂, it was expressed in each 5 tissues, although its

expression level was significantly lower in conjunctival stroma and in corneal stroma and endothelium compared to that of corneal epithelium, whereas MT₂ expression in conjunctival epithelium was similar to that of corneal epithelium.

Finally, AANAT expression was also detected in each 5 tissues; however, its expression was practically null in corneal stroma and significantly lower in the endothelium and conjunctival epithelium when compared to that of corneal epithelium. Interestingly, a statistically significant higher expression levels was observed in conjunctival stroma compared to corneal epithelium.

Table 3 summarizes our results about presence of MT receptors and AANAT as determined by immunofluorescent detection and Western blotting.

Table 3. Summary of results obtained from the detection of MT₁ and MT₂ by immunofluorescence and Western blotting in the different ocular tissues evaluated.

	Immunofluorescence			Western blotting		
	MT ₁	MT ₂	AANAT	MT ₁	MT ₂	AANAT
Conjunctival epithelium	+	++	-	*** ↑	equivalent to corneal epithelium	*** ↓
Conjunctival stroma	+	+	++	*** ↑	* ↓	** ↑
Corneal epithelium	-	+	+	100%	100%	100%
Corneal stroma	-	+	-	*** ↑	*** ↓	*** ↓
Corneal endothelium	-	+	-	almost undetectable	*** ↓	*** ↓

Subjective expression levels: - absent; + medium; ++ strong.
 p<0.05*; ≤0.01**; ≤0.001***. ↑ Increase; ↓ Decrease

Taking all this information together, the results of this work point to a regional expression of each of these molecules and, possibly, to a specialization of each tissue in modulating functions associated with melatonin and its receptors.

STUDY 3. ESTABLISHMENT AND CHARACTERIZATION OF THE MODEL.

In this study, we established a protocol to systematically develop the *ex vivo* porcine corneal wound healing model in order to subsequently verify its functionality.

First, we determined for how long it was safe to maintain intact (unwounded) corneascleral buttons in culture. We found that the corneal epithelium was not damaged when maintained in culture for up to 5 days. From this moment on some of the corneascleral buttons began to show damaged epithelial areas. For that reason, we decided to maintain porcine *ex vivo* tissues in culture up to 5 days.

Two wounding methods were compared: one mechanical using a surgical knife and the other one chemical using a filter paper impregnated in n-heptanol. The method with the highest repeatability was the mechanical one since the wounds made with the n-heptanol had a more variable morphology and more irregular limits of the injured area, which made more difficult wound size measurement. Also, we observed that healing of wounds performed with n-heptanol was slower than that of surgical wounds. Mean epithelial closure percentages were $59.04 \pm 16.24\%$ and $77.53 \pm 18.65\%$ at 72 and 96 hours after chemical wounding, respectively, while mean closure percentages were 94.72% and 100%, respectively after surgical wounding.

Finally, a higher level of expression of the apoptosis marker TUNEL was observed in the corneal stroma after chemical wound compared to that of corneal stroma after surgical wounding.

In conclusion, we decided to establish the *ex vivo* wound healing model by mechanically injuring the porcine corneal epithelium with a surgical knife and

to maintain tissues in culture up to 5 days (120 hours) to guarantee that the possible damage present in the corneal structures was exclusively due to the substances whose effect on wound healing is evaluated and not to the natural decay of *ex vivo* tissues placed in culture with time.

STUDY 4. EVALUATION OF CORNEAL HEALING AFTER EXPOSURE TO DIFFERENT MODULATING MOLECULES.

In this study, we analyzed the functionality of the *ex vivo* model developed to evaluate the possible modulatory action of different molecules on the corneal epithelium healing process.

First, we checked that the molecules that were going to be tested (EGF, TSP-1, TGF- β 2 and the anti-TSP-1 antibody) did not produce any alteration in the intact corneal epithelium after a 24-hour exposure time using benzalkonium chloride as positive control of epithelial damage. None of them produced any observable damage by fluorescein staining.

Next, the *ex vivo* corneal wound healing model previously established in the Study 3 was exposed to these molecules for a period of 24 hours. After the exposure time to PBS (control), EGF, or TSP-1 wounds closed completely on the third day. However, neither EGF nor TSP-1 increased the rate of wound closure compared to control (PBS). This was an unexpected result, as both EGF and TSP-1 are well known positive modulators of corneal epithelial proliferation. Wound exposure to TGF- β 2 and anti-TSP-1 antibody induced alterations in the epithelium healing rate. We first observed an increase in the wound healing rate rate of wounds exposed to TGF- β 2 at day 1 and 2, although wound size was still larger than that of wounds exposed to either PBS, EGF, or TSP-1 at the same evaluating days. Then, we observed a

decrease in the healing rate at day 3 of evaluation, that enlarged wound size reaching values close to the initial ones. However, in the case of wounds exposed to anti-TSP-1, an increase in wound size was observed from the first day of evaluation, doubling the initial wound size on the third day of evaluation.

Therefore, the porcine *ex vivo* wound healing model responded to the effect of the different molecules studied and we can consider it a functional model. However, the fact that known positive modulators such as EGF and TSP-1 did not induce the expected increase in the reepithelialization rate of wounds warrants further studies to optimize the model. In addition, morphological and molecular studies would benefit the potential use of this model.

STUDY 5. EVALUATION OF CORNEAL WOUND HEALING AFTER EXPOSURE TO DIFFERENT MELATONIN FORMULATIONS.

In this study, we first formulated melatoning using two different polymeric nanoparticles, lecithin (NP-L-MEL) or lecithin-chitosan (NP-L+C-MEL) NPs, to then evaluated how melatonin affects corneal epithelial wound healing in the *ex vivo* porcine corneal wound healing model established in the Study 3.

We observed that after exposing the model to different concentrations of melatonin (0, 5, 30, 60, 90, 120 µg/ml prepared in double-distilled water) for 1 hour, there were no statistically significant differences in the percentage of wound closure among them, although a certain trend towards a higher wound closure was observed at concentrations of 30, 60 and 90 µg/ml.

The physicochemical characterization of blank and melatonin-loaded NP-L and NP-L+C is shown in Table 4.

Table 4. Characteristics of NP formulations.

Type of NP	Size (nm)	zeta potential (mV)	Polidispersity	% of encapsulation
NP-L	75,5 ± 2,6	-29,7 ± 1,0	0,471 ± 0,010	
NP-L-Mel	90,5 ± 1,4	-43,9 ± 3,5	0,369 ± 0,023	20,88 ± 0,20
NP-L+C	269,3 ± 3,5	31,6 ± 1,2	0,370 ± 0,038	
NP-L+C-Mel	264,5 ± 5,9	19,8 ± 0,4	0,316 ± 0,011	21,85 ± 0,24

NP-L: lecithin NPs; NP-L-Mel: melatonin loaded lecithin NPs; NP-L+C: lecithin-chitosan NPs; NP-L+C-Mel: melatonin loaded lecithin-chitosan NPs.

Mechanically wounded porcine corneal preparations were exposed to NP-MEL and controls for 5, 30, or 240 minutes (4 hours). We observed that NP-L-MEL were the only ones that accelerated woundclosure, regardless of the exposure time, while the chitosan solution used as control was the one that produced the lowest rate of wound closure. It seemed that free chitosan significantly delayed corneal healing, while bounded to NPs, this effect disappeared. On the other hand, NP-L and NP-L-MEL showed similar healing rates to that of the control.

In conclusion, none of the melatonin-loaded formulations developed was able to improve the percentage of wound closure in our experimental conditions, although the NP-L-MEL seemed to be the ones with the greatest potential. It is also possible that the model used is not suitable for studying the efficacy of these NP formulations. Further studies are necessary to reformulate the NP-L-Mel and test their potential.

CONCLUSIONS

1. The similarity of porcine and human OS confirms that it is a suitable material for conducting pathophysiological studies related to the structures of the human OS.
2. The main subtypes of melatonin receptors MT_1 and MT_2 and the precursor molecule AANAT are present in the corneal and conjunctival porcine tissues, which make us believe that melatonin could be involved in different processes in porcine OS. The conjunctiva could have a certain capacity for local regulation, given the greater presence of these molecules, especially MT_1 and AANAT, in its tissues than in those of the cornea.
3. We established a repeatable and useful porcine *ex vivo* model making a mechanical wound to evaluate the *ex vivo* wound healing of the porcine corneal epithelium in a short period of time (5 days).
4. The porcine *ex vivo* wound healing model established allows to test the functionality of active molecules with therapeutic potential for corneal epithelial regeneration, although it requires further optimization to extend its use in research.
5. Melatonin has been successfully encapsulated in lecithin and lecithin+chitosan NPs, but its positive effect on the healing rate of *ex vivo* corneal epithelial wounds not been unexpectedly low with the only exception of lecithin NPs loaded with melatonin, which hold promise of potential use of this nanosystems after reformulation and additional studies.

BIBLIOGRAFÍA / REFERENCES

- Abe M, Reiter RJ, Orhii PB, Hara M, Poeggeler B. Inhibitory effect of melatonin on cataract formation in newborn rats: evidence for an antioxidative role for melatonin. *J Pineal Res.* 1994;17(2):94-100. doi:10.1111/j.1600-079x.1994.tb00119.x
- Agrawal VB, Tsai RJ. Corneal epithelial wound healing. *Indian J Ophthalmol.* 2003;51(1):5-15.
- Alarma-Estrany P, Pintor J. Melatonin receptors in the eye: location, second messengers and role in ocular physiology. *Pharmacol Ther.* 2007;113(3):507-522. doi:10.1016/j.pharmthera.2006.11.003
- Arends G, Schramm U. The structure of the human semilunar plica at different stages of its development--a morphological and morphometric study. *Ann Anat.* 2004;186(3):195-207. doi:10.1016/S0940-9602(04)80002-5
- Arranz-Romera A, Davis BM, Bravo-Osuna I, et al. Simultaneous co-delivery of neuroprotective drugs from multi-loaded PLGA microspheres for the treatment of glaucoma. *J Control Release.* 2019;297:26-38. doi:10.1016/j.jconrel.2019.01.012
- Ashby BD, Garrett Q, Willcox MDP. Corneal injuries and wound healing – review of processes and therapies. *Austin J Clin Ophthalmol.* 2014;1(4):1017.
- Berkowski WM Jr, Gibson DJ, Craft SL, Whitley RD, Schultz GS, Plummer CE. Development and assessment of a novel *ex vivo* corneal culture technique involving an agarose-based dome scaffold for use as a model of *in vivo* corneal wound healing in dogs and rabbits. *Am J Vet Res.* 2020;81(1):47-57. doi:10.2460/ajvr.81.1.47

- Bonferoni MC, Rossi S, Sandri G, et al. Nanoemulsions for "Nose-to-Brain" Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2019;11(2):84. Published 2019 Feb 17. doi:10.3390/pharmaceutics11020084
- Chen SC, Telinius N, Lin HT, Huang, MC, Lin, CC, Chou, CH, Hjortdal, J. Use of Fish Scale-Derived BioCornea to Seal Full-Thickness Corneal Perforations in Pig Models. *PLoS One*. 2015;10(11):e0143511. doi:10.1371/journal.pone.0143511
- Chime SA, Attama AA, Builders PF, Onunkwo GC. Sustained-release diclofenac potassium-loaded solid lipid microparticle based on solidified reverse micellar solution: in vitro and in vivo evaluation. *J Microencapsul*. 2013;30(4):335-345. doi:10.3109/02652048.2012.726284
- Chodosh J, Nordquist RE, Kennedy RC. Comparative anatomy of mammalian conjunctival lymphoid tissue: A putative mucosal immune site. *Dev Comp Immunol*. 1998. doi:10.1016/S0145-305X(98)00022-6
- Chuffa LGA, Seiva FRF, Novais AA, et al. Melatonin-Loaded Nanocarriers: New Horizons for Therapeutic Applications. *Molecules*. 2021;26(12):3562. Published 2021 Jun 10. doi:10.3390/molecules26123562
- Cintron C, Hassinger L, Kublin CL, Friend J. A Simple Method for the Removal of Rabbit Corneal Epithelium Utilizing n-Heptanol. *Ophthalmic Research* 1979;11:90–96. doi:10.1159/000264990
- Ciuffi M, Pisanello M, Pagliai G, et al. Antioxidant protection in cultured corneal cells and whole corneas submitted to UV-B exposure. *J Photochem Photobiol B*. 2003;71(1-3):59-68. doi:10.1016/j.jphotobiol.2003.07.004

- Crooke A, Guzman-Aranguez A, Mediero A, et al. Effect of melatonin and analogues on corneal wound healing: involvement of Mt2 melatonin receptor. *Curr Eye Res.* 2015;40(1):56-65. doi:10.3109/02713683.2014.914540
- Dartt DA. The Conjunctiva - Structure and Function. Volume 2. Duane's Foundations of Clinical Ophthalmology . Pennsylvania: Lipincott Williams and Wilkins; 2006.
- Deshpande P, Notara M, Bullett N, Daniels JT, Haddow DB, MacNeil S. Development of a surface-modified contact lens for the transfer of cultured limbal epithelial cells to the cornea for ocular surface diseases. *Tissue Eng Part A.* 2009;15(10):2889-2902. doi:10.1089/ten.tea.2008.0528
- Dewitt, E.N., 1931. The histopathology of Bowman's membrane. *Trans. Am. Ophthalmol.Soc.* 29, 461–485
- Ding J, Wirostko B, Sullivan DA. Human growth hormone promotes corneal epithelial cell migration in vitro. *Cornea.* 2015;34(6):686-692. doi:10.1097/ICO.0000000000000418
- Djalilian AR, Namavari A, Ito A, et al. Down-regulation of Notch signaling during corneal epithelial proliferation. *Mol Vis.* 2008;14:1041-1049. Published 2008 Jun 5.
- Doughty MJ, Zaman ML. Human corneal thickness and its impact on intraocular pressure measures: a review and meta-analysis approach. *Surv Ophthalmol.* 2000;44(5):367-408. doi:10.1016/s0039-6257(00)00110-7
- Fine BS, Yanoff M. Ocular Histology. Second. Hagerstown, Maryland: Harper & Row Publishers; 1979.

- Gaudana R, Jwala J, Boddu SH, Mitra AK. Recent perspectives in ocular drug delivery. *Pharm Res.* 2009;26(5):1197-1216. doi:10.1007/s11095-008-9694-0
- Gealy C, Hayes AJ, Buckwell R, et al. Actin and type I collagen propeptide distribution in the developing chick cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(4):1653-1658. doi:10.1167/iovs.08-2554
- Gipson IK. Goblet cells of the conjunctiva: A review of recent findings. *Prog Retin Eye Res.* 2016;54:49-63. doi:10.1016/j.preteyeres.2016.04.005
- Gonçalves GC, Pérez-Merino P, Martínez-García MC, Barcía A, Merayo-Loves J. Comparison of the characteristics in hen and quail corneas as experimental models of refractive surgery. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2016;91(7):310-315. doi:10.1016/j.oftal.2016.01.012
- Hafner A, Lovrić J, Voinovich D, Filipović-Grcić J. Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: physicochemical characterisation and permeability through Caco-2 cell monolayers. *Int J Pharm.* 2009;381(2):205-213. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.07.001
- Hafner A, Lovrić J, Romić MD, et al. Evaluation of cationic nanosystems with melatonin using an eye-related bioavailability prediction model. *Eur J Pharm Sci.* 2015;75:142-150. doi:10.1016/j.ejps.2015.04.003
- Hayashi S, Osawa T, Tohyama K. Comparative observations on corneas, with special reference to Bowman's layer and Descemet's membrane in mammals and amphibians. *J Morphol.* 2002;254(3):247-258. doi:10.1002/jmor.10030
- Honda M, Asai T, Oku N, Araki Y, Tanaka M, Ebihara N. Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on ocular targets. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:495-503. doi:10.2147/IJN.S30725

- Hoyle CH, Peral A, Pintor J. Melatonin potentiates tear secretion induced by diadenosine tetraphosphate in the rabbit. *Eur J Pharmacol.* 2006;552(1-3):159-161. doi:10.1016/j.ejphar.2006.09.012
- Jabbehdari S, Yazdanpanah G, Chen E, et al. Dose-dependent therapeutic effects of topical 1,25 OH-vitamin D3 on corneal wound healing. *Mol Biol Rep.* 2021;48(5):4083-4091. doi:10.1007/s11033-021-06418-6
- Kannan RM, Nance E, Kannan S, Tomalia DA. Emerging concepts in dendrimer-based nanomedicine: from design principles to clinical applications. *J Intern Med.* 2014;276(6):579-617. doi:10.1111/joim.12280
- Kawano K, Uehara F, Ohba N. Lectin-cytochemical study on epithelial mucus glycoprotein of conjunctiva and pterygium. *Exp Eye Res.* 1988. doi:10.1016/0014-4835(88)90022-X
- Kessing S. Mucous gland system of the conjunctiva: a quantitative normal anatomical study. *Acta Ophthalmol. Suppl.* 1968,95: 1–133
- Khullar A., 2012. The role of melatonin in the circadian rhythm sleep-wake cycle: a review of endogenous and exogenous melatonin. *Psychiatric Times*, 29(7), 26.
- Knop N, Knop E. Conjunctiva-associated lymphoid tissue in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(6):1270-1279.
- Knop E, Knop N. The role of eye-associated lymphoid tissue in corneal immune protection. *J Anat.* 2005. doi:10.1111/j.1469-7580.2005.00394.x

- Kompella UB, Amrite AC, Pacha Ravi R, Durazo SA. Nanomedicines for back of the eye drug delivery, gene delivery, and imaging. *Prog Retin Eye Res.* 2013;36:172-198. doi:10.1016/j.preteyeres.2013.04.001
- Leonardi A, Bucolo C, Drago F, Salomone S, Pignatello R. Cationic solid lipid nanoparticles enhance ocular hypotensive effect of melatonin in rabbit. *Int J Pharm.* 2015;478(1):180-186. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.11.032
- Liang FQ, Green L, Wang C, Alssadi R, Godley BF. Melatonin protects human retinal pigment epithelial (RPE) cells against oxidative stress. *Exp Eye Res.* 2004;78(6):1069-1075. doi:10.1016/j.exer.2004.02.003
- Liu CY, Kao WW. Corneal Epithelial Wound Healing. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2015;134:61-71. doi:10.1016/bs.pmbts.2015.05.002.
- Liu, D., Liu, C., Zou, W. *et al.* Enhanced gastrointestinal absorption of N₃-O-toluyyl-fluorouracil by cationic solid lipid nanoparticles. *J Nanopart Res* 12, 975–984 (2010). doi.org/10.1007/s11051-009-9648-4
- Liu J, Clough SJ, Hutchinson AJ, Adamah-Biassi EB, Popovska-Gorevski M, Dubocovich ML. MT1 and MT2 Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2016;56:361-383. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010814-124742
- Liu Y, Liu D, Zhu L, Gan Q, Le X. Temperature-dependent structure stability and in vitro release of chitosan-coated curcumin liposome. *Food Res Int.* 2015;74:97-105. doi:10.1016/j.foodres.2015.04.024
- Marchant JK, Zhang G, Birk DE. Association of type XII collagen with regions of increased stability and keratocyte density in the cornea. *Exp Eye Res.* 2002;75(6):683-694. doi:10.1006/exer.2002.2058

- Martínez-Águila A, Fonseca B, Pérez de Lara MJ, Pintor J. Effect of Melatonin and 5-Methoxycarbonylamino-N-Acetyltryptamine on the Intraocular Pressure of Normal and Glaucomatous Mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2016;357(2):293-299. doi:10.1124/jpet.115.231456
- Matysik-Woźniak A, Turski WA, Turska M, et al. Kynurenic Acid Accelerates Healing of Corneal Epithelium In Vitro and In Vivo. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021;14(8):753. Published 2021 Jul 30. doi:10.3390/ph14080753
- Menduni F, Davies LN, Madrid-Costa D, Fratini A, Wolffsohn JS. Characterisation of the porcine eyeball as an in-vitro model for dry eye. *Cont Lens Anterior Eye.* 2018;41(1):13-17. doi:10.1016/j.clae.2017.09.003
- Merindano MD, Costa J, Canals M, Potau JM, Ruano D. A comparative study of Bowman's layer in some mammals: Relationships with other constituent corneal structures. *Eur J Anat.* 2002; 6 (3): 133-139.
- Merayo-Llodes J, Yáñez B, Mayo A, Martín R, Pastor JC. Experimental model of corneal haze in chickens. *J Refract Surg.* 2001;17(6):696-699.
- Miller SN, Colitz CM, Dubielzig RR. Anatomy of the California sea lion globe. *Vet Ophthalmol.* 2010;13 Suppl:63-71. doi:10.1111/j.1463-5224.2010.00815.x
- Moshirfar M, Chew J, Werner L, et al. Comparison of the effects of fourth-generation fluoroquinolones on corneal re-epithelialization in rabbit eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2008;246(10):1455-1461. doi:10.1007/s00417-008-0893-5
- Nautscher N, Bauer A, Steffl M, Amselgruber WM. Comparative morphological evaluation of domestic animal cornea. *Vet Ophthalmol.* 2016. doi:10.1111/vop.12298

- Novack GD, Robin AL. Ocular pharmacology. *J Clin Pharmacol.* 2016;56(5):517-527. doi:10.1002/jcph.634
- Ozdemir G, Ergün Y, Bakariş S, Kılınç M, Durdu H, Ganiyusufoğlu E. Melatonin prevents retinal oxidative stress and vascular changes in diabetic rats. *Eye (Lond).* 2014;28(8):1020-1027. doi:10.1038/eye.2014.127
- Patel A, Cholkar K, Agrahari V, Mitra AK. Ocular drug delivery systems: An overview. *World J Pharmacol.* 2013;2(2):47-64. doi:10.5497/wjp.v2.i2.47
- Pescosolido N, Gatto V, Stefanucci A, Rusciano D. Oral treatment with the melatonin agonist agomelatine lowers the intraocular pressure of glaucoma patients. *Ophthalmic Physiol Opt.* 2015;35(2):201-205. doi:10.1111/opo.12189
- Pintor J, Peláez T, Hoyle CH, Peral A. Ocular hypotensive effects of melatonin receptor agonists in the rabbit: further evidence for an MT3 receptor. *Br J Pharmacol.* 2003;138(5):831-836. doi:10.1038/sj.bjp.0705118
- Pflugfelder SC, Stern ME. Biological functions of tear film. *Exp Eye Res.* 2020;197:108115. doi:10.1016/j.exer.2020.108115
- Polisetty N, Fatima A, Madhira SL, Sangwan VS, Vemuganti GK. Mesenchymal cells from limbal stroma of human eye. *Mol Vis.* 2008;14:431-442. Published 2008 Mar 4.
- Rada JA, Wiechmann AF. Melatonin receptors in chick ocular tissues: implications for a role of melatonin in ocular growth regulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(1):25-33. doi:10.1167/iovs.05-0195

- Reppert SM, Weaver DR, Godson C. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol Sci.* 1996;17(3):100-102. doi:10.1016/0165-6147(96)10005-5
- Rodríguez Villanueva J, Navarro MG, Rodríguez Villanueva L. Dendrimers as a promising tool in ocular therapeutics: Latest advances and perspectives. *Int J Pharm.* 2016;511(1):359-366. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.07.031
- Saccu G, Menchise V, Giordano C, Delli Castelli D, Dastrù W, Pellicano R, Tolosano E, Van Pham P, Altruda F, Fagoonee S. Regenerative Approaches and Future Trends for the Treatment of Corneal Burn Injuries. *J Clin Med.* 2021 Jan 16;10(2):317. doi: 10.3390/jcm10020317.
- Sahoo SK, Dilnawaz F, Krishnakumar S. Nanotechnology in ocular drug delivery. *Drug Discov Today.* 2008;13(3-4):144-151. doi:10.1016/j.drudis.2007.10.021
- Salido EM, Bordone M, De Laurentiis A, et al. Therapeutic efficacy of melatonin in reducing retinal damage in an experimental model of early type 2 diabetes in rats. *J Pineal Res.* 2013;54(2):179-189. doi:10.1111/jpi.12008
- Schumann S, Dietrich E, Kruse C, Grisanti S, Ranjbar M. Establishment of a Robust and Simple Corneal Organ Culture Model to Monitor Wound Healing. *J Clin Med.* 2021;10(16):3486. Published 2021 Aug 6. doi:10.3390/jcm10163486
- Seftalioglu A, Tezel G, Tezel T, Alabay B. Ultrastructural demonstration of helix pomatia lectin binding sites in goblet cells of human conjunctiva. *Med J Islam World Acad Sci.* 1993;6: 46–51.
- Serle JB, Wang RF, Peterson WM, Plourde R, Yerxa BR. Effect of 5-MCA-NAT, a putative melatonin MT3 receptor agonist, on intraocular

pressure in glaucomatous monkey eyes. *J Glaucoma*. 2004;13(5):385-388. doi:10.1097/01.ijg.0000133150.44686.0b

- Shrader SM, Greentree WF. Göttingen Minipigs in Ocular Research. *Toxicol Pathol*. 2018;46(4):403-407. doi:10.1177/0192623318770379
- Shrader SM, Mowry RN. Histomorphometric evaluation of the Göttingen minipig eye. *Vet Ophthalmol*. 2019;22(6):872-878. doi:10.1111/vop.12665
- Snell RS, Lemp MA, Snell RS, Lemp MA. The Ocular Appendages In: Clinical Anatomy of the Eye. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd.; 2013. p. 90–131.
- Stepp MA, Spurr-Michaud S, Gipson IK. Integrins in the wounded and unwounded stratified squamous epithelium of the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993;34(5):1829-1844.
- Stern ME, Beuerman RW, Fox RI, Gao J, Mircheff AK, Pflugfelder SC. The pathology of dry eye: the interaction between the ocular surface and lacrimal glands. *Cornea*. 1998;17(6):584-589. doi:10.1097/00003226-199811000-00002
- Steuhl KP. Ultrastructure of the conjunctival epithelium. *Dev Ophthalmol*. 1989;19:1-104.
- Streeten BW, Qi Y, Klintworth GK, Eagle RC Jr, Strauss JA, Bennett K. Immunolocalization of beta ig-h3 protein in 5q31-linked corneal dystrophies and normal corneas. *Arch Ophthalmol*. 1999;117(1):67-75. doi:10.1001/archopht.117.1.67
- Swathi G, Prasanthi N, Manikiran S, Ramarao N. Solid lipid nanoparticles: colloidal carrier systems for drug delivery. *IJPSR*. 2010;1:1-16

- Taysi S, Memisogullari R, Koc M, et al. Melatonin reduces oxidative stress in the rat lens due to radiation-induced oxidative injury. *Int J Radiat Biol.* 2008;84(10):803-808. doi:10.1080/09553000802390932
- Telinius N, Spinozzi D, Rasic D, Dapena, I, Baandrup, U, Miron, A, Oellerich, S, & Hjortdal, J. Göttingen Minipig is not a Suitable Animal Model for *in Vivo* Testing of Tissue-Engineered Corneal Endothelial Cell-Carrier Sheets and for Endothelial Keratoplasty. *Curr Eye Res.* 2020;45(8):945-949. doi:10.1080/02713683.2019.1706747
- Tosini G, Owino S, Guillaume JL, Jockers R. Understanding melatonin receptor pharmacology: latest insights from mouse models, and their relevance to human disease. *Bioessays.* 2014;36(8):778-787. doi:10.1002/bies.201400017
- Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58(11):1131-1135. doi:10.1016/j.addr.2006.07.027
- Vaneev A, Tikhomirova V, Chesnokova N, et al. Nanotechnology for Topical Drug Delivery to the Anterior Segment of the Eye. *Int J Mol Sci.* 2021;22(22):12368. Published 2021 Nov 16. doi:10.3390/ijms222212368
- Wahl C, Li T, Takagi Y, Howland H. The effects of light regimes and hormones on corneal growth in vivo and in organ culture. *J Anat.* 2011;219(6):766-775. doi:10.1111/j.1469-7580.2011.01429.x
- Waller KL, Mortensen EL, Avlund K, et al. Melatonin and cortisol profiles in late midlife and their association with age-related changes in cognition. *Nat Sci Sleep.* 2016;8:47-53. Published 2016 Jan 21. doi:10.2147/NSS.S75946


- Wehrman RF, Genschel U, Charli A, Kanthasamy AG, Allbaugh RA, Ben-Shlomo G. Interleukin-6 and lactate dehydrogenase expression in a novel ex vivo rocking model of equine corneal epithelial wound healing. *Vet Ophthalmol*. 2021;24(5):509-519. doi:10.1111/vop.12935
- Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Health Organ*. 2001;79:214–221.
- Wiechmann AF, Rada JA. Melatonin receptor expression in the cornea and sclera. *Exp Eye Res*. 2003;77(2):219-225. doi:10.1016/s0014-4835(03)00126-x
- World Health Organization. World report on vision. Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241516570>
- Wotherspoon, A. C., Isaacson, P. G., Hardman-Lea, S. Mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) in the human conjunctiva. *J Pathol*, 1994;174(1), 33–37. doi:10.1002/path.1711740106
- Xu Q, Kambhampati SP, Kannan RM. Nanotechnology approaches for ocular drug delivery. *Middle East Afr J Ophthalmol*. 2013;20(1):26-37. doi:10.4103/0974-9233.106384
- Zieske JD. Perpetuation of stem cells in the eye. *Eye (Lond)*. 1994;8 (Pt 2):163-169. doi:10.1038/eye.1994.41

Capítulo 1 / *Chapter 1*

Análisis histológico de la
superficie ocular porcina
/ *Histological analysis of
the porcine ocular surface*



STUDY 1. HISTOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE PORCINE OCULAR SURFACE

**Mario Crespo-Moral, Laura García-Posadas,
Antonio López-García, Yolanda Diebold**


 PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Histological and immunohistochemical characterization of the porcine ocular surface

**Mario Crespo-Moral¹ , Laura García-Posadas¹ , Antonio López-García^{1,2},
Yolanda Diebold^{1,2*}**

1 Ocular Surface Group, IOBA – University of Valladolid, Valladolid, Spain, **2** Biomedical Research Networking Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Valladolid, Spain

 These authors contributed equally to this work.

PLoS One. 2020 Jan 13;15(1):e0227732.




doi: 10.1371/journal.pone.0227732

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31929592/>

This study is a verbatim reproduction of the original research article “Histological and immunohistochemical characterization of the porcine ocular surface”, in which we demonstrated that the porcine ocular surface structures are similar to those of humans, confirming the potential usefulness of pig eyes to study ocular surface physiology and pathophysiology.

RESEARCH ARTICLE

Histological and immunohistochemical characterization of the porcine ocular surface

Mario Crespo-Moral¹ ¹, Laura García-Posadas¹ ¹, Antonio López-García^{1,2}, Yolanda Diebold^{1,2,*} **1** Ocular Surface Group, IOBA – University of Valladolid, Valladolid, Spain, **2** Biomedical Research Networking Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Valladolid, Spain

* These authors contributed equally to this work.

* yol@ioba.med.uva.es



Abstract

The ocular surface of the white domestic pig (*Sus scrofa domestica*) is used as a helpful model of the human ocular surface; however, a complete histological description has yet to be published. In this work, we studied porcine eyeballs with intact eyelids to describe and characterize the different structures that form the ocular surface, including the cornea and conjunctiva that covers the bulbar sclera, tarsi, and the nictitating membrane. We determined the distribution of goblet cells of different types over the conjunctiva and analyzed the conjunctival-associated lymphoid tissue (CALT). Porcine eyeballs were obtained from a local slaughterhouse, fixed, processed, and embedded in paraffin blocks. Tissue sections (4 μm) were stained with hematoxylin/eosin, Alcian blue/Periodic Acid Schiff, and Giemsa. Slides were also stained with lectins from *Arachis hypogaea* (PNA) and *Helix pomatia* (HPA) agglutinins and immunostained with rabbit anti-CD3. We found that the porcine cornea was composed of 6–8 epithelial cell layers, stroma, Descemet's membrane, and an endothelial monolayer. The total corneal thickness was $1131.0 \pm 87.5 \mu\text{m}$ (mean \pm standard error of the mean) in the center and increased to $1496.9 \pm 138.2 \mu\text{m}$ at the limbus. The goblet cell density was 71.25 ± 12.29 cells/mm, ranging from the highest density (113.04 ± 37.21 cells/mm) in the lower palpebral conjunctiva to the lowest density (12.69 ± 4.29 cells/mm) in the bulbar conjunctiva. The CALT was distributed in the form of intraepithelial lymphocytes and subepithelial diffuse lymphoid tissue. Lenticular-shaped lymphoid follicles, about 8 per histological section, were also present within the conjunctival areas. In conclusion, we demonstrated that the analyzed porcine ocular structures are similar to those of humans, confirming the potential usefulness of pig eyes to study ocular surface physiology and pathophysiology.

OPEN ACCESS

Citation: Crespo-Moral M, García-Posadas L, López-García A, Diebold Y (2020) Histological and immunohistochemical characterization of the porcine ocular surface. PLOS ONE 15(1): e0227732. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227732>

Editor: Yu-Chi Liu, Singapore Eye Research Institute, SINGAPORE

Received: November 26, 2019

Accepted: December 27, 2019

Published: January 13, 2020

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227732>

Copyright: © 2020 Crespo-Moral et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All data files are available from the Figshare database (https://figshare.com/articles/Histological_and_immunohistochemical_characterization_of_the_

ESTUDIO 2. DETECCIÓN DE LOS RECEPTORES DE MELATONINA MT₁ Y MT₂ Y DE SU MOLÉCULA PRECURSORA AANAT EN LA SUPERFICIE OCULAR PORCINA



Este estudio ha sido realizado en colaboración con los **Dres. Jesús J. Pintor Just, Hanan Alkozi, J. Gonzalo Carracedo Rodríguez y Fernando Huete Toral** del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Óptica y Optometría de la **Universidad Complutense de Madrid**

RESUMEN

Se ha descrito que la melatonina actúa como acelerador de la cicatrización del epitelio corneal en un modelo animal en conejo a través de sus receptores principales MT₁ y MT₂. El objetivo de este estudio fue identificar la presencia de dichos receptores, así como la de la molécula precursora de la melatonina AANAT, en la superficie ocular porcina mediante inmunofluorescencia y electroforesis y Western blotting.

Este estudio demuestra que los receptores MT₁ y MT₂, y AANAT están presentes en las diferentes partes de la superficie ocular analizadas. Encontrando que MT₁ está sobre expresado, respecto de sus niveles en el epitelio corneal, en el epitelio conjuntival y en los estromas tanto conjuntival como epitelial. Respecto a MT₂ se observa que se encuentra infra expresado en comparación con su nivel del epitelio corneal, en el estroma conjuntival y corneal, y en el endotelio corneal. Mientras que la máxima cantidad de AANAT la hallamos en el estroma conjuntival y las menores en el estroma y endotelio corneales.

Estas diferencias en los niveles de expresión de las moléculas estudiadas en las diferentes zonas de la superficie ocular podrían deberse a las varias funciones que la melatonina lleva a cabo en ella.

INTRODUCCIÓN

La melatonina es una indolamina producida principalmente por la glándula pineal y que participa en una gran variedad de procesos celulares. Su producción varía con los cambios en la iluminación ambiental y los hábitos de sueño de cada persona, observándose cómo comienzan a incrementarse sus niveles plasmáticos 2 horas antes de la hora habitual de sueño y alcanzando su nivel máximo entre las 3 - 4 AM, momento en el que comienza a disminuir paulatinamente hasta alcanzar su nivel plasmático mínimo entorno a las 12 PM (Khullar, 2012; Waller et al., 2016). Hay diversos tipos celulares oculares que también sintetizan melatonina, entre ellos los fotorreceptores en la retina y las células epiteliales del cuerpo ciliar. En esos tejidos la melatonina interviene en diferentes funciones, como la sensibilidad a la luz de las células horizontales, la liberación de dopamina o el equilibrio entre la producción y la eliminación del humor acuoso.

Los principales receptores de la melatonina son dos receptores acoplados a proteínas G denominados MT₁ y MT₂. Estos dos receptores poseen diferente estructura molecular, están compuestos por 350 y 362 aminoácidos, respectivamente, y poseen un peso molecular de 39-40 kDa (Reppert et al., 1996).

Se ha observado que los receptores de melatonina MT₁ y MT₂ se encuentran en el epitelio corneal de los humanos (Meyer et al., 2002), de los pollos (Rada et al., 2006) y de la rana (*Xenopus laevis*) (Wiechmann et al., 2003). A lo largo de los años se han sugerido diferentes roles para la melatonina en la SO. Entre ellos los más importantes serían la modulación del nivel de hidratación corneal (Wahl et al., 2011), el control en la producción de lágrima (Hoyle et al., 2003), la protección frente a especies reactivas del oxígeno (Ciuffi et al., 2003) y la participación en el proceso de migración celular del epitelio corneal (Crooke et al., 2015).

Estudio 2. MT₁, MT₂ y AANAT en la SO porcina

Recientemente, se ha sugerido que la acción de la melatonina sobre la cicatrización del epitelio corneal sigue la vía de los receptores MT₁ y MT₂ al observar que tanto la utilización de melatonina como de IIK7, que es un agonista del receptor MT₂ y un agonista parcial de MT₁, producen un aumento de la velocidad de cierre de una herida epitelial en conejo (Crooke et al., 2015).

Por todo ello, el objetivo de este estudio fue determinar la presencia de los receptores MT₁ y MT₂ y de AANAT en diversas estructuras de la superficie ocular porcina (epitelio, estroma y endotelio de la córnea, y epitelio y estroma de la conjuntiva) y comparar sus niveles de expresión en cada una de ellas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Ojos porcinos

Para este estudio se utilizaron 8 globos oculares de origen porcino provenientes del matadero local Justino Gutiérrez S.L. (Laguna de Duero, Valladolid, España). Los ojos se recogieron en medio de transporte y en las mismas condiciones anteriormente descritas para el Estudio 1. Una vez en el laboratorio los ojos se lavaron con una solución de PBS suplementado al 1% con la mezcla de antibiótico y antimicótico.

A continuación 4 de estos globos oculares se fijaron en una solución de paraformaldehído tamponado al 4% durante 48 horas, para posteriormente ser procesados histológicamente, como ya se ha descrito, y cortados en secciones de 4 μm. Las muestras de tejido obtenidas mediante este procedimiento se utilizaron para realizar el ensayo de inmunofluorescencia.

Los otros 4 globos oculares se utilizaron para realizar la extracción de proteína diferenciada de los diversos tejidos en estudio: epitelio, estroma y endotelio de la córnea, así como epitelio y estroma de la conjuntiva. Para ello se extrajeron en primer lugar los botones corneales de 12 mm de diámetro mediante la utilización de un trépano, sobre la cara interna de cada uno de estos botones corneales se vertieron 20 µl del tampón de extracción y lisis del ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA por sus siglas en inglés) que se compone de HEPES 50 mM, pH 8, NaCl 150mM, NP-40 al 1% (p/v), desoxicolato de sodio al 0,5%, SDS al 0,1% y un cóctel inhibidor de proteasas (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). Seguidamente se procedió a extraer las células endoteliales corneales mediante desbridamiento mecánico utilizando un cuchillote tipo crescent. Posteriormente se procedió de forma similar con el epitelio corneal, si bien en este caso se utilizaron 50 µl de tampón RIPA y se obtuvieron los lisados del epitelio corneal mediante desbridamiento mecánico. Para finalizar, se realizó la extracción proteica del estroma corneal. Tras retirar el endotelio y el epitelio de los botones corneales estos se cortaron en trozos más pequeños que fueron introducidos en un mortero cónico junto con 70 µl de tampón RIPA.

Se separó de cada globo ocular la conjuntiva bulbar mediante el uso de fórceps y tijeras y se extrajeron de forma diferenciada los lisados proteicos del epitelio y del estroma conjuntival. Para ello se utilizó un cuchillote tipo crescent y un desbridamiento mecánico del epitelio conjuntival con 50 µl de tampón RIPA. Para extraer el lisado proteico del estroma conjuntival se introdujeron en un motero cónico junto con 70 µl de tampón RIPA.

Posteriormente, los lisados celulares se incubaron durante 30 minutos en hielo, se centrifugaron a 15.000 rpm a 4°C durante 30 minutos y, por último, se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

Ensayo de inmunofluorescencia

Con este ensayo se localizaron las moléculas en estudio en los 5 tejidos de la superficie ocular. Las secciones del globo ocular porcino se desparafinaron e hidrataron siguiendo el procedimiento habitual ya descrito. Posteriormente se enjuagaron en PBS y se permeabilizaron con una solución del tensoactivo no iónico Tritón X-100 (Tx-100) en PBS al 0.05% durante 30 minutos. A continuación, las secciones se incubaron en una solución de bloqueo con suero de burro normal al 10% durante 1 hora a TA, para evitar la tinción inespecífica. Luego, los anticuerpos primarios correspondientes se incubaron a 4°C durante toda la noche. Para la detección de AANAT, se usó anti-serotonina N-acetiltransferasa de conejo, y para los receptores de melatonina, el anti-receptor de melatonina MT₁ y el anti-receptor de melatonina MT₂ (Tabla 1). Se lavaron las secciones con Tx-100 en PBS al 0,1% y se incubaron con anticuerpo secundario de conejo anti-inmunoglobulina (Ig)G conjugado con FITC a una dilución 1:100 en con Tx-100 en PBS al 0,1% durante 1h en una cámara oscura a TA. en el caso de los anticuerpos anti-AANAT y anti-MT₂, mientras que en el caso de la detección del receptor MT₁ se usó como secundario anti-IgG de burro conjugado con FITC generado en ratón. Los núcleos se tiñeron en rojo con yoduro de propidio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) diluido 1: 500 en PBS durante 10 minutos. Finalmente, las preparaciones se enjuagaron, se montaron en Vectashield (Vector Laboratories, Palex Medical, Barcelona, España) y se cubrieron con cubreobjetos. Las muestras se examinaron bajo un microscopio confocal (Zeiss LSM 5, Jena, Alemania) a 40 aumentos.

Electroforesis y Western blotting

Mediante esta técnica se cuantificó la expresión de los receptores principales de la melatonina y de su precursor AANAT en los 5 tejidos de la superficie ocular porcina en estudio. La concentración total de proteínas en las

muestras se determinó mediante el ensayo de BCA de Pierce (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España). Para realizar el análisis se diluyeron 50 µg de proteínas de cada muestra de tejido en tampón de muestra de Laemmli, se cargaron en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico al 15%, se procedió a la separación de las proteínas según su movilidad electroforética, se comenzó la electroforesis a 80V para concentrar la muestra sobre el gel separador, para seguidamente elevar la potencia hasta 180V, posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con leche en polvo desnatada sin grasa al 5% (Bio-Rad, Madrid, España) durante 1 hora a TA y luego se incubaron durante toda la noche a 4°C en TBS 1X 0.1% Tween 20 que contenía leche sin grasa al 5% (tampón de bloqueo) y el anticuerpo primario (anti-AANAT, 1:1000; anti-receptor de melatonina MT₁, 1:100; o anti-receptor de melatonina MT₂ 1:1000). El anticuerpo monoclonal anti-β-actina (1:200) (Santa Cruz, Dallas, TX, EE. UU.) sirvió como control de carga. Las membranas se incubaron con anticuerpos de conejo o de ratón anti-IgG de cabra conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EE. UU.) durante 1 hora a TA. Posteriormente, se revelaron las proteínas mediante quimioluminiscencia usando el sistema de detección de quimioluminiscencia mejorada (ECL) (Amersham Pharmacia Biotech, Barcelona, España). Las películas se escanearon con el lector *Gel Logic 200 Imaging System* (Kodak, Rochester, NY, EE. UU.). El análisis densitométrico se realizó utilizando el software *Kodak Molecular Imaging* (v 4.0.3, Kodak). Los valores de densitometría de cada muestra se normalizaron a los respectivos valores densitométricos de la β-actina.

Estudio 2. MT₁, MT₂ y AANAT en la SO porcina

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para realizar las técnicas de inmunofluorescencia (IMF) y *western blotting* (WB).

Nombre del anticuerpo	Referencia	Dilución IMF	Dilución WB
Anti-MT₁	sc-13179, Santa Cruz, Dallas, TX, EE.UU.	1:50*	1:100
Anti-MT₂	ABIN122307, antibodies-online GmbH, Aachen, Alemania	1:500 [#]	1:1000
Anti-AANAT	ab3505, Abcam, Cambridge, Reino Unido	1:500 [#]	1:1000
Anti-β-Actina	Anti-β-Actin, Santa Cruz, Dallas, TX, EE.UU.	X	1:200
Anti-CD3	ab16669, Abcam, Cambridge, Reino Unido	1:200 [§]	X
Donkey Anti-IgG mouse-FITC	AB_2340791, Jackson ImmunoResearch, West Grove, Reino Unido	1:100	X
Donkey Anti-IgG rabbit-FITC	AB_2340598, Jackson ImmunoResearch, West Grove, Reino Unido	1:100	X
Donkey Anti-IgG rabbit-Alexafluor® 488	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.	1:200	X

Anticuerpos secundarios utilizados: * Anti-IgG mouse-FITC; [#] Anti-IgG rabbit-FITC; [§] Anti-IgG rabbit-Alexafluor® 488

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA y una prueba de comparación múltiple de Dunnett considerando el epitelio corneal como control. La selección de las áreas marcadas se realizó utilizando el programa Prism Graph Pad (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE. UU.). Todos los datos se expresan como media \pm desviación estándar de 4 experimentos independientes (n = 4).

RESULTADOS

Se realizó el análisis de expresión de los dos principales receptores de la molécula melatonina, y de la proteína AANAT, que es la penúltima enzima en su ruta de síntesis.

Se observó la presencia de MT₁, MT₂ y AANAT tanto en el epitelio como en el estroma conjuntivales, mientras que en los tejidos corneales únicamente se observa claramente la presencia de MT₂ en sus tres capas, y de AANAT en la capa más superficial del epitelio corneal. Se pudo detectar el receptor MT₁ en la capa más superficial del epitelio conjuntival y se observó un claro marcaje citoplasmático en algunas células del estroma conjuntival. Sin embargo, no se aprecia ningún marcaje en las estructuras corneales (Figura 16).

Respecto a la presencia de MT₂ se observa que su expresión se concentra en mayor medida en la capa más externa de los epitelios conjuntival y corneal, mientras que tanto en el estroma conjuntival como en el estroma y el endotelio corneales se encuentran algunas células dispersas con un marcaje citoplasmático (Figura 16).

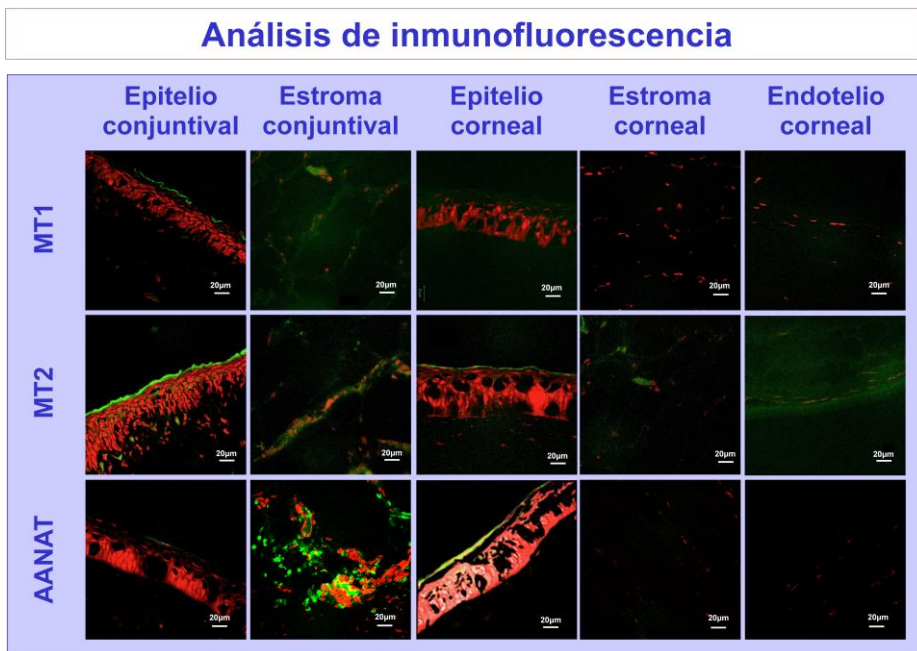


Figura 16. Análisis por inmunofluorescencia de la expresión proteica de MT₁, MT₂ y AANAT en cortes histológicos de las diferentes zonas de la superficie ocular.

Tabla 5. Expresión proteica cualitativa de MT₁, MT₂ y AANAT extraída de las imágenes de inmunofluorescencia.

	Epitelio conjuntival	Estroma conjuntival	Epitelio Corneal	Estroma corneal	Endotelio corneal
MT ₁	+	+	-	-	-
MT ₂	++	+	+	+	+
AANAT	-	++	+	-	-

Intensidad subjetiva de la expresión: - ausente; + media; ++ fuerte.

En cuanto a la cuantificación de la expresión de los receptores de la melatonina, se observó un nivel de expresión de MT₁ en el epitelio y el estroma conjuntivales y en el estroma corneal significativamente superior al del epitelio de la córnea (Figura 17). La expresión en el endotelio corneal fue prácticamente indetectable. El receptor MT₂ se expresó en todos los tejidos estudiados (Figura 18), si bien tanto en el estroma conjuntival como en el estroma como en el endotelio corneal su nivel de expresión fue estadísticamente inferior al del epitelio corneal.

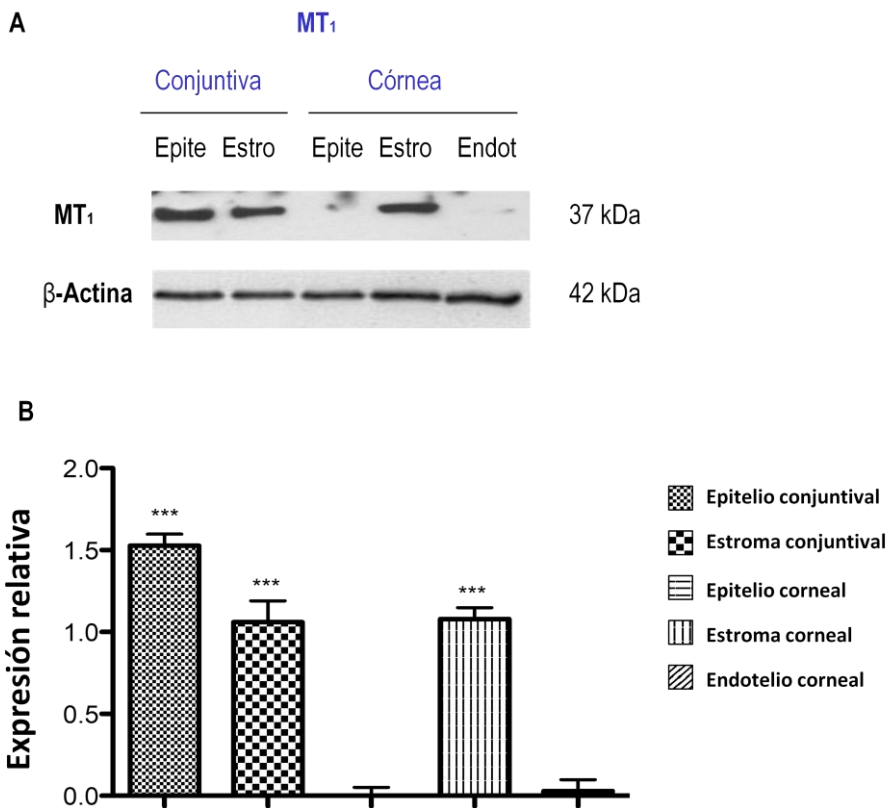


Figura 17. Expresión proteica de MT₁ diferenciada para las 5 zonas de la superficie ocular en estudio. (A) Imágenes representativas de las bandas obtenidas mediante electroforesis y *western blotting*. (B) Valor medio del análisis densitométrico de las bandas. La expresión de MT₁ fue significativamente mayor en el epitelio y en el estroma conjuntivales, y en el estroma corneal respecto a la del epitelio corneal. $p < 0,001$ *** (n = 4)

Estudio 2. MT₁, MT₂ y AANAT en la SO porcina

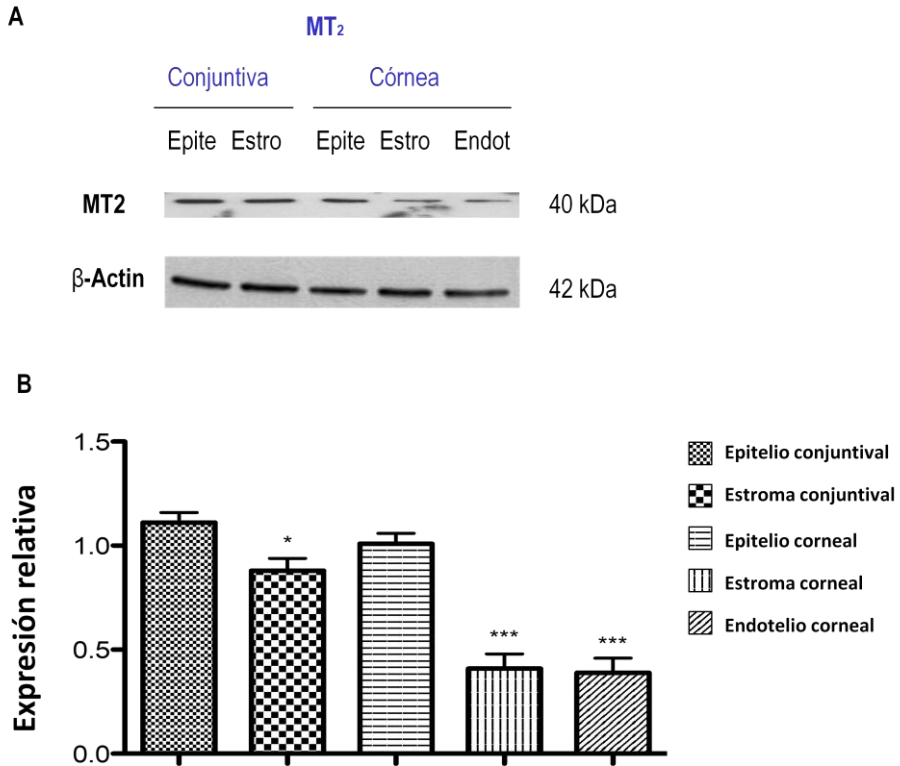


Figura 18. Expresión proteica de MT₂ diferenciada para las 5 zonas de la superficie ocular en estudio. (A) Imágenes representativas de las bandas obtenidas mediante electroforesis y *western blotting*. (B) Valor medio del análisis densitométrico de las bandas. La expresión de MT₂ fue significativamente menor en el estroma conjuntival, y en el estroma y endotelio corneales respecto a la del epitelio corneal. $p < 0,05^*$; $\leq 0,001^{***}$ (n = 4)

En cuanto a AANAT, se vio que se expresaba en los 5 tejidos analizados (figura 19). Se observó que su expresión era significativamente mayor en los tejidos conjuntivales que en los de la córnea. Destaca especialmente el estroma corneal, donde la expresión de AANAT fue prácticamente indetectable. La mayor expresión relativa de AANAT se detectó en el estroma de la conjuntiva, seguida de los epitelios y finalmente del endotelio corneal.

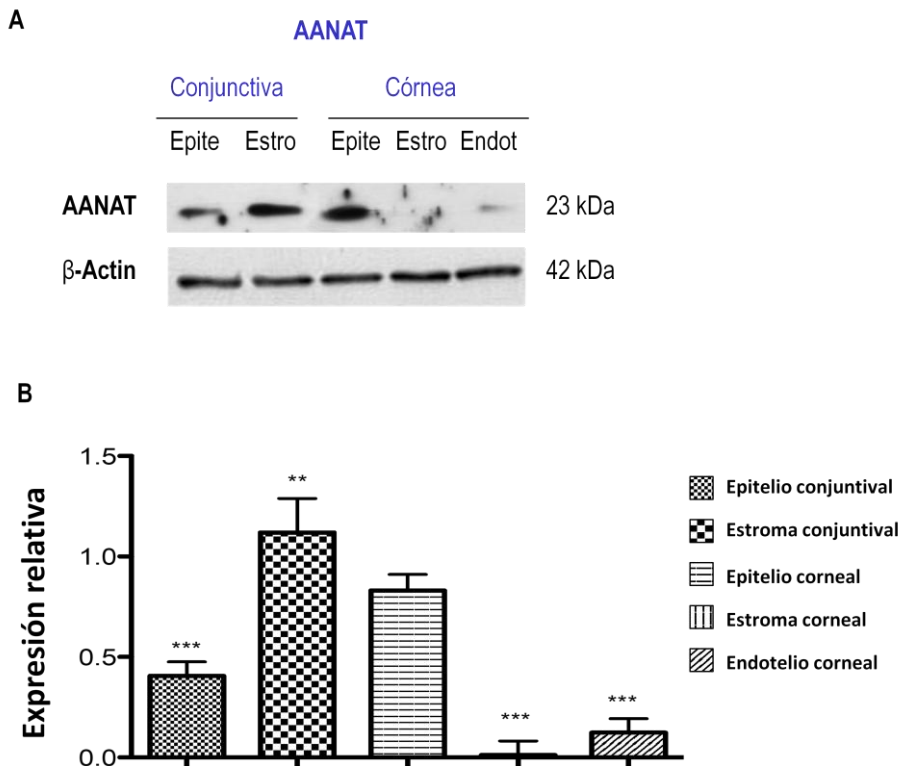


Figura 19. Expresión proteica de AANAT diferenciada en 5 zonas de la superficie ocular. (A) Imágenes representativas de las bandas obtenidas mediante electroforesis y western blotting. (B) Valor medio del análisis densitométrico de las bandas. La expresión de AANAT fue significativamente mayor en el estroma conjuntival respecto a la del epitelio corneal y significativamente menor a este en el epitelio conjuntival, y el estroma y el endotelio corneal. $p \leq 0,01^{**}$; $\leq 0,001^{***}$ (n = 4)

DISCUSIÓN

En este estudio se ha evaluado la presencia de los receptores de la melatonina MT₁ y MT₂, así como de la molécula AANAT, que es la precursora y el principal factor limitante de la expresión de la melatonina. Se ha realizado una descripción detallada de la presencia de estas moléculas en el epitelio, el estroma y el endotelio de la córnea, y en el epitelio y el estroma de la conjuntiva, encontrándose diferencias llamativas entre córnea y conjuntiva.

La melatonina ha sido relacionada a lo largo del tiempo con diferentes funciones en la superficie ocular, como la modulación del nivel de hidratación corneal (Wahl et al., 2011), el control en la producción de lágrima (Hoyle et al., 2003), la protección frente a especies reactivas del oxígeno (Ciuffi et al., 2003) o la participación en el proceso de migración celular del epitelio corneal (Crooke et al., 2015). Es lógico pensar que siendo una molécula involucrada en tantos procesos y tan importantes de la superficie ocular habrían de encontrarse sus receptores en los tejidos de prácticamente cualquier especie animal. No obstante, hasta el momento la presencia del receptor MT₁ solo se ha podido demostrar en los queratocitos y el endotelio corneal del ser humano (Meyer et al., 2002), en las corneas de la gallina (Rada et al., 2006) y de la rana *Xenopus laevis* (Wiechmann et al., 2003), y el receptor MT₂ se ha identificado en la córnea de conejo (Crooke et al., 2014) y en la de la rana (Wiechmann et al., 2004). Este trabajo pone de manifiesto por primera vez la presencia de estos dos receptores en la córnea y la conjuntiva de cerdo.

Por otro lado, el hecho de que la distribución de cada uno de estos receptores sea diferente en cada uno de los tejidos estudiados (epitelio, estroma y endotelio) podría sugerir que el efecto que la melatonina tiene en cada uno de ellos es diferente. Se observó que el receptor MT₁ se expresa

principalmente en el tejido conjuntival, tanto en el epitelio como en el estroma, por lo que este receptor, en el caso del cerdo, podría tener relación con la modulación de la producción de lágrima. Por su parte, el receptor MT₂ se encuentra presente en todas las estructuras analizadas: a) su presencia en el endotelio corneal podría indicar una cierta implicación en la regulación de la hidratación corneal b) su presencia en el epitelio corneal podría estar relacionada con una función moduladora en el proceso de migración celular del epitelio corneal, y c) su presencia en el estroma corneal y conjuntival, además de en el epitelio conjuntival, podría tener relación con la modulación de la producción de lágrima causada por la melatonina.

Tradicionalmente, se pensaba que la melatonina se producía de forma exclusiva en la glándula pineal, una producción controlada por el marcapasos circadiano central, localizado en el núcleo supraquiasmático en el hipotálamo. El núcleo supraquiasmático controla el ritmo de producción de la melatonina mediante el sistema simpático e involucra la activación del precursor de la melatonina AANAT (Tosini et al., 2014). Más recientemente se ha observado que la melatonina también se produce de forma local en diferentes estructuras oculares. Este estudio demuestra la presencia de AANAT principalmente en los epitelios corneal y conjuntival, y también en el estroma conjuntival, lo que podría sugerir una cierta capacidad de autorregulación de las funciones anteriormente descritas en estos tejidos. De esta forma, la superficie ocular tendría cierta capacidad de producir melatonina y responder de forma localizada ante una agresión externa.

Como conclusión de este estudio se puede mencionar que los receptores de melatonina MT₁ y MT₂ están presentes en los tejidos de la córnea y de la conjuntiva porcinas, lo que lleva a pensar que la melatonina podría estar involucrada en diferentes procesos en su SO, similares a los descritos para otras especies, incluida la modulación de la cicatrización corneal. Estos

procesos podrían tener cierta capacidad de regulación a nivel local, debido a que el precursor de la melatonina AANAT también está presente en varias de las zonas evaluadas de la SO porcina.

BIBLIOGRAFÍA

- Ciuffi M, Pisanello M, Pagliai G, et al. Antioxidant protection in cultured corneal cells and whole corneas submitted to UV-B exposure. *J Photochem Photobiol B.* 2003;71(1-3):59-68. doi:10.1016/j.jphotobiol.2003.07.004
- Crooke A, Guzman-Aranguiz A, Mediero A, et al. Effect of melatonin and analogues on corneal wound healing: involvement of Mt2 melatonin receptor. *Curr Eye Res.* 2015;40(1):56-65. doi:10.3109/02713683.2014.914540
- Hoyle CH, Peral A, Pintor J. Melatonin potentiates tear secretion induced by diadenosine tetraphosphate in the rabbit. *Eur J Pharmacol.* 2006;552(1-3):159-161. doi:10.1016/j.ejphar.2006.09.012
- Khullar A., 2012. The role of melatonin in the circadian rhythm sleep-wake cycle: a review of endogenous and exogenous melatonin. *Psychiatric Times*, 29(7), 26.
- Meyer P, Pache M, Loeffler KU, et al. Melatonin MT-1-receptor immunoreactivity in the human eye. *Br J Ophthalmol.* 2002;86(9):1053-1057. doi:10.1136/bjo.86.9.1053
- Rada JA, Wiechmann AF. Melatonin receptors in chick ocular tissues: implications for a role of melatonin in ocular growth regulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(1):25-33. doi:10.1167/iovs.05-0195

- Reppert SM, Weaver DR, Godson C. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol Sci.* 1996;17(3):100-102. doi:10.1016/0165-6147(96)10005-5
- Tosini G, Owino S, Guillaume JL, Jockers R. Understanding melatonin receptor pharmacology: latest insights from mouse models, and their relevance to human disease. *Bioessays.* 2014;36(8):778-787. doi:10.1002/bies.201400017
- Wahl C, Li T, Takagi Y, Howland H. The effects of light regimes and hormones on corneal growth in vivo and in organ culture. *J Anat.* 2011;219(6):766-775. doi:10.1111/j.1469-7580.2011.01429.x
- Waller KL, Mortensen EL, Avlund K, et al. Melatonin and cortisol profiles in late midlife and their association with age-related changes in cognition. *Nat Sci Sleep.* 2016;8:47-53. Published 2016 Jan 21. doi:10.2147/NSS.S75946
- Wiechmann AF, Rada JA. Melatonin receptor expression in the cornea and sclera. *Exp Eye Res.* 2003;77(2):219-225. doi:10.1016/s0014-4835(03)00126-x

Capítulo 2 / *Chapter 2*

Desarrollo de un modelo
ex vivo de cicatrización
corneal / *Development of*
an ex vivo model of
wound healing

ESTUDIO 3. ESTABLECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL MODELO

RESUMEN

En este estudio se desarrolla un método para establecer un modelo *ex vivo* en cerdo de cicatrización del epitelio corneal que permita valorar el proceso de cicatrización de una forma sencilla y fiable.

Para ello, se produjeron heridas en el epitelio corneal mediante un agente químico (n-heptanol) o de forma mecánica (con un cuchillete), siguiéndose su evolución a lo largo de un periodo de 10 días. Se valoraron tanto la repetibilidad de la realización de las heridas como su tasa de cicatrización. Se realizó un estudio histológico de la evolución de las heridas que se producían en la córnea a los diferentes tiempos de evaluación y también de la apoptosis celular.

Se observó que tras 6 días de cultivo en un 44% de los ojos estudiados comenzaba a producirse una lesión a nivel epitelial no deseado con forma de arco cerca de la zona limbal. También se observó que el ritmo de cicatrización de las heridas realizadas con el n-heptanol era más lento que el de aquellas hechas de forma mecánica. Por último, se observó un mayor nivel de apoptosis en el estroma corneal en aquellos casos en los que la herida se realizaba con el n-heptanol.

Con todo ello, se decidió realizar la lesión corneal de forma mecánica y mantener en cultivo el tejido *ex vivo* solo 5 días (120 horas), para garantizar que los cambios en las estructuras corneales que sucedieran al evaluar el efecto de moléculas activas de potencial terapéutico era consecuencia de la exposición a esas moléculas y no del deterioro natural que sufren los tejidos que se mantienen en cultivo.

INTRODUCCIÓN

Actualmente se pueden encontrar diferentes modelos de estudio *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* que permiten evaluar la regeneración corneal de manera más o menos precisa.

Dentro de los modelos *in vitro*, el más utilizado consiste en hacer crecer una línea celular de epitelio corneal hasta su confluencia para posteriormente realizar una herida rascando levemente con la punta de una pipeta de 200 μ l, inmediatamente después se hace un seguimiento del crecimiento y migración de las células epiteliales hasta que se produce el cierre de la herida (Jabbehdari et al., 2021). Otro modelo *in vitro* utilizado anteriormente para evaluar el crecimiento del epitelio corneal consiste en la siembra de las células epiteliales corneales en pocillos con diferentes condiciones para controlar el tiempo que tardan estas en llegar a confluencia obteniendo una estimación del efecto que estas condiciones tienen en el crecimiento celular (Ding et al., 2015).

En los modelos *in vivo* que se encuentran descritos en la literatura se realiza una herida o una abrasión en el epitelio corneal para hacer un seguimiento mediante el uso de fluoresceína sódica del tiempo que esta tarda en cicatrizar. Se observa una gran variedad de formas de realización de las lesiones que se pueden dividir en dos grupos, aquellas que causan una herida física (Djalilian et al., 2008; Jabbehdari et al., 2021) o las que están provocadas por el uso de agentes químicos (Matysik-Woźniak et al., 2021; Crooke, A et al., 2015). Por otro lado, para este tipo de experimentos se utiliza una gran variedad de especies de animales de laboratorio, principalmente se han realizado estudios en ratón, rata, cobaya y conejo (Djalilian et al., 2008; Matysik-Woźniak et al., 2021; Crooke, et al., 2015). Los modelos de estudio usando tejidos *ex vivo* están teniendo un gran desarrollo y aceptación a lo largo de los últimos años (Wehrman et al., 2021; Schumann

Estudio 3. Establecimiento del modelo de herida corneal

et al., 2021; Berkowski et al., 2020), debido en gran parte a su utilización como nexo entre la realización de experimentos *in vitro* y los experimentos *in vivo*. Estos modelos han supuesto un nuevo paso en el cribado del uso de nuevas moléculas para la cicatrización corneal, ayudando a que el número de experimentos realizados en animales de laboratorio sea menor y con una mayor expectativa de éxito. Los modelos *ex vivo*, al igual que los *in vitro*, permiten realizar una lesión de manera mecánica o con un agente químico. También se encuentra cierta variedad en la procedencia de los ojos utilizados para desarrollar estos modelos, como por ejemplo conejo, caballo y cerdo (Berkowski et al., 2020; Marlo et al., 2017; Flueckiger et al., 2005).

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue poner a punto un modelo *ex vivo* de herida corneal usando tejidos de cerdo que ayude en el estudio del proceso de cicatrización corneal de una manera fiable y que permita evaluar el potencial de nuevos tratamientos para acelerar la recuperación funcional de una córnea.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención y preparación de los ojos de cerdo

Se utilizaron 36 globos oculares de origen porcino para evaluar cual era el método más adecuado para realizar la herida corneal y el tiempo máximo que se podría mantener en cultivo el tejido *ex vivo*. Para ello los ojos se recogieron en un matadero local (Justino Gutierrez S.L) en Medio de Transporte (DMEM/F12 estéril, 10% de Anti-Anti y 0,25 µg/ml de anfotericina B). Una vez en el laboratorio, se retiró el material adyacente a los ojos mediante el uso de fórceps y tijeras, y se pasaron por 2 lavados de povidona yodada durante 2 minutos, tras los cuales los ojos se lavaron 2 veces en PBS suplementado con un 1% de Anti-Anti.

Estudio 3. Establecimiento del modelo de herida corneal

Seguidamente, se procedió a realizar la herida en el epitelio corneal bajo campana de flujo laminar, mediante dos métodos: 1) lesión química con n-heptanol y 2) lesión mecánica mediante un cuchillete. Como control negativo se utilizaron globos a los que no se les producía ninguna lesión en la córnea.

Para realizar la lesión mediante n-heptanol se utilizó un disco de papel de 9 mm impregnado en el agente químico del que se retiraba el exceso pasándolo por un papel de filtro. Inmediatamente después se colocaba sobre el centro de la córnea durante 30 segundos y tras retirar el papel los ojos se lavaban con PBS.

Para realizar la lesión mecánica se utilizó un cuchillete tipo crescent para desbridar el epitelio de la córnea central manualmente sin dañar el estroma subyacente. Primero se delimitaba la zona a lesionar mediante el uso de un trépano para posteriormente eliminar el epitelio.

Una vez realizadas las heridas se aislaron las superficies oculares anteriores. Se utilizó una aguja de 21G para hacer un primer agujero en la esclera, a unos 5 mm del limbo esclerocorneal, seguidamente con la ayuda de unos fórceps y unas tijeras se procedía a cortar la esclera intentando mantener unos 4 mm con el limbo para de esa forma aislar el polo anterior del ojo. Una vez separado el polo anterior se utilizaban una pareja de fórceps para retirar el iris y cuerpo ciliar que quedaban adheridos a la zona perilimbar. Se colocaron las superficies oculares con la cara interna hacia arriba sobre un tapón de tubo de centrifuga de 15 ml relleno de PBS para de esta forma rellenar su cámara anterior con una solución de agar-agar al 4% en medio de cultivo DMEM-F12 dejándolas en esa posición hasta que se producía la gelificación de la solución lo que permitía mantener la curvatura normal de la superficie ocular. Posteriormente, se colocaron las superficies oculares en placas de cultivo de 6 pocillos con su cara externa hacia arriba (botones esclerocorneales) y se añadió medio de cultivo en cada uno de los pocillos

Estudio 3. Establecimiento del modelo de herida corneal

hasta que este alcanzara el limbo. El mantenimiento de los botones se llevó a cabo en un incubador a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad.

Evaluación de la evolución de la herida corneal mediante el uso de fluoresceína

Se siguió la evolución de la cicatrización de las heridas durante 9 días, realizándose evaluaciones cada 24 horas mediante el uso de una solución de fluoresceína sódica al 2% (p/v) en PBS. Las evaluaciones se realizaron mediante la utilización de unos anillos cónicos de silicona, que se situaban sobre la córnea, permitiendo así el mantener la solución de fluoresceína sobre la zona lesionada durante un tiempo de 30 segundos. Posteriormente, se lavaban los botones esclerocorneales con PBS y se tomaban 3 imágenes mediante el uso de un filtro amarillo y una lámpara de luz azul cobalto (Conóptica, Barcelona, España). El tamaño de las heridas se midió en las imágenes en relación con el tamaño total de la córnea de cada ojo utilizándose el programa de procesamiento de imagen ImageJ (www.imagej.edu). Los resultados se expresan como el porcentaje del área de la herida a cada uno de los tiempos medidos respecto del área corneal total y comparados con dicho ratio tras la medición inicial (área de la herida cicatrizada a día 1 = 0%).

Estudio histológico del tejido lesionado

Los botones esclerocorneales se fijaron en paraformaldehído tamponado al 4% a diferentes tiempos tras la realización de la herida (1, 3, 7 y 10 días). Una vez fijados se procesaron, se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones de 4 µm de espesor con un micrótopo (Microm, Walldorf, Alemania)

La morfología de los tejidos lesionados se evaluó en las secciones de tejido mediante microfotografías de las secciones corneales teñidas mediante H-E. Para ello se rehidrataron los cortes durante 1 minuto en agua destilada, se

sumergieron en Hematoxilina de Meyer (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.) durante 5 minutos, y se lavaron en agua corriente durante 10 minutos. Posteriormente, los cortes se enjuagaron en etanol al 80% durante 1 minuto y se sumergieron en eosina (Fluka, Buchs, Suiza) durante 5 minutos. Finalmente, los cortes fueron deshidratados, lavados y montados con *cover slips*. Para realizar su visualización se utilizó el microscopio epifluorescente Leica DMI 6000B en el que se tomaron imágenes representativas.

También se evaluó la muerte celular por apoptosis celular que se producía en los tejidos con la técnica de TUNEL (Roche, Basilea, Suiza). Para ello tras desparafinar los cortes se lavaron dos veces con PBS, seguidamente se añadieron 50 μ l de la mezcla reactiva TUNEL en las muestras y se incubaron en cámara húmeda durante 60 minutos a 37°C en oscuridad, posteriormente se enjuagaron los cortes 3 veces con PBS y fueron deshidratados, lavados y montados con *cover slips* previo a su visualización.

RESULTADOS

Evaluación del tiempo máximo de mantenimiento del tejido ex vivo en cultivo

En primer lugar, se estudió la evolución de los tejidos en cultivo manteniendo los anillos esclerocorneales sin realizar lesión sobre ellos en cultivo durante 10 días. Se observó (Figura 20) que el modelo planteado era viable durante un periodo máximo de 6 días, ya que pasado ese tiempo en algunos casos se podían observar pequeñas heridas a nivel epitelial en la zona del limbo esclerocorneal que iban progresando en el tiempo (Figura 21).

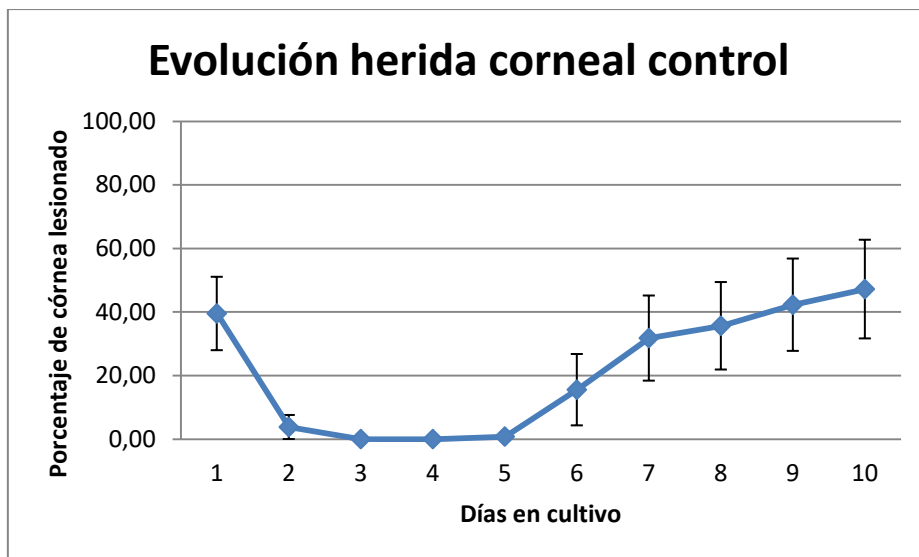


Figura 20. Evolución de la superficie corneal marcada de los botones corneoesclerales mediante fluoresceína respecto del tamaño total corneal durante 10 días de cultivo.

Se decidió, por lo tanto, un tiempo máximo de 5 días para el seguimiento de la evolución de la herida en el modelo de cicatrización corneal *ex vivo*.

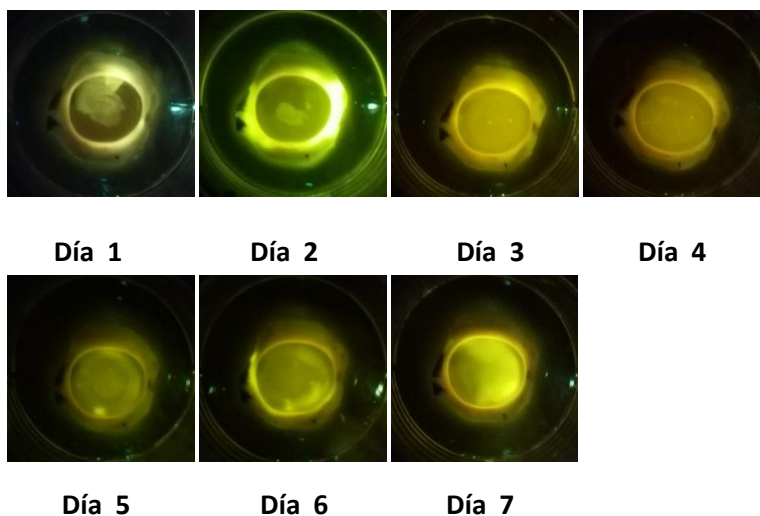


Figura 21. Imágenes representativas de la evolución del tamaño de la herida corneal mediante fluoresceína durante los primeros 7 días de cultivo.

Evaluación de los distintos métodos de realización de la herida

Tras el seguimiento de 5 días se observó que las heridas realizadas de forma mecánica eran más repetibles en forma y tamaño que las producidas usando el n-heptanol (Figura 22). Además, el daño producido en este último caso era más persistente, por lo que el tiempo de cicatrización se alargaba más, pudiendo llevar el experimento a tiempos más allá del 5º día de evolución, con el consiguiente riesgo de producirse un daño adicional en la zona limbal.

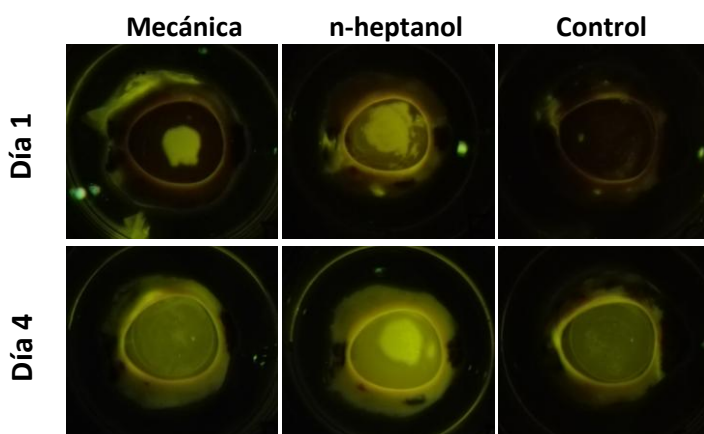


Figura 22. Imágenes representativas de la evolución del tamaño de la herida corneal mediante fluoresceína en las heridas realizadas de forma mecánica o mediante n-heptanol.

Seguimiento y evaluación de las heridas

Durante el periodo de seguimiento de las heridas se observa como transcurrido el tiempo total de estudio la herida producida mediante n-heptanol no llega a cerrarse completamente ($77,53 \pm 17,67 \%$), mientras que la herida producida de forma mecánica sí cierra al 100% (Figura 23). También se observa que los valores medidos de porcentaje de cierre son más variables en el caso de las heridas producidas mediante n-heptanol que de forma mecánica para todos los tiempos estudiados. Se aprecia que en ninguno de los casos durante estos tiempos de estudio se observa daño en los ojos control.

Estudio 3. Establecimiento del modelo de herida corneal

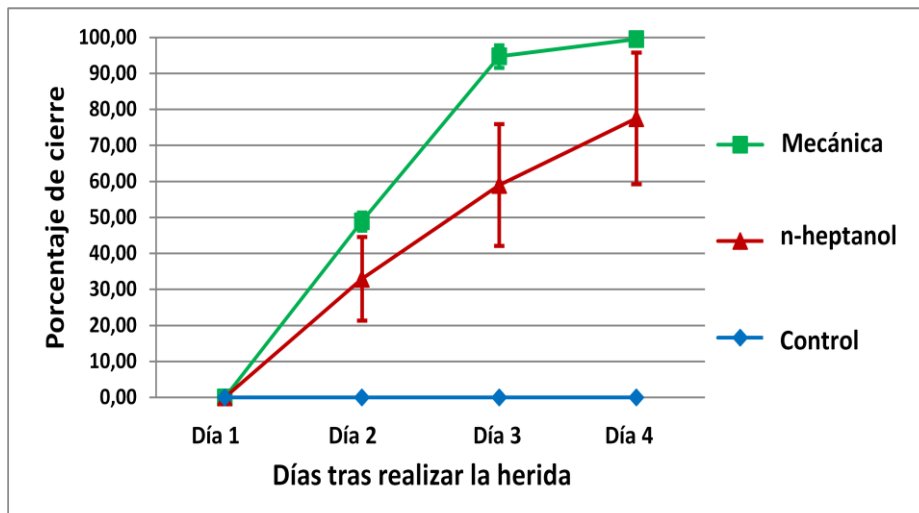


Figura 23. Evolución de la cicatrización corneal observada mediante fluoresceína según los dos tipos de herida realizadas a lo largo del tiempo de estudio.

Análisis histológico de las muestras

Se observó mediante la técnica de TUNEL que el proceso de cultivo de los anillos esclerocorneales no produce un daño a nivel celular, ni en el estroma ni en el epitelio corneales, ya que las células marcadas tras 3 días de cultivo corresponden con células escamosas de la capa más superficial del epitelio corneal que se eliminan de forma normal (Figura 24).

Control

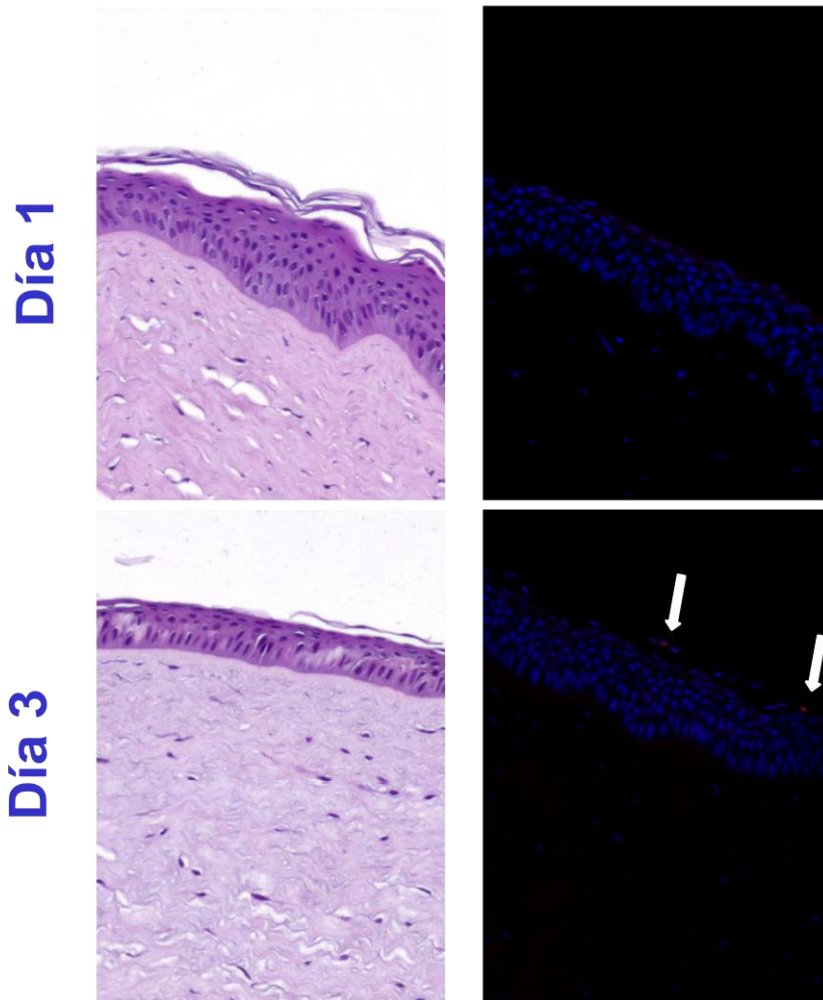


Figura 24. Análisis histológico (H/E y TUNEL) de los botones corneoesclerales utilizados como control tras 24 y 72 horas de cultivo respectivamente.

Al realizar la herida mediante n-heptanol se observa como tras 1 día de cultivo la práctica totalidad de las células que se encuentran en la zona de la herida están en estado apoptótico, viéndose marcadas mediante TUNEL tanto las células epiteliales como los queratocitos. Transcurridos 3 días tras la realización de la herida se puede apreciar como el epitelio crece sobre la

Estudio 3. Establecimiento del modelo de herida corneal

zona de la herida, mientras que en el estroma aún se aprecian queratocitos en estado apoptótico (Figura 25).

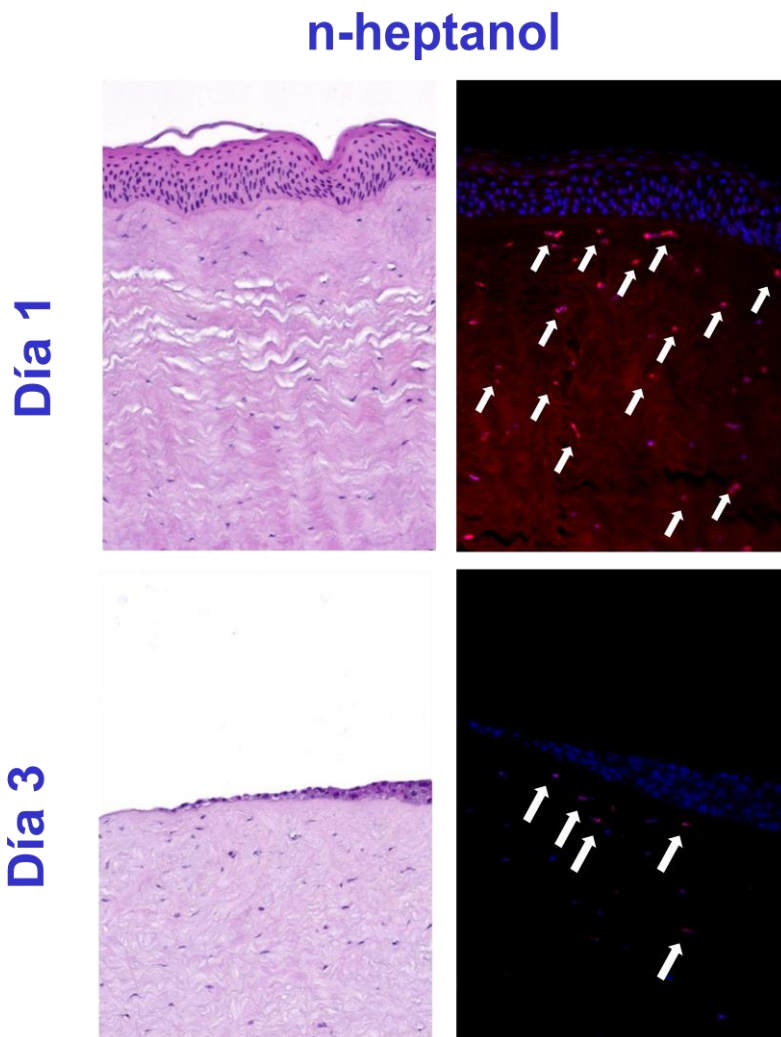


Figura 25. Análisis histológico (H/E y TUNEL) de las heridas corneales producidas mediante n-heptanol tras 24 y 72 horas de cultivo respectivamente.

Tras 1 día de cultivo desde la realización de la herida de forma mecánica se observa como las células epiteliales presentes no están dañadas; sin embargo, los queratocitos que se encuentran bajo el área de la herida están en estado apoptótico. Por su parte, se observa que transcurridos 3 días el

estado de las células en la zona de la herida se mantienen, con un epitelio sano y la práctica totalidad de los queratocitos en estado apoptótico (Figura 26).

Mecánica

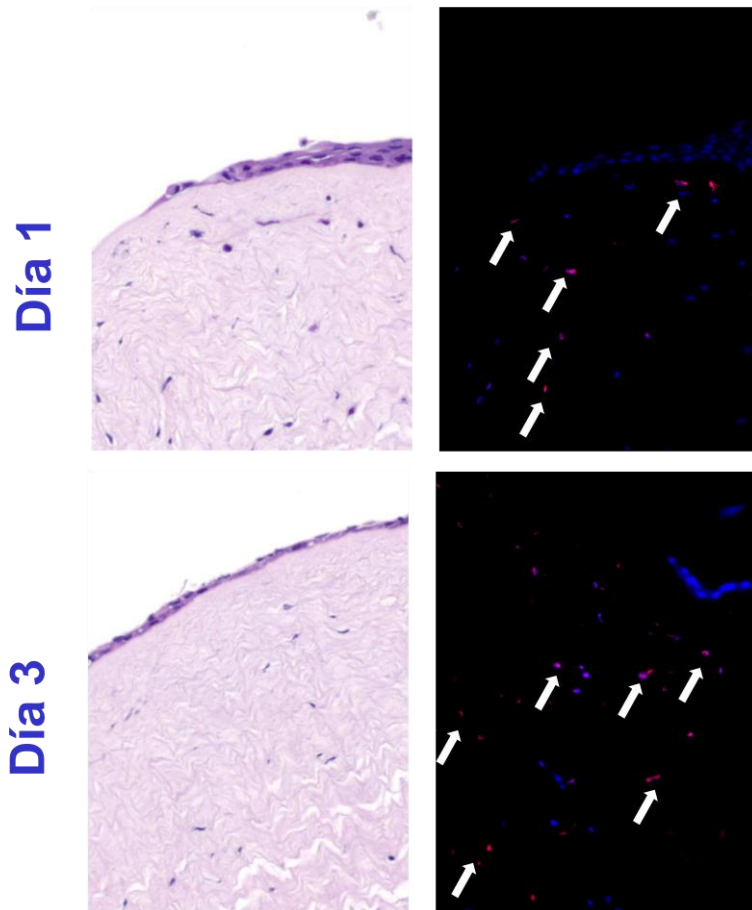


Figura 26. Análisis histológico (H/E y TUNEL) de la zona central de las heridas corneales producidas mediante desbridamiento mecánico tras 24 y 72 horas de cultivo, respectivamente.

DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio era desarrollar un modelo *ex vivo* de cicatrización corneal. Para ello, se partió de un modelo *ex vivo* de mantenimiento de la superficie ocular del cerdo descrito en la literatura (Deshpande et al., 2009). En dicho modelo se realizaba una herida tanto en el epitelio corneal como en el limbar con la intención de eliminar todas las células epiteliales que pudieran volver a recubrir el estroma corneal. En este estudio lo que se hizo fue circunscribir la lesión a una zona más limitada de la córnea central con la intención de poder evaluar la cicatrización epitelial.

En primer lugar, se evaluó el tiempo máximo de mantenimiento de los tejidos en cultivo sin realizar ningún daño sobre ellos. Se observó mediante la tinción con fluoresceína que tras las primeras 24 horas de cultivo se visualiza una zona central marcada, que tras el análisis histológico se descubría como una capa de células en descamación que no estaba completamente desprendida del resto del epitelio. Estas células en descamación no son removidas en cultivo debido a la ausencia del parpadeo y aparecen fuertemente teñidas con la fluoresceína.

Se compararon dos formas diferentes para realizar la herida sobre el epitelio corneal, una mediante un agente químico (n-heptanol) y otra mediante un desbridamiento mecánico del epitelio con el uso de un cuchillete tipo crescent. El objetivo era intentar asegurar el mayor grado de repetibilidad en la realización de la lesión. El uso del agente químico tiene dos ventajas: en primer lugar, el tiempo necesario para realizar la herida es mínimo. Además, mediante el uso de papel de filtro previamente cortado con un molde se asegura que la superficie de contacto con el agente es la misma en todos los ojos realizados. A pesar de estas ventajas, se pudo observar que las heridas producidas tenían forma irregular y se extendían más allá de la zona de tejido que había estado en contacto con el filtro, por lo que las lesiones no

eran homogéneas en tamaño. Con este método la cicatrización total de la lesión producida ocurría transcurridos 6 días.

En cuanto a la herida mecánica, con este método es necesario emplear un mayor tiempo y, además, a pesar de tener marcada el área que va a ser lesionada existe el riesgo de dañar parte del epitelio que se quiere mantener intacto, por lo que en este caso la habilidad y la práctica de la persona que realice la lesión va a ser muy importante. Una vez que se realizan las heridas de forma repetible el proceso de cicatrización en ese caso se completa en 3 días.

En conclusión, la mayor repetibilidad en el tamaño de la herida realizada de forma mecánica hace que este método fuera el seleccionado para establecer el modelo de cicatrización corneal *ex vivo*. Y las lesiones que aparecían en el tejido corneal a partir del sexto día en cultivo determinaron que el seguimiento de la evolución del cierre de la herida se estableciese en 5 días.

BIBLIOGRAFÍA

- Berkowski WM Jr, Gibson DJ, Craft SL, Whitley RD, Schultz GS, Plummer CE. Development and assessment of a novel *ex vivo* corneal culture technique involving an agarose-based dome scaffold for use as a model of *in vivo* corneal wound healing in dogs and rabbits. *Am J Vet Res.* 2020;81(1):47-57. doi:10.2460/ajvr.81.1.47
- Crooke A, Guzman-Arangué A, Mediero A, et al. Effect of melatonin and analogues on corneal wound healing: involvement of Mt2 melatonin receptor. *Curr Eye Res.* 2015;40(1):56-65. doi:10.3109/02713683.2014.914540
- Deshpande P, Notara M, Bullett N, Daniels JT, Haddow DB, MacNeil S. Development of a surface-modified contact lens for the transfer of

Estudio 3. Establecimiento del modelo de herida corneal

cultured limbal epithelial cells to the cornea for ocular surface diseases. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(10):2889-2902. doi:10.1089/ten.tea.2008.0528

- Ding J, Wirostko B, Sullivan DA. Human growth hormone promotes corneal epithelial cell migration in vitro. *Cornea*. 2015;34(6):686-692. doi:10.1097/ICO.0000000000000418
- Djalilian AR, Namavari A, Ito A, et al. Down-regulation of Notch signaling during corneal epithelial proliferation. *Mol Vis*. 2008;14:1041-1049. Published 2008 Jun 5.
- Flueckiger F, Kodjikian L, Halberstadt M, Boehnke M, Garweg JG. An ex-vivo, whole-globe porcine model of corneal epithelial wound healing tested using immunomodulatory drugs. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2005;21(5):367-375. doi:10.1089/jop.2005.21.367
- Jabbehdari S, Yazdanpanah G, Chen E, et al. Dose-dependent therapeutic effects of topical 1,25 OH-vitamin D3 on corneal wound healing. *Mol Biol Rep*. 2021;48(5):4083-4091. doi:10.1007/s11033-021-06418-6
- Marlo TL, Giuliano EA, Sharma A, Mohan RR. Development of a novel ex vivo equine corneal model. *Vet Ophthalmol*. 2017;20(4):288-293. doi:10.1111/vop.12415
- Matysik-Woźniak A, Turski WA, Turska M, et al. Kynurenic Acid Accelerates Healing of Corneal Epithelium In Vitro and In Vivo. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14(8):753. Published 2021 Jul 30. doi:10.3390/ph14080753
- Schumann S, Dietrich E, Kruse C, Grisanti S, Ranjbar M. Establishment of a Robust and Simple Corneal Organ Culture Model to Monitor

Estudio 3. Establecimiento del modelo de herida corneal

Wound Healing. *J Clin Med.* 2021;10(16):3486. Published 2021 Aug 6.
doi:10.3390/jcm10163486

- Wehrman RF, Genschel U, Charli A, Kanthasamy AG, Allbaugh RA, Ben-Shlomo G. Interleukin-6 and lactate dehydrogenase expression in a novel ex vivo rocking model of equine corneal epithelial wound healing. *Vet Ophthalmol.* 2021;24(5):509-519. doi:10.1111/vop.12935.

ESTUDIO 4. EVALUACIÓN DE LA CICATRIZACIÓN CORNEAL TRAS LA EXPOSICIÓN A DIFERENTES SUSTANCIAS MODULADORAS

RESUMEN

Con el modelo de cicatrización corneal *ex vivo* desarrollado a lo largo del Estudio 3, se procedió a evaluar la acción de diferentes moléculas que previamente han demostrado su implicación en la cicatrización epitelial.

Las moléculas utilizadas, aparte del EGF, están relacionadas con la TSP-1, una proteína de la matriz extracelular que actúa con una gran variedad de ligandos. Se realizó un seguimiento de la cicatrización corneal a lo largo de 4 días mediante el uso de una disolución de fluoresceína sódica.

Se observó que ni el EGF ni la TSP-1 aceleraban el ritmo de cierre de la herida comparado con el del control (PBS). Por otro lado, el TGF- β 2 produjo una ralentización en la tasa de cicatrización y el anticuerpo anti-TSP-1 hizo que el tamaño de la herida aumentara durante todos los días de evolución.

En definitiva, el modelo *ex vivo* respondió al efecto de las diferentes moléculas estudiadas, por lo que se puede considerar funcional. Ninguna de las moléculas utilizadas logró mejorar el ritmo de cicatrización observada en el control, alguna incluso lo empeoró. Estos resultados justifican una futura optimización del modelo y estudios adicionales morfológicos y moleculares que permitan mejorar el su desempeño.

INTRODUCCIÓN

El epitelio de la córnea, como otras barreras epiteliales en el cuerpo humano, está sujeto continuamente a agresiones físicas, químicas y biológicas, lo que a menudo da como resultado que se produzca una lesión, con la consiguiente pérdida de su función de barrera. La reparación adecuada de las heridas de la córnea es vital para mantener una córnea transparente y para preservar la visión. El epitelio corneal responde rápidamente a las lesiones, migrando en primera instancia las células epiteliales de los bordes de la herida como una lámina para cubrir el defecto y restablecer su función de barrera (Lu et al., 2001). Para conseguir una cicatrización exitosa es necesario que se den una serie de complejos procesos biológicos que incluyen la migración celular, la proliferación celular, la reestratificación, así como la deposición de matriz y la remodelación de tejidos (Agrawal et al., 2003). Particularmente críticas son las etapas de migración y de proliferación celular, que son impulsadas por factores de crecimiento liberados coordinadamente en la zona de la herida. En la córnea lesionada, el epitelio juega un papel principal, no solo como tipo celular clave en la reparación de la córnea, sino también como fuente de varios factores de crecimiento. Al igual que en otros tejidos, se han sugerido una gran variedad de factores de crecimiento que desempeñan un papel en la regulación de la función epitelial de la córnea y la cicatrización de sus heridas (Yu et al., 2010).

Una de las últimas moléculas que ha demostrado tener una función reguladora en la cicatrización del epitelio corneal ha sido la trombospondina 1 (TSP-1) (Uno et al., 2004). Las trombospondinas son una familia de proteínas de la matriz extracelular que consta de cinco miembros (TSP-1 a TSP-5) que interactúan con una variedad de moléculas, entre ellas receptores de la superficie celular, factores de crecimiento, citocinas y proteasas, para

Estudio 4. Evaluación funcional del modelo *ex vivo* porcino

influir en numerosos fenómenos *in vivo*, incluida la cicatrización de heridas, la angiogénesis y la regulación de la inflamación (Adams et al., 2011).

La TSP-1 es una glicoproteína de 450 kDa que se identificó por primera vez en las plaquetas, que la liberaban después del tratamiento con trombina (Lawler et al., 1978). La TSP-1 se expresa en múltiples tejidos que incluyen, a nivel ocular, la córnea, el cristalino o el epitelio pigmentario de la retina (Adams et al., 2011). Nuestro grupo ha estudiado la presencia de esta molécula y sus receptores en la superficie ocular y su influencia como moduladora de los procesos de inflamación y apoptosis, tanto *in vitro* como *in vivo* (Soriano-Romaní et al., 2015; Soriano-Romaní et al., 2019). Se sabe también que TSP-1 favorece la cicatrización corneal tras producirse una lesión (Uno et al., 2004; Foulsham et al., 2019; Lai et al., 2021).

Por todo lo anterior, se diseñó un estudio que permitiera probar la funcionalidad del modelo porcino *ex vivo* de cicatrización corneal utilizando moléculas como la TSP-1, entre otras. El objetivo fue, por lo tanto, comprobar la utilidad del modelo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención y preparación de los ojos de cerdo

Se utilizaron 33 globos oculares de origen porcino para evaluar el efecto que 4 moléculas diferentes producían en la cicatrización corneal en el modelo *ex vivo* puesto a punto en el Estudio 3 de esta memoria. Para ello los ojos se recogieron en un matadero local (Justino Gutierrez S.L) en Medio de Transporte (DMEM/F12 estéril, 10% de Anti-Anti y 0,25 µg/ml de anfotericina B). Una vez en el laboratorio, se retiró el material adyacente a los ojos mediante el uso de fórceps y tijeras, y se pasaron por 2 lavados de

Estudio 4. Evaluación funcional del modelo *ex vivo* porcino

povidona yodada durante 2 minutos, tras los cuales los ojos se lavaron 2 veces en PBS suplementado con un 1% de Anti-Anti.

Seguidamente, se procedió a realizar una herida mecánica mediante un cuchillete tipo crescent desbridando el epitelio de la córnea central manualmente sin dañar el estroma subyacente bajo campana de flujo laminar. Primero se delimitaba la zona a lesionar mediante el uso de un trépano para posteriormente eliminar el epitelio. Para evaluar si las diferentes moléculas a estudiar podían causar alguna lesión sobre el epitelio corneal, se aislaron polos anteriores sin realizarles herida.

Una vez realizadas las heridas se aislaron las superficies oculares anteriores. Se utilizó una aguja de 21G para hacer un primer agujero en la esclera, a unos 5 mm del limbo esclerocorneal, seguidamente con la ayuda de unos fórceps y unas tijeras se procedía a cortar la esclera intentando mantener unos 4 mm con el limbo para de esa forma aislar el polo anterior del ojo. Una vez separado el polo anterior se utilizaban una pareja de fórceps para retirar el iris y cuerpo ciliar que quedaban adheridos a la zona perilimbar. Se colocaron las superficies oculares con la cara interna hacia arriba sobre un tapón de tubo de centrífuga de 15 ml relleno de PBS para de esta forma rellenar su cámara anterior con una solución de agar-agar al 4% en medio de cultivo DMEM-F12 dejándolas en esa posición hasta que se producía la gelificación de la solución lo que permitía mantener la curvatura normal de la superficie ocular. Posteriormente, se colocaron las superficies oculares en placas de cultivo de 6 pocillos con su cara externa hacia arriba (botones esclerocorneales) y se añadió medio de cultivo en cada uno de los pocillos hasta que este alcanzara el limbo. El mantenimiento de los botones se llevó a cabo en un incubador a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad.

Evaluación de la evolución de la herida corneal mediante el uso de fluoresceína

Se siguió la evolución de la cicatrización de las heridas durante 4 días, realizándose evaluaciones cada 24 horas mediante el uso de una solución de fluoresceína sódica al 2% (p/v) en PBS. Las evaluaciones se realizaron mediante la utilización de unos anillos cónicos de silicona, que se situaban sobre la córnea, permitiendo así el mantener la solución de fluoresceína sobre la zona lesionada durante un tiempo de 30 segundos. Posteriormente, se lavaban los botones esclerocorneales con PBS y se tomaban 3 imágenes mediante el uso de un filtro amarillo y una lámpara de luz azul cobalto (Conóptica, Barcelona, España). El tamaño de las heridas se midió en las imágenes en relación con el tamaño total de la córnea de cada ojo utilizándose el programa de procesado de imagen ImageJ (www.imagej.edu). Los resultados se expresan como el porcentaje del área de la herida recuperado a cada uno de los tiempos medidos respecto del área corneal lesionada y comparados con dicho ratio tras la medición inicial (área recuperada de la herida a tiempo Día 1 = 0%).

Ensayo funcional

Se expusieron los ojos, tanto intactos como con herida corneal, a 4 moléculas para evaluar su posible toxicidad sobre el epitelio corneal, así como su acción sobre la cicatrización corneal y, de esta forma, comprobar la funcionalidad del modelo para el estudio de los procesos de regeneración de la córnea. Las 4 moléculas estudiadas, cuyas características se recogen en la Tabla 2 serían TSP-1, un anticuerpo específico frente a la TSP-1 y TGF- β 2, además de EGF, cuyo efecto acelerador de la regeneración epitelial es ampliamente conocido (Barrientos et al., 2008). Para exponer las heridas realizadas a las moléculas en estudio, inmediatamente después de colocar los polos anteriores aislados en las placas de cultivo se colocó un anillo cónico de silicona sobre la

Estudio 4. Evaluación funcional del modelo *ex vivo* porcino

superficie redondeada de la córnea. A continuación, se administró en su interior cloruro de benzalkonio (control de toxicidad epitelial), PBS (control), EGF, TGF- β 2, TSP-1 o anti-TSP-1 a las concentración indicadas (Tabla 1). Se mantuvieron los tejidos *ex vivo* expuestos a las diferentes moléculas durante 24 horas en el incubador y al cabo de ese tiempo se retiraron y se lavó la zona de la herida con PBS. Se evaluó en primer lugar si los ojos intactos que se habían expuesto a las diferentes moléculas en estudio presentaban alguna lesión tras las 24 horas de exposición relacionada con una posible toxicidad de alguna de las moléculas. Posteriormente, se realizaron las mediciones del tamaño de la herida en aquellos botones corneoesclerales que habían sido lesionados inmediatamente después de la exposición a las moléculas (tiempo 0) y transcurridos 1, 2 y 3 días.

Tabla 2. Moléculas cuyo efecto sobre la cicatrización corneal se evaluó en el modelo *ex vivo* porcino.

Nombre de la molécula	Función	Referencia	Concentración
EGF	Estimulante del crecimiento epitelial	Invitrogen, Eugene, OR, EE.UU.	10 μ g/ml
TSP-1	Factor antiangiogénico y antiinflamatorio	R&D Systems. Inc. Mineapolis, MN, EE.UU.	110 μ g/ml
Anti-TSP-1	Anticuerpo específico que bloquea la acción de TSP-1	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.	110 μ g/ml
TGF-β2	Modulador de la proliferación y diferenciación de células presentadoras de antígeno	Sigma Aldrich, San Luis, MO, EE.UU.	5 μ g/ml

EGF: factor de crecimiento epitelial; TSP-1: trombospondina 1; TGF- β 2: factor de crecimiento transformante beta 2.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA y una prueba de comparación múltiple de Dunnett considerando los valores de las muestras expuestas a PBS y a EGF como controles. Todos los datos se expresan como media \pm error estándar de la media de 3 experimentos independientes (n = 3).

RESULTADOS

Evaluación de la toxicidad de las moléculas utilizadas

Para evaluar la toxicidad tras 24 horas de exposición a cada una de las moléculas en estudio se utilizó como control positivo de toxicidad cloruro de benzalconio. Transcurrido el tiempo de evaluación ninguno de los ojos expuestos a las moléculas en estudio presentaba lesión observable mediante la tinción con fluoresceína, salvo el control positivo, en el que se observaba daño en toda el área corneal expuesta.

Cambios en el área de la herida tras la exposición a diferentes moléculas moduladoras

Se observó que ninguna de las moléculas estudiadas aceleraba la tasa de cicatrización del epitelio corneal *ex vivo* (Figura 26). Las heridas expuestas a PBS, EGF y TSP-1 mostraron un ritmo de cicatrización casi idéntico: en el día 1 los porcentajes de cierre de la herida fueron $61,6 \pm 10,2$; $57,3 \pm 18,8$; y $64,2 \pm 15,2$, respectivamente. En el día 2 los porcentajes de cierre de la herida fueron $94,6 \pm 2,3$; $92,4 \pm 4,6$; y $94,5 \pm 3,2$. Finalmente, en la evaluación del día 3 el cierre epitelial en los tres casos fue del 100%.

Por otro lado, se observó que el TGF- β 2 produjo una cicatrización alterada (Figura 27). Al segundo día de evolución el porcentaje de cicatrización de la

Estudio 4. Evaluación funcional del modelo *ex vivo* porcino

herida llega al $40,7 \pm 18,6\%$, mientras que al tercer día el tamaño de la herida vuelve a aumentar de manera que este es significativamente mayor ($23,6 \pm 22,3\%$) con respecto al de la herida control y al de la herida expuesta a EGF.

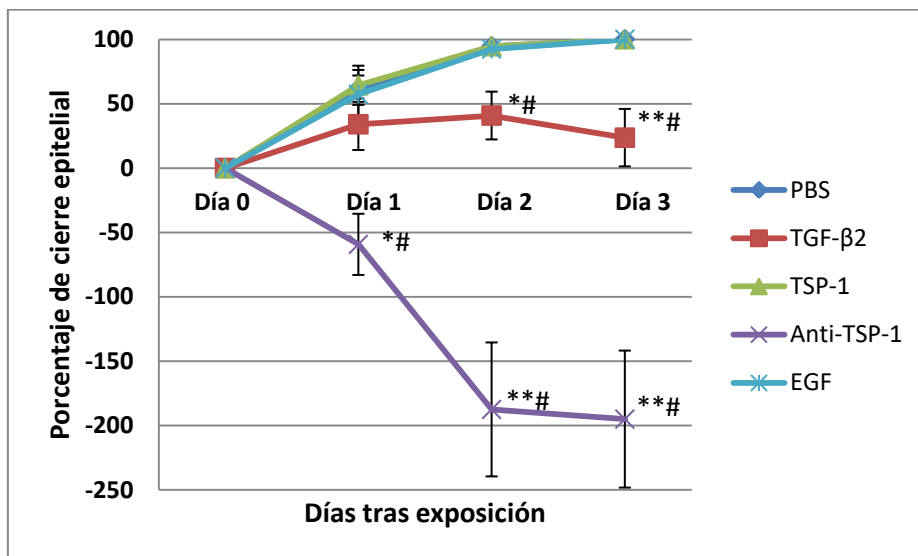


Figura 27. Evolución de la cicatrización corneal observada mediante fluoresceína tras la exposición de las heridas realizadas mecánicamente a PBS (Control), TGF-β, TSP-1, Anti-TSP-1 y EGF. $p \leq 0,05$ respecto PBS *; respecto EGF #. $p \leq 0,01$ respecto PBS **

Finalmente, se observó que la exposición al anticuerpo anti-TSP-1 producía un aumento significativo del tamaño de la herida desde el primer día de evolución, incrementándose en un $59,3 \pm 23,8\%$ transcurrido el primer día y llegando hasta casi triplicar su tamaño inicial en las evaluaciones de los días 2 y 3.

DISCUSIÓN

La funcionalidad del modelo de cicatrización de heridas corneales *ex vivo* porcino descrito en el estudio 3 de esta tesis se ha estudiado utilizando

Estudio 4. Evaluación funcional del modelo *ex vivo* porcino

diversas moléculas (EGF, TGF- β 2, TSP-1 o Anti-TSP-1) de conocido efecto sobre los procesos de reparación y regeneración corneal, y se han observado comportamientos diferentes.

En primer lugar, se probó la biocompatibilidad de estas moléculas disueltas en PBS con el tejido corneal intacto en ojos que no sufrieron ningún tipo de lesión. Se observó que no se producía ninguna alteración en el tejido tras un contacto de 24 horas, lo que indicaba que las soluciones eran perfectamente seguras para probar su efecto sobre el modelo *ex vivo* de herida corneal y que los cambios en el porcentaje de cierre de la herida que se pudieran producir serían inducidos por las moléculas en estudio y no por ausencia de tolerancia.

Todas las heridas expuestas a PBS, EGF o TSP-1 estaban cerradas al tercer día de observación. Al contrario que en otros estudios publicados realizados con modelos *in vitro* (Uno et al., 2004) o *in vivo* (Lai et al., 2021) los resultados obtenidos en este trabajo no muestran una mejora en el porcentaje de cierre de la herida tras exposición a TSP-1 comparado con el control expuesto a PBS. Tampoco se observó en el caso de la herida expuesta a EGF. Una posible explicación sería que las concentraciones de estos factores empleadas no hayan sido las óptimas para mejorar la reepitelización o que el tiempo de exposición no haya sido el adecuado. Sin embargo, lo que sí se pudo observar es que el anticuerpo anti-TSP-1 no solo inhibe la reepitelización de la herida, si no que incluso hace que el tamaño de la herida aumente. Esto coincide con lo publicado por Uno et al. (2004) que observaron un efecto similar. En cuanto al efecto del TGF- β 2 observado, está descrito un efecto inhibitorio sobre la proliferación de las células epiteliales corneales *in vitro* (Mishima et al., 1992) así como un efecto bloqueante del aumento proliferativo producido por otros factores como el EGF *in vivo* (Honma et al., 1997). Mientras que, por otro lado, hay estudios que confirman un aumento

en la tasa de cicatrización epitelial *in vivo* (Er et al., 1998). Esta contrariedad de resultados podría deberse al doble efecto que produce el TGF- β 2 sobre el epitelio corneal, ya que al mismo tiempo que estimula la migración celular, inhibe su proliferación (Saika., 2004). Este efecto es el que se podría estar observando en el modelo, ya que en los dos primeros días de evolución de la herida esta va cerrando (fase migratoria) pero al estar inhibida la proliferación celular llega un momento en el que no pueden seguir con el proceso normal de cicatrización.

En conclusión, el modelo porcino *ex vivo* de herida corneal ha demostrado ser funcional en las condiciones estudiadas. No obstante, el efecto positivo sobre el ritmo de cierre de la herida corneal que se esperaba de conocidas moléculas estimulantes de la reepitelización no se ha podido observar. Esto justificaría la realización de estudios adicionales, no solo morfológicos sino también moleculares, para optimizar el modelo y profundizar en el estudio de la cicatrización corneal. Por otro lado, una vez superadas las pruebas *ex vivo*, se podría valorar la utilización de un modelo animal bien caracterizado histológicamente a nivel ocular, como es el minipig de Göttingen (Shrader et al., 2019), para comparar el efecto real que puedan tener moléculas con potencial terapéutico sobre la cicatrización corneal en el ojo de cerdo *ex vivo* e *in vivo* y determinar la fiabilidad del modelo *ex vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams JC, Lawler J. The thrombospondins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Oct 1;3(10):a009712. doi: 10.1101/cshperspect.a009712.
- Agrawal VB, Tsai RJ. Corneal epithelial wound healing. *Indian J Ophthalmol.* 2003;51(1):5-15

Estudio 4. Evaluación funcional del modelo *ex vivo* porcino

- Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008 Sep-Oct;16(5):585-601. doi: 10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x.
- Er H, Uzmez E. Effects of transforming growth factor-beta 2, interleukin 6 and fibronectin on corneal epithelial wound healing. *Eur J Ophthalmol.* 1998 Oct-Dec;8(4):224-9.
- Foulsham W, Dohlman TH, Mittal SK, Taketani Y, Singh RB, Masli S, Dana R. Thrombospondin-1 in ocular surface health and disease. *Ocul Surf.* 2019 Jul;17(3):374-383. doi: 10.1016/j.jtos.2019.06.001.
- Honma Y, Nishida K, Sotozono C, Kinoshita S. Effect of transforming growth factor-beta1 and -beta2 on in vitro rabbit corneal epithelial cell proliferation promoted by epidermal growth factor, keratinocyte growth factor, or hepatocyte growth factor. *Exp Eye Res.* 1997 Sep;65(3):391-6. doi: 10.1006/exer.1997.0338.
- Lai YH, Lee PY, Lu CY, Liu YR, Wang SC, Liu CC, Chang YC, Chen YH, Su CC, Li CY, Liu PL. Thrombospondin 1-induced exosomal proteins attenuate hypoxia-induced paraptosis in corneal epithelial cells and promote wound healing. *FASEB J.* 2021 Jan;35(1):e21200. doi: 10.1096/fj.202001106RRR.
- Lawler JW, Slayter HS, Coligan JE. Isolation and characterization of a high molecular weight glycoprotein from human blood platelets. *J Biol Chem* 1978;253:8609–16.
- Lu L, Reinach PS, Kao WW. Corneal epithelial wound healing. *Exp Biol Med.* 2001 Jul;226(7):653-64. doi: 10.1177/153537020222600711
- Mishima H, Nakamura M, Murakami J, Nishida T, Otori T. Transforming growth factor-beta modulates effects of epidermal growth factor on

Estudio 4. Evaluación funcional del modelo *ex vivo* porcino

corneal epithelial cells. *Curr Eye Res.* 1992 Jul;11(7):691-6. doi: 10.3109/02713689209000742.

- Saika S. TGF-beta signal transduction in corneal wound healing as a therapeutic target. *Cornea.* 2004 Nov;23(8 Suppl):S25-30. doi: 10.1097/01.ico.0000136668.41000.73.
- Soriano-Romaní L, Contreras-Ruiz L, López-García A, Diebold Y, Masli S. Topical Application of TGF- β -Activating Peptide, KRFK, Prevents Inflammatory Manifestations in the TSP-1-Deficient Mouse Model of Chronic Ocular Inflammation. *Int J Mol Sci.* 2018 Dec 20;20(1):9. doi:10.3390/ijms20010009.
- Soriano-Romaní L, García-Posadas L, López-García A, Paraoan L, Diebold Y. Thrombospondin-1 induces differential response in human corneal and conjunctival epithelial cells lines under in vitro inflammatory and apoptotic conditions. *Exp Eye Res.* 2015 May;134:1-14. doi:10.1016/j.exer.2015.03.004.
- Uno K, Hayashi H, Kuroki M, Uchida H, Yamauchi Y, Kuroki M, Oshima K. Thrombospondin-1 accelerates wound healing of corneal epithelia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Mar 19;315(4):928-34. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.01.146.
- Yu FS, Yin J, Xu K, Huang J. Growth factors and corneal epithelial wound healing. *Brain Res Bull.* 2010 Feb 15;81(2-3):229-35. doi:10.1016/j.brainresbull.2009.08.024.

Capítulo 3 / *Chapter 3*

Evaluación del efecto de
la melatonina en la
cicatrización corneal /
*Evaluation of melatonin
effect on corneal wound
healing*

***STUDY 5. EVALUATION OF MELATONIN EFFECT
ON CORNEAL WOUND HEALING***



Study 5 was carried out under the supervision of **Dr. Jelena Filipović-Grčić** during a three-month stay in the Department of Pharmaceutical Technology of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry at the **University of Zagreb (Croatia)**

ABSTRACT

Melatonin has previously demonstrated its capacity to enhance corneal wound healing in *in vivo* experiments. In this study, we aimed at evaluating the potential of different melatonin formulations to accelerate corneal wound healing using an *ex vivo* corneal wound healing model.

Porcine eyeballs were used to isolate corneo-scleral buttons which were wounded using a surgical knife. The effect of lecithin and lecithin+chitosan NPs either blank or loaded with melatonin on the corneal wound closure process was evaluated. Previously, droplet size, polydispersity index, zeta-potential, and encapsulation efficiency of NP formulations was measured.

None of the NPs formulated were capable to increase the corneal wound healing rate consistently, with the only exception of lecithin NPs, that showed a significant increase in the wound closure percentage in some of the conditions tested. This opens the avenue to further study the potential of melatonin-loaded lecithin NPs for corneal wound healing.

INTRODUCTION

Melatonin is an indolamine produced primarily by the pineal gland and is involved in a wide variety of cellular processes. Its production varies with changes in the ambient lighting and the sleeping habits of each person, their plasma levels begin to increase 2 hours before the usual sleeping time and reaches their maximum level between 3 to 4 AM, from this point it begins to gradually decrease until reaching its minimum plasma level around 12 PM (Khullar, 2012; Waller et al., 2016). There are several ocular cell types that synthesize melatonin, including photoreceptors in the retina and epithelial cells of the ciliary body.

The main routes of drug application to the anterior ocular pole are topical and subconjunctival. The most widespread of both is the topical route in the form of eye drops because it is not invasive and is easy to apply. The subconjunctival route, on the other hand must be performed by qualified personnel and can be uncomfortable for the patient.

However, the topical route of application has certain limitations due to ocular anatomy and physiology. One of the main functions of OS is to prevent the entry of external agents into the eye, to do so there is the corneal barrier, which also limits the entry of drugs (Urtti, 2006). The strong adherence of the intercellular junctions of the corneal epithelium (tight junctions, gap junctions and desmosomes) prevents the passage of substances of more than 500 Da, for which a maximum of 5% of an instilled drug is achieved to exceed this barrier and reach the target cells. It should also be borne in mind that by instilling an eye drop into the eye, it can not only pass through the corneal epithelium into the eye, but will also come into contact with the conjunctival epithelium, a looser and permeable epithelium that allows the substances administered to go through it easily, reaching the systemic blood circulation (Urtti, 2006). Due to these

Study 5. Melatonin effect on ex vivo corneal wound healing

circumstances, the amount of drug available locally is reduced and possible systemic side effects may occur. On the other hand, the particular composition of the tear makes it an aggressive medium against any foreign agent, including drugs (Novack et al., 2016). Lastly, the dynamics of tear renewal and its elimination through the tear drainage system will limit the residence time of a drug in the OS and, consequently, its access to the target tissues.

Multiple technological strategies have been developed to improve drug distribution conditions, especially to overcome existing barriers to ocular topical administration. Among these strategies, the technology developed to efficiently transport and release the active substances on the desired area stands out. The important advantages of these strategies would be related to the reduction in the amount of active substance necessary to achieve its therapeutic effect, its protection and stabilization for administration, and the reduction of the possible side effects that the active substance could have at the systemic level.

NPs are capable of encapsulating active substances while allowing a sustained release over time (Swathi et al., 2010). Compared to other pharmacological strategies, NPs have a higher loading capacity, greater long-term stability, as well as the possibility of lyophilizing, sterilizing them and being mass-manufactured (Liu et al., 2010; Chime et al., 2013) .

MATERIAL AND METHODS

Preparation of melatonin-loaded NPs formulations

NPs were formulated using chitosan 113 (Protasan®UP CL 113, deacetylation degree 86%, Novamatrix, Norway) as hydrochloride salt, Lipoid S45 (soybean

Study 5. Melatonin effect on ex vivo corneal wound healing

lecithin without fat and with 45% of phosphatidyl choline (Lipoid GmbH, Germany)) and melatonin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Lecithin/chitosan NPs were formulated as follows. S45 lecithin was dissolved in 96% ethanol at a 2.5% concentration (w/v). Melatonin was dissolved in the ethylic lecithin solution at a 0.5% concentration (w/v). Chitosan was dissolved in distilled water at 1% concentration (w/v). Melatonin-loaded NPs were obtained by the injection of 4 ml of the lecithin/melatonin ethylic dilution (using a 0.75 mm diameter syringe) in 46 ml of the chitosan solution while it was magnetically steered at 900 rpm. Control NPs without chitosan were made by injecting the lecithin/melatonin ethylic solution in distilled water. Blank NPs without melatonin were also prepared following the same procedure described above.

Physicochemical characterization of melatonin-loaded NPs

Droplet size, polydispersity index (PDI) and zeta-potential of NPs were measured in triplicates by photon correlation spectroscopy (PCS) using a Zetasizer Ultra (Malvern Instruments, Malvern, United Kingdom) at 25 °C. For that purpose, NP samples were diluted 500 (droplet size and PDI) and 100 (zeta-potential) times (V/V) with 0.45 µm filtered double distilled water and 10 mM NaCl solution, respectively. The detection angle used for droplet size and PDI measurement was 90°. A disposable folded capillary cell (DTS1070) was used for zeta-potential measurement.

Encapsulation efficiency

Encapsulation efficiency (EE%) was measured to determine the amount of free melatonin using the dialysis technique. To measure the nonencapsulated melatonin an appropriate volume (4 ml) of the melatonin-loaded NPs suspension was put into acetate cellulose dialysis bags (Spectra/PorR membranes, cutting molecular weight 12–14000), which were completely submerged in 100 ml of distilled water and magnetically steered

Study 5. Melatonin effect on ex vivo corneal wound healing

at 30 rpm. Experiments were conducted double checking that the whole dialysis bags were completely submerged in the water (melatonin solubility in water is 0.1 mg/ml). 2 ml Samples were obtained at the scheduled times from the receptor solution and replaced with fresh distilled water. Free melatonin from the samples was measured using a spectrophotometer (UV-6300PC, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA). The experiments finished when constant values of melatonin concentration were obtained in two consecutive samples of the receptor solution, considering the progressive dilution of the medium. Afterwards, EE% was calculated following the following equation:

$$EE\% = \frac{[\text{total melatonin}] - [\text{difused melatonin}]}{[\text{total melatonin}]} \times 100$$

Drug loaded (DL) into the NPs was calculated using the follow equation:

$$DL\% = \frac{[\text{total melatonin}] - [\text{difused melatonin}]}{\text{NPs quantity examined}} \times 100$$

NPs formulations after the dialysis process (without free melatonin) were used in the next experiments.

Preparation of the ex vivo corneal wound healing model

Freshly excised porcine eyeballs were obtained from white pigs (*Sus scrofa domestica*, age 6–7 months, weight 90–115 kg, both female and male animals) from a local slaughterhouse (Klaonica 32 d.o.o.). Enucleated eyeballs were rinsed with an isotonic saline solution (NaCl 0.9%; B. Braun, Melsungen, Germany) and transported in cold Krebs-Ringer Bicarbonate Buffer in a container held on ice. After transportation to the laboratory, eyeballs were submerged in 1% Betadine® solution (Alkaloid, Skopje, North Macedonia) for 2 min for microbial decontamination and subsequently washed with phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 (Sigma-Aldrich) containing 1% (V/V) penicillin/streptomycin/amphotericin B mixture (Lonza, Basel, Switzerland). Transportation of porcine eyeballs to the laboratory and

Study 5. Melatonin effect on ex vivo corneal wound healing

the excision of corneo-scleral buttons were performed within 2 h of animal death.

To perform the mechanical wound, a crescent-type knife was used to debride manually the epithelium from the central cornea without damaging the underlying stroma. First, the area to be injured was delimited by using a trephine to subsequently remove the epithelium gently.

The corneas were excised as corneo-scleral buttons inside a laminar flow hood (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), a needle was introduced in the sclera at 5 mm from the corneo-scleral limbus, forceps and a pair of scissors were used to isolate the front pole of the eye. Following, two forceps were used to discard the iris and the lens, the remaining tissue was placed with the epithelial side down on 15 mL conical centrifuge tube caps in order to facilitate the formation of a naturally curved shape of the corneas. Afterwards, 1 mL of 4% (w/V) agar (Muller Hinton II Agar, BBL™, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) in DMEM/F-12 cell culture medium (Gibco®, Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA) supplements, previously autoclaved (121 °C, 20 min) and if necessary reheated in a microwave to a liquid state, was pipetted on endothelial side of each corneo-scleral button. After cooling and subsequent gelling of the agar solution the corneo-scleral buttons were placed on a 6-well plate (endothelial side down) and 3.5 mL of DMEM/F-12 (Gibco®, Life Technologies™), supplemented with 10% (V/V) FBS (Biosera, Boussens, France) and 10% (V/V) penicillin/streptomycin/amphotericin B mixture was added to each well, so that the corneas were exposed to the air. The corneo-scleral buttons were left overnight in the incubator (humidified atmosphere, 5% CO₂, 37 °C) and exposure to the NP formulations was done the following day.

Study 5. Melatonin effect on ex vivo corneal wound healing

Evaluation of the effect of melatonin formulations on ex vivo corneal wound healing

The effect of NP formulations on *ex vivo* corneal wound healing was assessed at different time points. Prior to formulation or PBS (negative control) exposure, the medium in each well was aspirated, and custom-made silicone rings were placed onto the corneas. 200 μ L of each formulation was added inside each ring and the corneas were incubated at 37 °C for 5, 30 or 240 min. After each time-point the samples were removed, the corneas washed with PBS and the extent of any corneal damage visually evaluated using fluorescein solution (2 mg/ml) in PBS and a cobalt-blue lamp (Conoptica, Barcelona, Spain). Briefly, the silicone rings were placed on the corneas again and 200 μ L of the fluorescein solution was put inside and left for 30 seconds. Afterwards, the fluorescein solution was removed, the corneas washed with PBS and photographs taken through a yellow filter of the cobalt-blue lamp. All formulations were tested in triplicate.

Corneal wound size assessment

The evolution of wound closure was followed over a 4-day period, measuring its size every 24 hours using a 2% (w/v) sodium fluorescein solution in PBS. Assesments were carried out by using conical silicone rings, which were placed on the cornea, thus allowing the fluorescein solution to be kept on the injured area for a period of 30 seconds. Subsequently, the sclerocorneal buttons were washed with PBS and 3 images were taken using a yellow filter and a cobalt blue light lamp (Conóptica, Barcelona, Spain).

Wound size was measured in the images in relation to the total size of the cornea of each eye using the ImageJ image processing program (www.imagej.edu). The results are expressed as the percentage of the wounded area with respect to the total corneal area and compared with wounded area at time 0 (24 hours after wounding = 0%).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using a Student's *t*-test for independent samples comparing each formulation with control, with *P* < 0.05 set as the minimal level of significance.

RESULTS AND DISCUSSION

Physicochemical characterization of NPs

Table 3 summarizes the main NP characteristics, which were consistent with those reported by our group in previous studies (Hafner et al., 2009; Hafner et al., 2011). Lecithin/chitosan NPs were significantly larger ($p < 0.001$) than lecithin NPs. The zeta-potential was inverted from negative values for lecithin NPs to positive values for lecithin/chitosan NPs. Lecithin S45 has high content of lipids that contribute to its negative charge giving rise to its interaction with positively charged chitosan. The overall negative charge of Lipoid S45 lecithin and the formation of lecithin/chitosan NPs due to the electrostatic interaction between lecithin and chitosan have already been described in the literature (Sonvico et al., 2006; Gerelli et al., 2008).

Table 4. Characteristics of NP formulations.

Type of NP	Size (nm)	zeta potential (mV)	Polidispersity	% of encapsulation
NP-L	75,5 ± 2,6	-29,7 ± 1,0	0,471 ± 0,010	
NP-L Mel	90,5 ± 1,4	-43,9 ± 3,5	0,369 ± 0,023	20,88 ± 0,20
NP-L+C	269,3 ± 3,5	31,6 ± 1,2	0,370 ± 0,038	
NP-L+C Mel	264,5 ± 5,9	19,8 ± 0,4	0,316 ± 0,011	21,85 ± 0,24

NP-L: lecithin NPs; NP-L Mel: melatonin loaded lecithin NPs; NP-L+C: lecithin-chitosan NPs; NP-L+C Mel: melatonin loaded lecithin-chitosan NPs.

Study 5. Melatonin effect on ex vivo corneal wound healing

Most of the NP suspensions were characterized by a relatively high polydispersity, as shown by PDI values ranging from 0.316 to 0.471 (Table 4). The lowest polydispersity was observed in lecithin/chitosan NPs loaded with melatonin. This is probably due to a stronger interaction of chitosan with negatively charged lecithin. Similar polydispersity range of NPs based on chitosan, or its derivatives has already been reported in the literature (Amidi et al., 2006; Amidi et al., 2007; Hafner et al., 2011). This polydispersity range may be due to the fact that chitosan, as a natural polymer, usually appears as a mixture of polymer chains with wide range of molecular weights. More specifically, the molecular weight for the chitosan used in this study (PROTASAN UP CL 113) is in the 50,000–150,000 g/mol range. Nevertheless, there were no differences in the % of loaded melatonin between lecithin and lecithin/chitosan NPs.

Effect of developed NPs on ex vivo corneal wound healing

The melatonin effect on corneal wound healing was studied using the porcine *ex vivo* corneal wound healing model described in the study 3 of this thesis. First, biocompatibility of five different concentrations of melatonin (5, 30, 60, 90, 120 µg/ml) dissolved in double distilled water were tested. There was no delay in corneal wound closure with any of the melatonin solutions tested and all wounds closed in more than 80% at day 4 regardless the melatonin concentration in the solutions. This indicates that there was no toxic effect induced by the solutions. Melatonin dilutions had previously enhanced corneal wound healing rate in an *in vivo* corneal wound healing model in rabbit (Crooke et al, 2015), whereas in our case there was just a slight increase in the wound healing rate with the 30, 60, and 90 µg/ml melatonin solutions when compared with control, but it was not statistically significant (Figure 28). These differences may be due to the fact that we cannot evaluate the effect that the circadian rhythm has over melatonin

Study 5. Melatonin effect on ex vivo corneal wound healing

related molecules in *ex vivo* tissues, and previous studies have shown that there are variations not only in the melatonin profile expression (Khullar, 2012; Waller et al., 2016), but also there could be different amount of melatonin receptors during day and night (Chai et al., 2013).

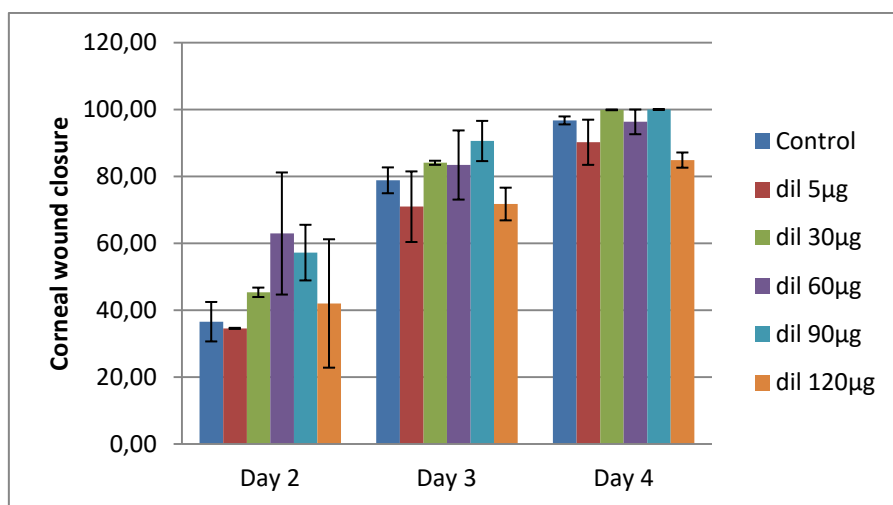


Figure 28. *Ex vivo* corneal wound healing after exposure to melatonin solutions.

There is evidence that chitosan (Ueno et al., 2001), lecithin (Saporito et al., 2017), and melatonin (Song et al., 2016) increases wound healing rate in skin epithelial wounds, and also that melatonin loaded lecithin-chitosan NPs produces an increase in wound healing rate in a human keratinocyte monolayer (Blažević et al., 2016) and in an *in vivo* skin wound healing model developed in diabetic rats (Lopes et al., 2020). Then, corneal wounds were exposed to the different controls (blank) and melatonin-loaded NP formulations for three different times (5 min, 30 min, and 4 hours). In the first evaluation after 5 min exposure none of the formulations improved the healing rate compared to controls at any of the evaluation time points. Blank lecithin/chitosan NPs significantly reduced the %of wound closure at day 2 in a similar way that chitosan solution when compared to the other developed NPs. Also, the chitosan solution significantly reduced corneal healing at day 4 (Figure 29).

Study 5. Melatonin effect on ex vivo corneal wound healing

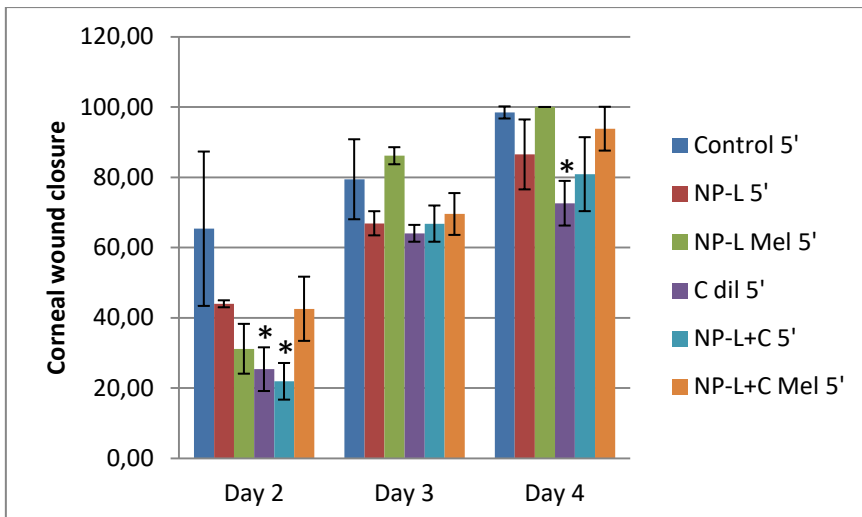


Figure 29. Corneal wound healing after 5-min exposure to NPs. NP-L: lecithin NPs; NP-L Mel: melatonin loaded lecithin NPs; NP-L+C: lecithin-chitosan NPs; NP-L+C Mel: melatonin loaded lecithin-chitosan NPs. * $p \leq 0,005$

Again, in the evaluation after 30-min exposure, none of the formulations improved the healing rate compared to controls. Instead, both blank and melatonin-loaded chitosan NPs, and chitosan solution significantly delayed corneal wound closure at any time point (Figure 30).

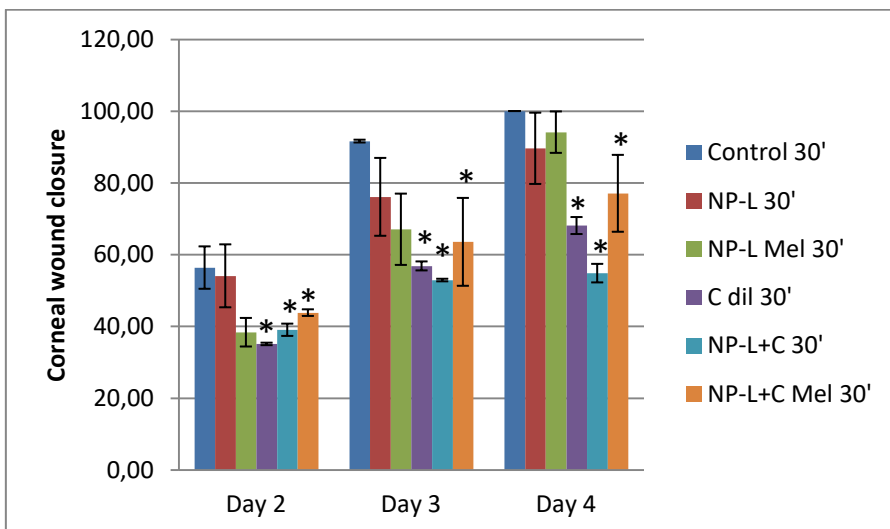


Figure 30. Corneal wound healing after 30-min exposure to NPs. NP-L: lecithin NPs; NP-L Mel: melatonin loaded lecithin NPs; NP-L+C: lecithin-chitosan NPs; NP-L+C Mel: melatonin loaded lecithin-chitosan NPs. * $p \leq 0,005$

Study 5. Melatonin effect on ex vivo corneal wound healing

Similar results were obtained for the 4-hour exposure time. The reduction in % of wound closure caused by the chitosan solution was especially noteworthy with just a 23.4 ± 0.83 % of wound closure at day 4. It is interesting to note that melatonin-loaded lecithin NPs significantly increased % of wound closure at day 3 although these very same NPs significantly reduced % of wound closure at day 2 (Figure 31).

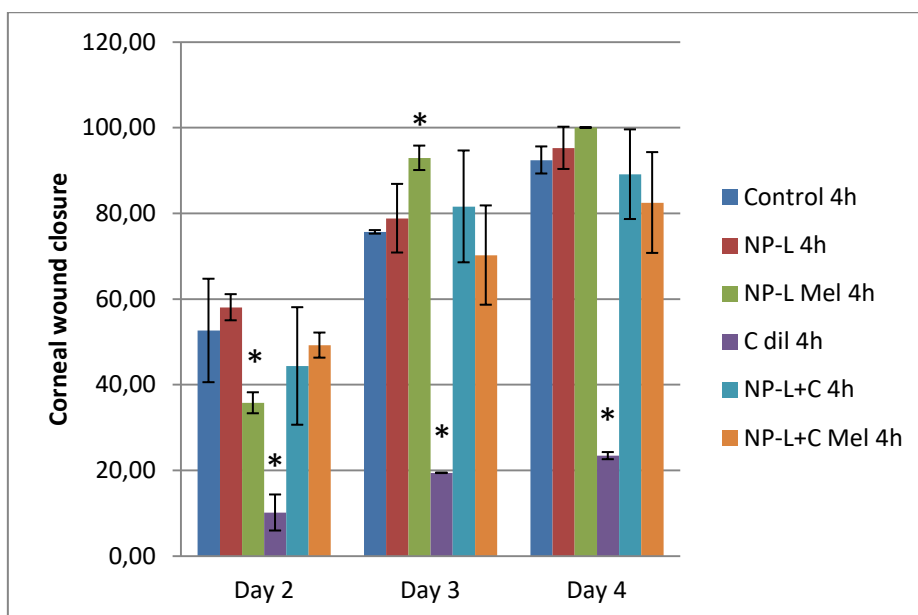


Figure 31. Corneal wound healing after 4-hour exposure to NPs. NP-L: lecithin NPs; NP-L Mel: melatonin loaded lecithin NPs; NP-L+C: lecithin-chitosan NPs; NP-L+C Mel: melatonin loaded lecithin-chitosan NPs.

In conclusion, our contradictory results along with the fact that none of the melatonin-loaded NPs were able to consistently improve the wound healing rate warrant additional studies after re-formulation of developed NPs.

REFERENCES

- Amidi M, Romeijn SG, Borchard G, Junginger HE, Hennink WE, Jiskoot W. Preparation and characterization of protein-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system. *J Controlled Release*, 2006;111:107–16. doi:10.1016/j.jconrel.2005.11.014
- Amidi M, Romeijn SG, Verhoef JC, Junginger HE, Bungener L, Huckriede A, Crommelin DJ, Jiskoot W. N-trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles loaded with influenza subunit antigen for intranasal vaccination: Biological properties and immunogenicity in a mouse model. *Vaccine*, 2007;25:144–53. doi:10.1016/j.vaccine.2006.06.086
- Blažević F, Milekić T, Romić MD, Juretić M, Pepić I, Filipović-Grčić J, Lovrić J, Hafner A. Nanoparticle-mediated interplay of chitosan and melatonin for improved wound epithelialisation. *Carbohydr Polym*. 2016 Aug 1;146:445-54. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.03.074.
- Chai K, Liu X, Zhang Y, Lin H. Day-night and reproductive cycle profiles of melatonin receptor, kiss, and gnRH expression in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Mol Reprod Dev*. 2013;80(7):535-548. doi:10.1002/mrd.22191
- Chime SA, Attama AA, Builders PF, Onunkwo GC. Sustained-release diclofenac potassium-loaded solid lipid microparticle based on solidified reverse micellar solution: in vitro and in vivo evaluation. *J Microencapsul*.2013;30(4):335-345. doi:10.3109/02652048.2012.726284
- Crooke A, Guzman-Aranguiz A, Mediero A, et al. Effect of melatonin and analogues on corneal wound healing: involvement of Mt2 melatonin receptor. *Curr Eye Res*. 2015;40(1):56-65. doi:10.3109/02713683.2014.914540

Study 5. Melatonin effect on ex vivo corneal wound healing

- Gerelli Y, Barbieri S, Di Bari MT, Deriu A, Cantu L, Brocca P, Sonvico F, Colombo P, May R, Motta S. Structure of self-organized multilayer nanoparticles for drug delivery. *Langmuir*, 2008;24:11378–84. doi:10.1021/la801992t
- Hafner A, Lovric J, Voinovich D, Filipovic-Grcic J. Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: Physicochemical characterisation and permeability through Caco-2 cell monolayers. *Int J Pharm*, 2009;381:205–13. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.07.001
- Hafner A, Lovrić J, Pepić I, Filipović-Grčić J. Lecithin/chitosan nanoparticles for transdermal delivery of melatonin. *J Microencapsul*. 2011;28(8):807-815. doi:10.3109/02652048.2011.622053
- Khullar A., 2012. The role of melatonin in the circadian rhythm sleep-wake cycle: a review of endogenous and exogenous melatonin. *Psychiatric Times*, 29(7), 26.
- Liu, D., Liu, C., Zou, W. *et al*. Enhanced gastrointestinal absorption of N₃-O-toluyl-fluorouracil by cationic solid lipid nanoparticles. *J Nanopart Res* 12, 975–984 (2010). doi.org/10.1007/s11051-009-9648-4
- Lopes Rocha Correa V, Assis Martins J, Ribeiro de Souza T, de Castro Nunes Rincon G, Pacheco Miguel M, Borges de Menezes L, Correa Amaral A. Melatonin loaded lecithin-chitosan nanoparticles improved the wound healing in diabetic rats. *Int J Biol Macromol*. 2020 Nov 1;162:1465-1475. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.08.027.
- Novack GD, Robin AL. Ocular pharmacology. *J Clin Pharmacol*. 2016;56(5):517-527. doi:10.1002/jcph.634
- Saporito F, Sandri G, Bonferoni MC, Rossi S, Boselli C, Icaro Cornaglia A, Mannucci B, Grisoli P, Vigani B, Ferrari F. Essential oil-loaded lipid

Study 5. Melatonin effect on ex vivo corneal wound healing

nanoparticles for wound healing. *Int J Nanomedicine*. 2017 Dec 27;13:175-186. doi: 10.2147/IJN.S152529.

- Song R, Ren L, Ma H, Hu R, Gao H, Wang L, Chen X, Zhao Z, Liu J. Melatonin promotes diabetic wound healing in vitro by regulating keratinocyte activity. *Am J Transl Res*. 2016 Nov 15;8(11):4682-4693.
- Sonvico F, Cagnani A, Rossi A, Motta S, Di Bari MT, Cavatorta F, Alonso MJ, Deriu A, Colombo P. Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/ chitosan ionic interaction. *Int J Pharm*, 2006;324:67–73. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.06.036
- Swathi G, Prasanthi N, Manikiran S, Ramarao N. Solid lipid nanoparticles: colloidal carrier systems for drug delivery. *IJPSR*. 2010;1:1-16
- Ueno H, Mori T, Fujinaga T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001 Nov 5;52(2):105-15. doi:10.1016/s0169-409x(01)00189-2.
- Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006;58(11):1131-1135. doi:10.1016/j.addr.2006.07.027
- Waller KL, Mortensen EL, Avlund K, et al. Melatonin and cortisol profiles in late midlife and their association with age-related changes in cognition. *Nat Sci Sleep*. 2016;8:47-53. Published 2016 Jan 21. doi:10.2147/NSS.S75946

Limitaciones y Trabajo

Futuro / *Limitations and*

Future Work

LIMITACIONES

El presente trabajo tiene una serie de limitaciones que deben ser tenidas en cuenta en el momento de valorar las conclusiones que de él se desprenden.

En primer lugar, el modelo utilizado es un modelo *ex vivo* que, si bien es una buena referencia como punto intermedio entre los experimentos *in vitro* e *in vivo*, los resultados derivados de su uso no pueden, por sí solos, ser directamente extrapolables a la realidad *in vivo*. Aunque la córnea sea una estructura inmunoprivilegiada se encuentra en comunicación con otras estructuras oculares mediante la lágrima, el humor acuoso o el sistema nervioso que tan ricamente la inerva. El modelo *ex vivo* desarrollado carece de todas estas conexiones y siempre proporcionará información limitada sobre el efecto de las formulaciones terapéuticas que se puedan estudiar. Además, el tejido es de origen porcino que, aunque sea similar al humano, no es exactamente igual.

Otra limitación ha sido la práctica ausencia de anticuerpos específicos para tejidos porcinos disponibles comercialmente, lo que ha obligado a usar anticuerpos sin garantías de reconocimiento de las formas moleculares presentes en el cerdo. Este hecho podría explicar que, según los resultados recogidos, el funcionamiento de las moléculas evaluadas no haya sido el esperado.

Finalmente, los resultados de la prueba funcional de cicatrización *ex vivo* con distintas moléculas realizadas sobre el modelo han sido muy variables, por lo que la fiabilidad es limitada. Es posible que aumentando el número de ojos utilizados los resultados de la prueba hubieran sido más robustos, pero la cantidad de ojos de cerdo de los que se puede disponer cada mes es bastante limitada, lo que hace complicado aumentar el número.

FUTURAS INVESTIGACIONES

Actualmente la superficie ocular porcina se está utilizando de forma rutinaria para probar la biocompatibilidad y grado de penetración en los tejidos de la superficie ocular de nanomedicinas que está desarrollando el Grupo de Investigación en Superficie Ocular (GSO) del IOBA. El modelo de cicatrización desarrollado en esta tesis, si bien ha demostrado su utilidad, necesita de refinamiento y pruebas adicionales para mejorar y ampliar su utilización. Por ejemplo, se podría realizar la herida de menor tamaño y reducir el tiempo de seguimiento de su cierre. También, podría ser interesante realizar la herida afectando a la zona limbar en vez de en córnea central. En cualquier caso, sería necesario plantear un estudio más profundo de los mecanismos moleculares implicados en los procesos de reparación y de regeneración del epitelio corneal que permita evaluar de forma más profunda el potencial del modelo para ayudar en el desarrollo de nuevos tratamientos.

LIMITATIONS

This Thesis work, as any research work, has limitations that need to be considered.

First, the model developed and tested in this work is an *ex vivo* model. Although this kind of models are closer to the living beings than *in vitro* models a direct extrapolation of obtained results is not possible. The cornea is richly innervated and in contact with other ocular structures and fluids, such as the tear film or the aqueous humor. Such connections are lost in the *ex vivo* model and consequently, the model provides limited information compared to what an *in vivo model* may provide.

Also, tissues used in this work are from porcine origin. Although the similarity between human and porcine tissues, including eye tissues, is well-known and accepted in the scientific community, porcine tissues are not exactly equal to human tissues, not even the ocular surface structures that we characterized in the Chapter 1 of this Thesis.

From a technical point of view, another important limitation of this work is related to the scarcity of commercially available antibodies specific for the pig. This fact forced us to use antibodies specific for human tissues with no proven specificity to porcine epitopes. This may have affected our results.

Finally, the functional test of wound closure using the *ex vivo* model did not work as we expected. The fact that well-know positive modulators of epithelial proliferation had no effect on the wound healing rate in our experimental conditions make us believe that the reliability of the model is limited. We may have needed more porcine eyes to test more conditions and get more robust results. However, the number of eye that we are allowed to obtain every month from the only slaughterhouse in Valladolid is limited, what made difficult the experimental set-up.

FUTURE WORK

Currently, our group at the IOBA (Ocular Surface Research Group) routinely use porcine ocular surface tissues for drug biocompatibility and penetration studies. Regarding the model developed in this Thesis, we believe that needs refinement and additional experiments prior to extend its use. For instance, different size wounds or different evaluation times would provide supplementary information useful to improve the model. Also, it would be interesting to wound the limbal epithelium instead of the epithelium from the central cornea to simulate a limbal deficiency. In any case, a further study of the molecular mechanisms involved in the *ex vivo* corneal wound healing is warranted to evaluate more specifically this model potential to be used to test new therapeutic developments.

Conclusiones /

Conclusions

CONCLUSIONES

1. La similitud de la SO porcina y la humana confirman que la primera es un material adecuado para realizar estudios fisiopatológicos relacionados con las estructuras de la SO humana.
2. Los subtipos principales de receptores de melatonina MT_1 y MT_2 y la molécula precursora AANAT están presentes en los tejidos de la córnea y de la conjuntiva del cerdo, lo que lleva a pensar que la melatonina podría estar involucrada en diferentes procesos en la SO porcina. La conjuntiva podría tener cierta capacidad de regulación a nivel local, dada la mayor presencia de estas moléculas, especialmente MT_1 y AANAT, en sus tejidos que en los de la córnea.
3. Se ha podido establecer un modelo porcino *ex vivo* de herida corneal realizada de forma mecánica repetible y útil para evaluar la cicatrización *ex vivo* del epitelio corneal porcino en un periodo corto de 5 días.
4. El modelo porcino *ex vivo* utilizado en este trabajo de tesis permite comprobar la funcionalidad de moléculas activas con potencial terapéutico, si bien requiere de optimización para extender su uso.
5. Se ha encapsulado con éxito la melatonina en varias formulaciones de NPs cuyo efecto sobre el ritmo de cicatrización del epitelio en el modelo porcino *ex vivo* de herida corneal no ha sido el esperado, si bien las NPs de lecitina cargadas con melatonina parecen ser las de mayor potencial.

CONCLUSIONS

1. The similarity of porcine and human OS confirms that it is a suitable material for conducting pathophysiological studies related to the structures of the human OS.
2. The main subtypes of melatonin receptors MT_1 and MT_2 and the precursor molecule AANAT are present in the corneal and conjunctival porcine tissues, which make us believe that melatonin could be involved in different processes in porcine OS. The conjunctiva could have a certain capacity for local regulation, given the greater presence of these molecules, especially MT_1 and AANAT, in its tissues than in those of the cornea.
3. We established a repeatable and useful porcine *ex vivo* model making a mechanical wound to evaluate the *ex vivo* wound healing of the porcine corneal epithelium in a short period of time (5 days).
4. The porcine *ex vivo* wound healing model established allows to test the functionality of active molecules with therapeutic potential for corneal epithelial regeneration, although it requires further optimization to extend its use in research.
5. Melatonin has been successfully encapsulated in lecithin and lecithin+chitosan NPs, but its positive effect on the healing rate of *ex vivo* corneal epithelial wounds not been unexpectedly low with the only exception of lecithin NPs loaded with melatonin, which hold promise of potential use of this nanosystems after reformulation and additional studies.