



Universidad de Valladolid



MÁSTER EN INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA VISIÓN

TRABAJO FIN DE MÁSTER:

**DESARROLLO DE UN MODELO
EXPERIMENTAL *EX VIVO* DE CICATRIZACIÓN
Y OPACIDAD ESTROMAL CORNEAL**

Presentada por

Alvaro Juan Pablo Tovar Gómez MD, MSc

.....

Dirigida por:

Dra. Laura García Posadas

Dra. Yolanda Diebold Luque

.....

Fecha:

24 de junio de 2024

.....

CONTENIDO

	Página
Prefacio	
Documentos de visto bueno	01-02
Breve <i>Currículum vitae</i>	03
Dedicatoria y agradecimientos	04
Resumen en español	05
<i>Abstract</i> en inglés	06
Introducción	
Opacidades Corneales	07
Anatomía de la córnea	07
Respuesta corneal a una lesión	09
Regeneración del epitelio	09
Regeneración estromal y formación de opacidad corneal	10
Modelos de experimentales de estudio en cicatrización corneal	12
Modelos <i>ex vivo</i> de cicatrización estromal	13
Anatomía ocular comparada de ojo humano con ojo porcino	14
Justificación	15
Hipótesis y objetivos	16
Material y métodos	17-20
Resultados	21-28
Discusión	29-31
Conclusiones	32
Bibliografía	33-34

LISTA DE ABREVIATURAS

ARVO: Asociación para la investigación en visión y oftalmología	mm: milímetros
C: grados centígrados de temperatura	ng: nanogramos
DMEM/F12: medio de cultivo <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham</i> ®	OCT: tomografía de coherencia óptica
EE UU: Estados Unidos de América	OMS: Organización Mundial de la Salud
gr: gramos	PBS: tampón fosfato salino.
GSO: grupo superficie ocular	QMPA: queratectomía manual profunda asistida por aire
HE: hematoxilina y eosina	RM: raspado manual de la córnea
IC: intervalo de confianza	SO: superficie ocular
IF: inmunofluorescencia	TGFβ1: Factor de crecimiento transformante beta 1
IL-1: inter leuquina uno	TNFα: factor Necrosis tumoral alfa
IOBA: Instituto de Oftalmobiología aplicada de la Universidad de Valladolid	TM: tricómico de Masson
IP: ioduro de propilio	UE: Unión Europea
Kg: kilogramos	UVA: Universidad de Valladolid
ml: mililitros	α-SMA: alfa actina de músculo liso.
	µg: microgramos

LISTADO DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Corte histológico córnea humana y sección de OCT de córnea humana	08
Figura 2: Esquema general de lesión epitelial y la interacción estroma-epitelio	11
Figura 3: Corte histológico con hematoxilina/eosina de córnea porcina.....	14
Figura 4: Esquema de queratectomía manual profunda asistida por aire	18
Figura 5: Escala fotográfica de opacidad estromal del modelo <i>ex vivo</i>	19
Figura 6: Fotografía macroscópica del modelo <i>ex vivo</i> de cicatrización estromal	21
Figura 7: Evolución del cierre de herida epitelial en modelo <i>ex vivo</i> de cicatrización estromal	22
Figura 8: Análisis del cierre de herida epitelial en modelo <i>ex vivo</i> de cicatrización estromal	22
Figura 9: Evolución del grado de opacidad en modelo de cicatrización estromal	23
Figura 10: Evolución del grado de opacidad en modelo de cicatrización estromal	24
Figura 11 Corte histológico de córnea luego de QPMA en modelo <i>ex vivo</i>	25
Figura 12: Corte histológico de ojo del grupo control con tinción HE y TM.....	26
Figura 13: Corte histológico de ojo del grupo experimental con tinción HE y TM	26
Figura 14: Corte histológico con IF ojo del grupo control y ojo de grupo experimental	27
Figura 15: Corte histológico con IF ojo de grupo experimental y control positivo α-SMA	28

BREVE CURRICULUM VITAE

- Grado de Médico y Cirujano por la Universidad de San Carlos de Guatemala en el año 2015.
Trabajo de Fin de Grado: Valor del Puntaje de Trauma Ocular como Instrumento pronóstico
- Postgrado en Investigación Científica por la Universidad de San Carlos de Guatemala en el año 2019.
- Maestría en Ciencias Médicas con Especialidad en Oftalmología por la Universidad de San Carlos de Guatemala en el año 2020.
Graduado Magna Cum Laude.
Trabajo de Fin de Máster: Agudeza Visual en pacientes con cirugía de catarata post traumática
- Maestría en la Sub Especialidad de Córnea, Cristalino y Cirugía Refractiva, Universidad Rafael Landívar en 2023.
Graduado Magna Cum Laude
Trabajo de Fin de Máster: Assessment of the online OHTS 5-year Primary Open Angle Glaucoma risk calculator to determine glaucoma suspect patient follow up in Guatemala.

Principalmente el desarrollo de mi carrera profesional se ha centrado en adquirir habilidades y competencias para la atención de pacientes con patologías oftalmológicas; fundamentalmente al ser mi área de especialización, patologías de la superficie ocular, el cristalino y patologías refractivas; brindando soluciones médicas y quirúrgicas a los pacientes a mi cargo. Además, realizando investigación clínica, presentado resultados de trabajos en múltiples congresos nacionales e internacionales donde destacan la participación en Congresos de la Sociedad Americana de Catarata y Cirugía refractiva, Congreso de la Sociedad Panamericana de Oftalmología y Congreso de la Sociedad Europea de Catarata y Cirugía refractiva.

Sin embargo, desde la parte inicial de mi formación académica, la investigación ha sido fundamental en la adquisición de conocimientos; siendo en el año 2015 la primera vez que tuve contacto con el Máster en Investigación en Ciencias de la Visión ya que me interesó el perfil de egreso de sus participantes; debido principalmente al inicio de mi residencia y especialización en Oftalmología el plan de hacer dicho máster quedó suspendido momentáneamente. Fue en el año 2023 donde luego de concluir mi formación clínica y sobre todo ante la escasez de investigación y formación investigadora en mi país, Guatemala, decidí iniciar esta parte de mi formación en investigación. Fue a través de la beca otorgada por la Fundación Carolina y la Universidad de Valladolid que se desarrolló este proceso.

DEDICATORIA

A Dios, el creador del universo; en cualquiera de sus manifestaciones.

A mis padres Doctores, por su incondicional amor y apoyo. Este triunfo una vez más es de ustedes. Sus oraciones me han servido para culminar este proceso estando lejos de casa.

A mi compañera de vida: Marta María; por ser mi inspiración. Por enseñarme con su ejemplo a no renunciar y seguir adelante aún sea difícil. Mucho ha cambiado en 14 años, pero tú has sido mi constante.

A mis hermanos: Hugo y Gaby; por su amor estando lejos y cuidar lo que dejé en casa.

A mi sobrina Nicole; por ser la alegría que nos faltaba.

A mi casa; La Unidad Nacional de Oftalmología, por ser el trampolín para llegar más alto

AGRADECIMIENTOS

A mis tutoras; Dra. Laura García Posadas y Dra. Yolanda Diebold Luque, por recibirme en su grupo de investigación y enseñarme el lado preclínico de la investigación en oftalmología, despertando en mí ese deseo de investigar.

Al Dr. Miguel J Maldonado, director del IOBA, por invitarme a cirugías, por motivarme y hacerme parte de la escritura de dos capítulos de libros oftalmológicos y mantener en mí la llama de la cirugía oftalmológica.

A mis compañeros del *NANOTEAM*, Helen, Isma, Gaby, Bea, Estefanía; por su acompañamiento durante este proceso, por enseñarme lo relacionado con el laboratorio y la investigación preclínica y sobre todo por sus palabras de ánimo, ayuda y apoyo para concluir este trabajo.

A mis amigos Luisa y Javi, por ser la familia “chapina” que me acogió en Valladolid.

Al Instituto de Oftalmobiología Aplicada IOBA y la Universidad de Valladolid; por ser los centros de esta parte de mi formación abriéndome sus puertas para poder desarrollarme.

A la Fundación Carolina, por otorgarme una beca en la convocatoria 2023-2024 y permitirme cumplir mi sueño de estudiar en el extranjero siendo becario.

--Un sueño muere, solo cuando se hace real--

RESUMEN

Introducción: Las opacidades corneales suponen un problema importante de salud a nivel mundial, debido a la disminución visual que provocan. Estas opacidades pueden desarrollarse tras la aparición de distintas lesiones corneales, tales como traumatismos, infecciones, patologías inflamatorias o bien hereditarias y además luego de cirugía refractiva. Están relacionadas con la disrupción de fibras de colágeno y proliferación de miofibroblastos en respuesta fibrótica, en una cascada compleja de inflamación y cicatrización. En el ámbito experimental es un proceso complejo de reproducir, y por ello es necesario desarrollar nuevos modelos de estudio. **Objetivo:** Desarrollar un modelo *ex vivo* de cicatrización y de opacidad estromal corneal utilizando ojos de origen porcino. **Materiales y Métodos:** Para el desarrollo de este trabajo se recolectaron ojos de cerdo común del matadero local. Se preservaron con medio de cultivo (DMEM/F12) suplementado con 10% antibiótico/antimicótico. Con el objetivo de producir opacidades corneales se llevaron a cabo distintos procedimientos: queratectomía manual profunda asistida por aire (QMPA), QMPA más raspado manual (RM), QMPA y exposición a TGF β 1 como promotor de cicatrización y diferenciación de fibroblastos hacia miofibroblastos y QMPA + RM + TGF β 1. Además, se incluyeron dos grupos control sin y con herida epitelial. Se mantuvieron los botones corneales 7 días a 37 °C, 5% CO₂, y 95% de humedad. Se realizaron fotografías diarias hasta los 7 días. El cierre de la herida epitelial se evaluó mediante aplicación de fluoresceína al 2%. Las imágenes se analizaron con el software ImageJ®. La opacidad corneal se evaluó a través de una escala visual nominal con 4 observadores independientes. Se realizó estudio histopatológico y de inmunofluorescencia con anticuerpo α -SMA como marcador de miofibroblastos y se compararon los resultados de diferentes condiciones. **Resultados:** Se realizaron 3 experimentos independientes. Se pudo mantener el modelo *ex vivo* durante 7 días. Se observó un mayor cierre de herida epitelial en los ojos de los grupos sin TGF β 1. Se observó una escala de opacidad mayor en los ojos en donde se aplicó TGF β 1 y se realizó QMPA+RM. Se obtuvo un coeficiente Kappa-Cohen ponderado de 0,68 y un acuerdo entre observadores del 80,56%. El análisis histopatológico demostró la desorganización de fibras de colágeno en el tejido corneal. La inmunofluorescencia mostró reactividad con anticuerpo α -SMA como marcador de miofibroblastos en los ojos donde se realizó QMPA, siendo mayor en los ojos con TGF β 1. **Conclusiones:** Es posible desarrollar un modelo de modelo *ex vivo* de cicatrización y opacidad estromal corneal utilizando ojos de origen porcino que represente características propias de la cicatrización estromal que lleva a la opacidad corneal. Es necesario realizar más estudios para poder evaluar la aplicabilidad de este modelo para considerar futuros abordajes preventivos y terapéuticos de la opacidad corneal.

Palabras Clave: Cicatrización corneal, opacidades corneales, *haze* corneal.

ABSTRACT

Introduction: Corneal opacities are recognized as a significant public health problem due to the visual impairment they cause. Opacities can occur after several injuries to the corneal tissue such as trauma, infections, inflammatory or hereditary diseases, and refractive surgery. They are associated with collagen fiber disruption and myofibroblast proliferation after a fibrotic response, with a complex cascade of inflammation and scar tissue formation. Recreating these conditions in the experimental setting is difficult due to the need of expensive and sometimes inaccessible equipment. **Purpose:** To develop an ex vivo corneal stromal wound healing model using pig eyes. **Methods:** In order to develop this study, common pig eyes from the local slaughterhouse were used and preserved in culture medium (DMEM/F12) with 10% antibiotic/antimycotic supplementation. To produce the corneal opacities different procedures were performed: deep manual keratectomy assisted by air (DMAK), DMAK plus manual scraping (MS), DMAK and exposure to TGF β 1 as a promoter of scarring and fibroblast to myofibroblast differentiation, and DMAK + MS + TGF β 1 and two control groups were included, with and without epithelial injury. The corneal tissues were maintained along 7 days at 37°C, 5% CO₂, and 95% humidity. Daily photographs were obtained until day 7. Epithelial wound closure was evaluated by applying 2% fluorescein and images were analyzed using ImageJ® software. Corneal opacity was assessed using a nominal visual scale with 4 independent observers. Histopathological and immunofluorescence studies with α -SMA antibody as a myofibroblast marker were performed, and the results under different conditions were compared. **Results:** three independent experiments were conducted, successfully maintaining the ex vivo model for 7 days. Greater epithelial wound closure was observed in the eyes of the groups without TGF β 1. Higher opacity scale scores were noted in the eyes where TGF β 1 was applied and MS + DMAK were performed. A weighted Kappa-Cohen coefficient of 0,68 and an 80,56% inter-observer agreement were obtained. Histopathological analysis demonstrated disorganization of collagen fibers in the corneal tissue. Immunofluorescence showed reactivity with α -SMA antibody as a myofibroblast marker in the eyes where DMAK was performed, being greater in the eyes with TGF β 1. **Conclusion:** It is possible to develop an ex vivo model of corneal stromal scarring and opacity using porcine eyes that could represent characteristics of stromal wound healing and leads to corneal opacity. Further studies are needed to evaluate the applicability of this model in order to consider future preventive and therapeutic approaches for corneal opacities.

Key Words: Cornea wound healing, corneal opacities, corneal haze.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Opacidades corneales

De acuerdo con datos publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el mundo actualmente existen alrededor de 180 millones de personas con discapacidad visual siendo 45 millones de personas ciegas bilateralmente; lo más significativo de esta estadística es que cerca del 80% de las causas que conllevan a este alto número de personas con discapacidad visual son prevenibles o tratables (1). Dentro de estas causas prevenibles o tratables, la principal se debe a discapacidad visual producida por catarata y la segunda causa prevenible o tratable es la ceguera corneal. Existen múltiples patologías causantes de la ceguera corneal, tales como patologías infecciosas, inflamatorias, congénitas y traumáticas y su incidencia varía según la población estudiada (1). Aunque no sea una complicación muy frecuente, la opacidad corneal que se produce en alrededor del 3% luego de una cirugía refractiva es una causa que puede conllevar a disminución de la función visual (2). Esto es cada vez más importante ya que de acuerdo con datos también publicados por la OMS en 2050 cerca del 50% de la población mundial padecerá de miopía y esto aumentará inevitablemente el número de cirugías refractivas y por ende también el número de complicaciones tales como las opacidades corneales luego de las mismas (1).

En sí, la ceguera corneal está producida por las opacidades corneales que limitan la función visual significativamente. Una de las características primordiales de la córnea humana es su capacidad de mantenerse transparente. Esta transparencia se logra principalmente por la organización específica de las fibras de colágeno, la ausencia de vasos sanguíneos y linfáticos y la acción de bomba que cumple el endotelio corneal. Cuando fallan alguno de estos mecanismos se da una opacidad corneal, la cual puede ser temporal o permanente. Dependiendo de diferentes características de la lesión que produzca el proceso cicatricial, esta opacidad pudiera tener diferente profundidad, localización y disminución de la función visual. Además de generar la opacidad consecuente, las opacidades corneales generan también aumentos o cambios en los defectos refractivos contribuyendo así a la disminución de la función visual y contribuyendo a la carga de la enfermedad.

1.2 Anatomía de la córnea

La córnea es el principal medio refractivo del ojo humano entregando cerca del 75% de las dioptrías del sistema óptico. Su principal característica es su transparencia. En un adulto sano, en condiciones normales mide entre 11-12 mm horizontal y 10-11 mm vertical, con un grosor aproximado de entre 500-600 μm en el centro y que aumenta hacia la periferia. La densidad de inervación corneal es muy alta, siendo la mayor en el cuerpo humano. Estos nervios son los ciliares largos que ingresan a nivel del limbo y luego transcurren en el plexo subepitelial hacia el centro de la córnea; de la rama oftálmica del nervio trigémino. Refractivamente la córnea es prolata, que significa que su centro es más curvo que su periferia. (3,4)

La córnea está compuesta de cinco capas (**Figura 1**). El epitelio corneal es la más superficial. Es un epitelio plano estratificado y no queratinizado unido a su membrana basal del epitelio a través de uniones estrechas que le confieren su capacidad de barrera protectora. Mide aproximadamente 50 μm de grosor y está formado por entre 5 y 6 subcapas de epitelio formadas por células basales, aladas y superficiales (5). Luego se encuentra la capa de Bowman la cual es la parte más superficial del estroma y es más bien una reorganización de las fibras de colágeno estromal que una capa como tal. Tiene la principal característica de que si una lesión penetra esta capa tiene la capacidad de iniciar el proceso de cicatrización estromal que puede llevar a una opacidad corneal. (3,4)

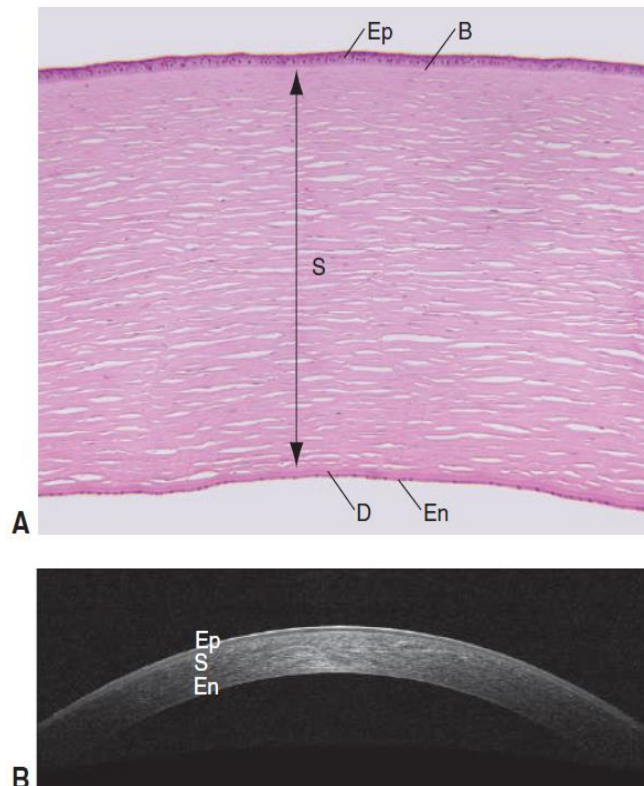


Figura 1: A: Corte histológico con hematoxilina/eosina de córnea humana. B: Imagen de sección de córnea humana con tomografía óptica de coherencia. Ep= epitelio, B= Bowman, S=estroma, D= Descemet, En=endotelio. Fuente: Traducido y modificado de *Basic and Clinical Science Course 2023-2024 Vol 2: Fundamentals and Principles of Ophthalmology American Academy of Ophthalmology.* (Part A courtesy of George J. Harocopos, MD; part B courtesy of Vikram S. Brar, MD.)

El estroma corneal comprende el 90% del espesor corneal y está formado por fibras de colágeno alineadas específicamente para darle la transparencia a la córnea. Embebidos en este estroma se encuentran los queratocitos que producen colágeno, principalmente de tipo I, pero también colágeno de tipo III, VI y VIII. Las lamelas de colágeno se extienden en todo el diámetro de la córnea y su arreglo paralelo es fundamental para evitar opacidades corneales. La matriz está además complementada por proteoglicanos, principalmente queratán sulfato. Los queratocitos se activan ante una lesión, lo que puede llevar a la formación de una opacidad corneal cicatricial. (3,4,6)

Más profundamente se encuentra la membrana de Descemet, considerada como la membrana basal del endotelio. Tiene un grosor de entre 10-12 μm en los adultos, es rica en colágeno tipo IV y se engrosa con la edad. Por último, se encuentra el endotelio corneal con un grosor promedio de 5 μm y compuesto de una monocapa de células hexagonales derivadas de la cresta neural, las cuales cumplen una función de bomba Na^+/K^+ ATPasa que se encarga, en parte, del mantenimiento de la transparencia corneal. (3-5)

Una parte especialmente importante de la córnea es el limbo esclero corneal, la zona de transición entre la esclera y la córnea. Esta es un área sumamente importante en el mantenimiento de la homeostasis y la transparencia corneal ya que en el limbo esclero corneal se encuentran las empalizadas de Vogt, el nicho de las células madre limbares (3). Estas células madre son las encargadas del mantenimiento de la producción del epitelio. El limbo además se encarga de la nutrición de la córnea periférica y tiene una importante función en la inmunovigilancia y la respuesta local tras una lesión corneal. (6)

1.3 Respuesta corneal a una lesión

Las opacidades corneales que se producen en respuesta a la cascada de cicatrización iniciada tras traumatismos, lesiones químicas, cirugías o infecciones deben diferenciarse de las opacidades congénitas, como distrofias o depósitos metabólicos, ya que el proceso fisiopatológico que conlleva la formación de la opacidad es diferente y este determinará su profundidad, severidad y capacidad de reversibilidad. Generalmente este proceso sigue unas etapas ordenadas que llevan finalmente a la producción de una opacidad, es decir, que una desorganización de la anatomía normal descrita anteriormente es lo que determina los pasos que concluyen en la formación de una opacidad. (7)

1.3.1 Inicio de la opacidad estromal: regeneración del epitelio corneal después de una lesión

El primer cambio que se produce tras una lesión corneal que conllevará la formación de una opacidad corneal se da a nivel del epitelio. El epitelio corneal se encuentra en constante renovación y se estima que tarda alrededor de 7 días en renovarse, por lo que estas células de manera normal tienden a descamarse y repoblarse, lo que está en relación con el correcto funcionamiento del limbo esclero corneal, ya que aquí se encuentra la reserva de células madre que mantienen constante este proceso, como ya se ha indicado. Es muy poco probable que se produzca una opacidad estromal si no se ha producido un daño epitelial primero, ya que la formación de una opacidad requerirá de la interacción entre las células y determinadas moléculas epiteliales y estromales. Se han descrito cuatro fases del proceso de cicatrización epitelial: 1) la fase latente donde las células dañadas entran en apoptosis al romper sus uniones celulares; 2) la fase de migración en la que las células adyacentes a la lesión responden y tratan de restaurar la falta de continuidad en el epitelio lesionado; 3) la fase de proliferación y diferenciación donde

las células madre del limbo buscan proliferar y migrar para repoblar el tejido lesionado; y 4) la fase de anclaje donde las células epiteliales se unen fuertemente a la membrana basal. Este proceso requiere coordinación de varios factores de crecimiento y citoquinas que son las mismas que median la interacción entre el epitelio y el estroma corneal (4,6). Las células epiteliales y estromales interactúan entre sí a través de la membrana basal del epitelio y cualquier cambio en esta interacción producirá la cascada de reacciones moleculares que lleva a la formación de una opacidad corneal, ya que una herida epitelial que no provoque daño en la membrana basal y capa de Bowman raramente producirá una opacidad estromal.

1.3.2 Regeneración estromal y formación de una opacidad

La **Figura 2** resume los acontecimientos moleculares que tienen lugar tras la lesión epitelial. La liberación de múltiples mediadores inflamatorios promueven la diferenciación y la cascada de cicatrización estromal, de manera que en pocas horas se produce la apoptosis de los queratocitos estromales mediada principalmente por la liberación de IL-1 (α y β) y a través del ligando Fas/Fas y de TNF α . La degeneración de los queratocitos se produce debajo del área de la lesión con la creación de una zona acelular subyacente. La apoptosis de los queratocitos está relacionada con la profundidad de la lesión, observándose mayor apoptosis cuando la lesión es más profunda en el estroma corneal (7). Los queratocitos apoptóticos producen una señalización de reclutamiento de células inflamatorias que promueve el mantenimiento de esta cascada de cicatrización. La infiltración de células inflamatorias se da principalmente por neutrófilos, células de Langerhans y macrófagos. Los neutrófilos aparecen de manera rápida, alrededor de 18 horas post lesión. Las células de Langerhans migran del limbo hasta la zona dañada para la respuesta y el reconocimiento de antígenos extraños; por último, la infiltración de macrófagos se produce tras 36 horas y éstos ayudan a la limpieza de detritos celulares y, sobre todo, a la producción de TGF β , molécula clave para la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos y la producción de una opacidad. (7,8)

El rol de los miofibroblastos es crucial para la producción de tejido cicatricial que se convierte posteriormente en la opacidad corneal que producirá una disminución de la función visual. Normalmente los miofibroblastos activados no se encuentran en una córnea sin lesión. Son células con funciones y estructura similar a las células de músculo liso. Se derivan de queratocitos quiescentes por un proceso de transdiferenciación. Cabe recalcar que la función de un fibroblasto es la producción de matriz extracelular como proceso de reparación tisular. Sin embargo, la activación y conversión de fibroblastos a miofibroblastos produce una matriz extracelular desorganizada que, si bien produce una opacidad, también protege las células más internas de infección y más daño del tejido. Esta desorganización de las fibras de colágeno que produce la opacidad contrasta con las fibras de colágeno circundantes que se mantienen organizadas y por ende con transparencia. (8,9)

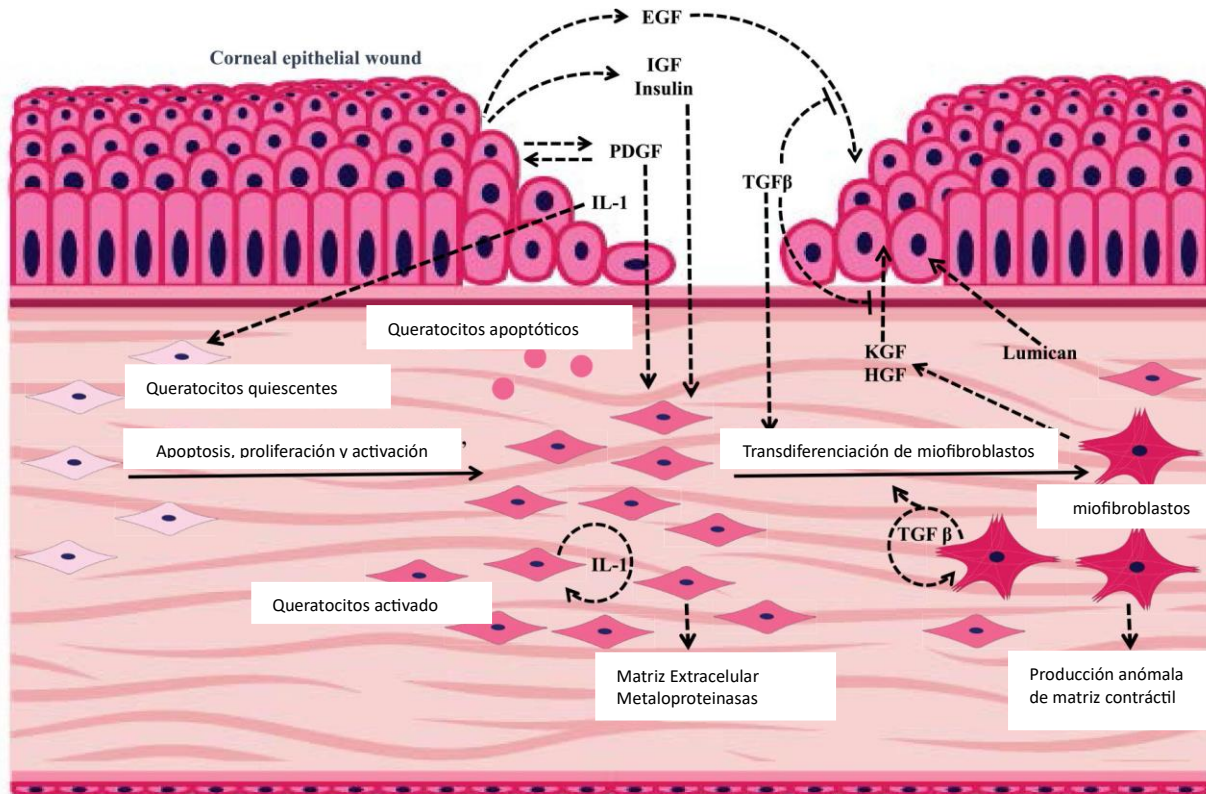


Figura 2: Esquema general de lesión epitelial y la interacción estroma-epitelio que conlleva a una opacidad corneal. Tomado, traducido y modificado de Kamil, S., & Mohan, R. R. (2021). Corneal stromal wound healing: Major regulators and therapeutic targets. *Ocular Surface*, 19, 290-306.

Los fibroblastos reclutados que se transdiferencian a miofibroblastos tienden a ser más móviles y con capacidades contráctiles importantes. Este movimiento es crucial para infiltrarse cerca de la lesión y contraerse para producir una cicatriz (8). Los miofibroblastos expresan actina de músculo liso alfa (α -SMA) además de otras proteínas como integrinas y fibronectinas. La expresión de α -SMA es proporcional a su actividad fibrótica y sobre todo contráctil en la cicatriz producida. Como ya se ha mencionado con anterioridad, estos miofibroblastos son esenciales en la producción de matriz extracelular que, aunque es desorganizada, resulta esencial para la formación de una cicatriz corneal y por ende una opacidad corneal (9). Al finalizar la respuesta a la lesión, con la formación de una cicatriz, los miofibroblastos desaparecen por apoptosis mediada por la IL-1, que reduce la población de estas células, pero la matriz extracelular desorganizada se mantiene y, por tanto, la opacidad estromal persiste (7-9).

El rol del TGF β es también sumamente importante en este proceso. Existen tres isoformas de este factor (TGF β 1, 2, 3). En la córnea humana sin lesión se encuentra confinado estrictamente al epitelio y se libera al estroma al momento de una ruptura por lesión en las capas epiteliales y la membrana basal causando, a través de diversos mecanismos complejos, la transdiferenciación de los fibroblastos hacia miofibroblastos que producen el proceso de formación de la opacidad estromal corneal como se ha mencionado. (7,9)

1.4 Modelos experimentales de estudio en cicatrización corneal

Debido a su enorme relevancia clínica, el proceso de cicatrización corneal ha recibido mucha atención a través de los años. Se han desarrollado diversos modelos experimentales de estudio con el fin de poder elucidar correctamente sus mecanismos y así aplicar potenciales terapias que prevengan o disminuyan la formación de una opacidad corneal que acabará limitando la función visual.

La mayoría de los estudios en humanos se centran en características puramente clínicas como la agudeza visual, la curvatura corneal, el error refractivo, el grosor corneal y los síntomas que refieren los pacientes. Se han utilizado técnicas que evalúan de forma indirecta la cicatrización, tales como la microscopía confocal, la microscopía electrónica de material explantado de la córnea (anillos intraestromales, por ejemplo), los estudios histopatológicos de botones corneales luego de una queratoplastia óptica y la tomografía de coherencia óptica (OCT) (10,11). El problema con estos modelos clínicos de estudio de la cicatrización corneal es que no aportan suficiente información, ya que no estudian de manera directa los mecanismos fisiopatológicos de la cicatrización, sino que más bien estudian el proceso como una complicación de otra intervención, centrándose únicamente un momento determinado dicho proceso. Los modelos matemáticos y de inteligencia artificial aún no tienen un correcto desarrollo que para ser usados en el estudio de la cicatrización corneal.

En el ámbito experimental preclínico, los modelos se pueden dividir en modelos *in vitro*, modelos *in vivo* utilizando animales de laboratorio y modelos *ex vivo* utilizando tejidos u órganos de animales. En relación con los modelos *in vitro* de cicatrización pueden utilizarse células primarias o bien líneas celulares en las cuales se realiza una herida mecánica sobre una monocapa de células confluentes (*scratch assay*) (6). Aunque este modelo es ampliamente utilizado y aceptado, cabe mencionar que su utilidad es limitada ya que la córnea es una estructura con múltiples capas y sus funciones de cicatrización y reparación de heridas dependen de la presencia o no de diferentes moléculas en cada una de sus capas. Por ello, a pesar de que es un modelo útil, no es un modelo completo y sólo permite evaluar algunas características del epitelio corneal. (6)

En cuanto a los modelos *in vivo* existen en la literatura científica una amplia variedad de publicaciones utilizando modelos animales que van desde ratón, rata, cobayo, conejo y gallinas. El caso particular de gallina es especial ya que estas aves poseen capa de Bowman al igual que la córnea humana, por lo que su uso en modelos de cirugía refractiva aditiva y sustitutiva ha cobrado considerable interés (12). Sin embargo, el uso de estos modelos animales, a pesar de poder reproducir de una mejor manera las condiciones y el proceso de la cicatrización estromal corneal que modelos *in vitro* más simples, conllevan dilemas éticos además de las posibles dificultades que acarrea el mantenimiento en el tiempo de estos animales de experimentación y el costo asociado que suele ser elevado, lo que los hace modelos confiables, pero poco accesibles. Además, hay que tener en cuenta las diferencias interespecie.

Por último, los modelos *ex vivo* se han postulado como alternativas intermedias entre los modelos *in vitro* e *in vivo*; esto es debido a que comparten características de ambos modelos. Recientemente su uso se ha extendido considerando los principios de las 3Rs de buenas prácticas de utilización de animales: reducción y reemplazo de modelos animales, así como también en el refinamiento de experimentos que llegan a ser modelos *in vivo* (13). Su uso acarrea varias ventajas ya que el origen de estos animales tiende a ser de animales para consumo humano o bien de laboratorios donde no se hace uso de los globos oculares. Se han reportado para uso como modelos *ex vivo* ojos de cerdo, conejo, caballo, oveja y ganado vacuno. Por otro lado, al ser modelos tridimensionales sus aplicaciones en la cicatrización y penetración de moléculas es importante, además que su costo es menor que el de los modelos *in vivo*. Su desventaja radica principalmente en el mantenimiento de estos modelos por tiempos prolongados, lo cual generalmente no es posible debido a las características propias de los modelos como ausencia de parpadeo, carencia de película lagrimal e invasión corneal sensitiva, vasos sanguíneos. (6,10).

1.4.1 Modelos *ex vivo* de cicatrización estromal

Como se ha mencionado con anterioridad, la importancia clínica y la carga social de las opacidades corneales ha hecho que el estudio de este proceso, con el fin de dilucidar el mecanismo fisiopatológico exacto, sea de interés investigativo. Se han desarrollado múltiples modelos *ex vivo* de cicatrización en roedores y conejos con distintos tipos de lesiones que van desde mecánicas, por álcali hasta la realización de excímer laser comparable con una cirugía refractiva corneal. Sin embargo, los roedores tienden a tener un proceso de cicatrización más rápido que los humanos con una menor tendencia a desarrollar una cicatriz o *haze* corneal (10). Por otro lado, los modelos *ex vivo* de conejos tienden a ser más parecidos a la córnea humana, pero las diferencias anatómicas, de tamaño principalmente hacen que sean modelos utilizados en menor manera.

Debido a la similitud que existe entre las proporciones anatómicas del globo ocular del cerdo común (*Sus scrofa domestica*) y la facilidad de obtención de estos globos oculares provenientes generalmente de mataderos para consumo humano, éstos se han utilizado como modelos *ex vivo* de múltiples patologías corneales como lesiones epiteliales (6) y también en el estudio de penetración de moléculas con potencialidad terapéutica (17). Castro y colaboradores (18) describieron el desarrollo de un modelo *ex vivo* de cicatrización corneal estromal utilizando ojos de origen porcino realizando una lesión mecánica.

1.5 Anatomía ocular comparada de ojo humano con ojo porcino para el estudio de cicatrización corneal

La anatomía ocular del cerdo común es parecida en su mayoría a la anatomía humana, aunque posee también diferencias significativas que, no obstante, no impiden su utilización como modelo de estudio. (10,14) El tamaño del globo ocular porcino varía según la especie, pero en promedio tiene una longitud anteroposterior de 26-27mm; dimensión similar a la del ojo humano sin embargo, el contenido intraocular suele ser un de mayor tamaño en el cerdo (15).

Las características de la superficie ocular porcina son especialmente relevantes para el desarrollo de modelos experimentales de múltiples patologías, la identificación de futuras dianas terapéuticas, y estudios de permeabilidad. Según lo publicado por Crespo y colaboradores (14) la córnea porcina es más gruesa que la humana, con un promedio central de $1,131 \pm 56.3 \mu\text{m}$. La principal diferencia con respecto a la córnea humana, que tiene cinco capas, es que la córnea de cerdo tiene cuatro capas con ausencia de la capa de Bowman (**Figura 3**).

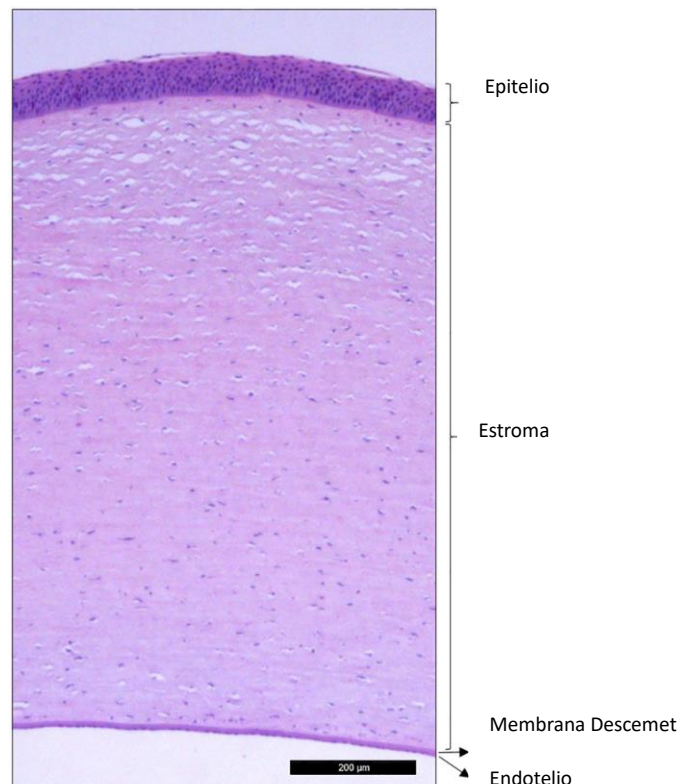


Figura 3: Corte histológico con hematoxilina/eosina de córnea porcina. Nótese su parecido con la córnea humana y su ausente capa de Bowman. Tomado, traducido y modificado de Crespo-Moral M, García-Posadas L, López-García A, Diebold Y (2020) Histological and immunohistochemical characterization of the porcine ocular surface. PLoS ONE 15(1): e0227732.

El epitelio corneal porcino es estratificado, compuesto por entre 6 y 8 capas conteniendo células basales, aladas y superficiales como se presenta en el epitelio de la córnea humana. El resto de estructuras corneales porcinas en torno a la organización de las fibras de colágeno estromal, la membrana de Descemet y el endotelio son similares a la córnea humana. (6,10)

A diferencia de la superficie ocular (SO) humana, se encuentra que los párpados cuentan con un tercer párpado llamado membrana nictitante caracterizada por formarse de cartílago y proveer una estructura fibrosa de protección que tiene un movimiento horizontal sobre la córnea y la película lagrimal. (10,11)

Por último, la conjuntiva de la SO del cerdo se compone, al igual que la humana, de células epiteliales estratificadas y de estroma conjuntival. También se divide en tres zonas: 1) conjuntiva palpebral, 2) conjuntiva bulbar y 3) fondos de saco. La organización propia del estroma conjuntival se compone de tejido conectivo laxo con una capa superficial linfoide y una más profunda fibrosa con un alto número de fibroblastos, todo esto es similar a la conjuntiva humana a excepción de la presencia de la membrana nictitante. (6,11)

2. Justificación

Las opacidades corneales representan una importante causa de disminución en la función visual siendo la ceguera corneal la segunda causa de disminución de la visión prevenible o tratable según la OMS. Por ello, desarrollar modelos experimentales de cicatrización corneal es sumamente importante para poder conocer el proceso fisiopatológico de la forma más completa posible y poder así plantear un tratamiento eficaz y seguro que no solo disminuya, sino que también prevenga la aparición de las opacidades corneales. Esto es importante porque una vez se producen estas opacidades la función visual de los pacientes disminuye severamente y suele ser su único tratamiento el trasplante de córnea, lo que supone una barrera más en el manejo de estos pacientes principalmente por la ya conocida escasez de tejidos para ser trasplantados.

El uso de modelos experimentales se basa principalmente en modelos *in vitro* e *in vivo*, sin embargo, estos modelos poseen sus ventajas y desventajas. Los modelos *in vitro* no representan del todo el proceso completo de cicatrización. Los modelos *in vivo* acarrear planteamientos éticos en el uso de animales para la investigación científica. Es por eso que recientemente los modelos *ex vivo*, han ganado terreno en el ámbito de la investigación preclínica, al ser un punto intermedio entre modelos *in vitro* e *in vivo*, y contar con las ventajas de ser modelos tridimensionales relevantes con un costo generalmente no tan elevado. No obstante, los modelos *ex vivo* también muestran limitaciones y retos, principalmente en el mantenimiento a largo plazo de la viabilidad del tejido. En relación a la cicatrización estromal que produce una opacidad corneal, este es un proceso complejo que conlleva múltiples etapas; específicamente las opacidades corneales secundarias a cirugía refractiva han sido ampliamente estudiadas a través de modelos experimentales pero que comúnmente utiliza láseres ablativos de la córnea que son costosos y no fácilmente accesibles. Es por esto que el desarrollo de un modelo *ex vivo* de cicatrización corneal estromal a través de formas manuales de resección de tejido y reorganización de fibras de colágeno, que son los puntos clave en el proceso de cicatrización corneal, se vuelve fundamental para considerar futuros abordajes preventivos y terapéuticos.

3. Hipótesis

Es posible desarrollar un modelo experimental de cicatrización y opacidad estromal corneal *ex vivo* utilizando ojos de origen porcino que sea útil para dilucidar el proceso de fibrosis estromal corneal.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

- 4.1.1 Desarrollar un modelo *ex vivo* de cicatrización y opacidad estromal corneal utilizando ojos de origen porcino.

4.2 Objetivos Específicos

- 4.2.1 Mantener un modelo *ex vivo* de ojos de cerdo por 7 días que sea capaz de reproducir algunas características propias de la cicatrización estromal corneal.
- 4.2.2 Realizar una disrupción de las fibras de colágeno corneal, a través de una Queratectomía manual profunda asistida por aire.
- 4.2.3 Utilizar como promotor de la inflamación y la cicatrización la molécula TGF β 1 y comparar su acción en la cicatrización corneal estromal.
- 4.2.4 Realizar un estudio histopatológico y de inmunofluorescencia en el modelo *ex vivo* para determinar las características propias de la cicatrización corneal estromal a nivel histológico.

5. Materiales y métodos

Los experimentos llevados a cabo para el presente trabajo de fin de máster fueron previamente autorizados y se emitió un visto bueno por parte de la Comisión de Investigación del IOBA y, en su caso, del Comité Ético de Investigación Clínica de la UVA. Se siguieron los siguientes pasos ordenados en todos los experimentos realizados.

5.1 Obtención de globos oculares

Se utilizaron globos oculares de cerdo común (*Sus scrofa domestica*) provenientes del matadero local de Valladolid (Justino Gutiérrez S.L, Laguna de Duero, Valladolid) que fueron sacrificados para consumo humano, siendo estos machos o hembras de entre 6 y 8 meses de edad, sin ninguna enfermedad identificable y con un peso comprendido entre 90 y 150 Kg. La enucleación fue realizada por veterinarios adjuntos del matadero.

5.2 Recolección y traslado de los globos oculares

Para la recolección desde el matadero de los globos oculares se utilizó el medio de cultivo DMEM/F12® (Thermo Fisher Scientific, MA, EE UU) el cual se suplementó con 10% de antibiótico y antimicótico Gibco anti-anti® (Thermo-Fisher Scientific, MA, EE UU) que contiene 10,000 unidades/mL de penicilina, 10 µm/mL de estreptomina y anfotericina B 0,25µg/mL. Posteriormente a la recolección en medios y ya en el laboratorio experimental se realizaron dos lavados con iodo povidona al 2% durante dos minutos, seguido de dos lavados con PBS durante 2 minutos, para proceder a la preparación de los globos oculares y la realización del modelo *ex vivo*.

5.3 Preparación de los globos oculares

Una vez lavados los ojos se procedió a la preparación para la experimentación. El primer paso consistió en revisar macroscópicamente los globos oculares para cerciorarse que no tuvieran ningún tipo de defecto epitelial ni opacidad corneal previo a la preparación del modelo. La preparación se realizó en una campana de flujo laminar modelo BSB 4A® (Gelaire, Sydney, Australia), inicialmente con la disección de tejido graso y la realización de peritomía del tejido conjuntival en una circunferencia de 360°, seguida de tenectomía, ambas realizadas con tijera tipo Wescott y pinza Mcpherson (Katena®, NJ, EE UU). Se preservó 1 mm de nervio óptico. Posteriormente los globos oculares se montaron en una superficie específicamente seleccionada para asegurar la estabilidad del modelo.

5.4 Desarrollo de modelo de opacidad corneal estromal

Para el desarrollo del modelo de opacidad corneal estromal se realizó en campana de flujo laminar la trepanación central de 7,5 mm con trépano Barrón (Katena) con succión a una profundidad 500 µm (**Figura 4**). Posteriormente, se realizó la inyección de 4 mL de aire en el surco de trepanación con una aguja hipodérmica de 30 gauge obteniéndose una interfaz de aire-estroma. Luego se realizó una queratectomía manual profunda asistida por aire (QMPA) con cuchillete tipo crescent y pinzas Mcpherson atraumáticas (Katena),

obteniéndose una superficie de resección de tejido que supone la ablación producida por el aire a una profundidad aproximada de 500 μm . Con esto se consigue la remoción del epitelio y el estroma más superficial y la interrupción en el ordenamiento de las fibras de colágeno, los cuales, como ya se ha mencionado, son factores claves para el inicio de la cascada de cicatrización corneal estromal. Para el desarrollo de este modelo se incluyeron los siguientes grupos:

1. globo ocular control sin herida epitelial,
2. globo ocular control con herida epitelial,
3. globo ocular donde se realizó QPMA,
4. globo ocular donde se realizó QPMA y raspado manual (RM) de la superficie residual del estroma,
5. globo ocular combinando QPMA y además agregando el factor TGF β 1 como promotor de la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos,
6. globo ocular donde se combinó QMPA+RM y además se agregó TGF β 1.

El TGF β 1 (Thermo Fisher Scientific) se utilizó a una concentración de 10 ng/ml en los grupos descritos.

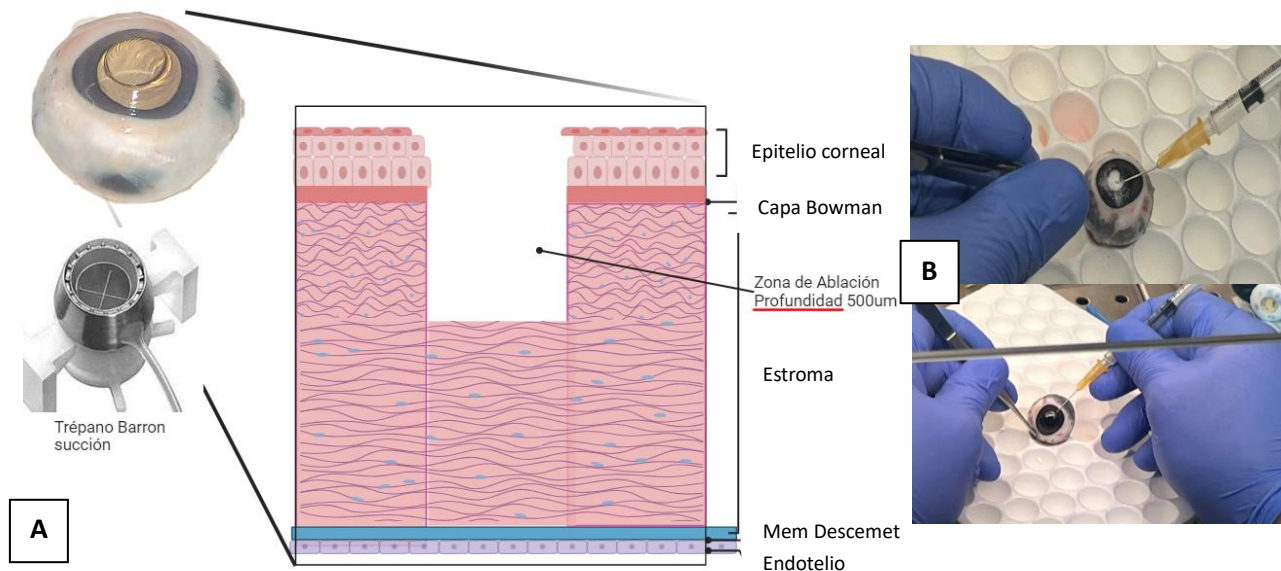


Figura 4: A: Queratectomía Manual Profunda Asistida por aire (QMPA). Se observa el trépano de succión de Barrón de 7, 5mm de diámetro y esquema corneal de la profundidad de lesión estromal. B: Fotografías de la inyección estromal de aire para realizar la interrupción de fibras de colágeno estromal.

5.5 Mantenimiento y evaluación del modelo

Una vez realizado el modelo de cicatrización corneal estromal en los globos oculares y las diferentes condiciones de los mismos se realizó el aislamiento del polo anterior del globo ocular con un corte a 4 mm del limbo esclero corneal colocándose este botón esclero corneal de forma invertida sobre una placa de cultivo con PBS para que la concavidad pudiera ser rellenada con agar – agar al 4% en medio de cultivo DMEM-F12 hasta la gelificación del mismo para mantener la curvatura natural del botón. Luego se

colocaron los botones esclero corneales con su cara anterior hacia arriba, teniendo el gel agar – agar al 4% en la cámara anterior y posterior, en placas de cultivo de 6 pocillos y se añadió medio de cultivo DMEM-F12 hasta alcanzar el limbo. El mantenimiento de los botones esclero corneales se realizó en incubador a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad.

5.6 Evaluación del cierre epitelial y la opacidad corneal estromal

Luego de la realización de los modelos y conjunto al mantenimiento de las condiciones de cada uno de los experimentos se procedió a evaluar cada 24 horas tanto el cierre de la herida epitelial como la opacidad estromal hasta completar 7 días. Para esto se tomaron fotografías seriadas con una cámara profesional Canon EOS550D® (Canon, Tokio, Japón) y se procesaron mediante el software ImageJ versión 1.54f (www.imagej.edu). Para medir el cierre de la herida epitelial se impregnaron los globos oculares con fluoresceína sódica al 2% por 30 segundos y se realizaron las fotografías usando una lámpara de luz con filtro de cobalto (Conóptica®, Barcelona, España). La opacidad corneal se analizó mediante la evaluación de las fotografías seriadas por parte de cuatro observadores independientes utilizando una escala fotográfica (**Figura 5**) previamente descrita en la literatura por Kim y colaboradores (11). Esta escala hace una gradación según son observables las características intraoculares de modo que Grado 0 corresponde a una córnea transparente, Grado 1 corresponde a una leve opacidad difusa que no dificulta ver los detalles del iris y pupila, Grado 2 corresponde a una opacidad moderada que disminuye levemente los detalles del iris y pupila, y finalmente Grado 3 que corresponde a una opacidad grave que no permite observar los detalles del iris y pupila.



Figura 5: Escala fotográfica de opacidad estromal en base a fotografías obtenida del modelo experimental. Tomado, modificado y traducido de Kim, S., Park, Y. W., Lee, E., Park, S. W., Park, S., Kim, J. W., Seong, J. K., & Seo, K. (2015). Air assisted lamellar keratectomy for the corneal haze model. *Journal of Veterinary Science*, 16(3), 349-356.

5.7 Análisis histopatológico y de inmunofluorescencia de los globos oculares

Una vez completado el periodo de mantenimiento de los globos oculares (7 días) se procedió a realizar un estudio histopatológico de los mismos. Se tallaron los globos oculares haciendo un corte sagital sobre el área de tejido donde se realizó la opacidad corneal obteniendo así una sección del espesor corneal a evaluar de cada uno de los globos oculares en las condiciones mencionadas anteriormente. Seguidamente se realizó fijación con paraformaldehído al 4% por 48 horas. Luego, se utilizó un procesador automático de tejidos ASP300® (Leica, Wetzlar, Alemania) con ciclos a temperatura ambiente de 20 minutos en alcohol al 60%, 20 minutos con alcohol al 70%, dos ciclos de 20 minutos con alcohol al 95% y dos ciclos con alcohol al 100%. Finalmente, y manteniendo a temperatura ambiente se realizaron dos ciclos de 20 minutos con alcohol al 100% y xileno, dos ciclos de 20 minutos con xileno y por último cuatro ciclos de 15 minutos, pero con temperatura 60°C con presión y vacío en parafina. Luego de realizar los bloques con parafina, se hicieron cortes de 4-5 μm con microtomo RM2135® (Leica, Alemania) recogiendo las secciones histológicas en un portaobjetos para luego deshidratar dichos cortes y teñir con hematoxilina y eosina (HE), tricrómico de Masson (TM) según protocolo estandarizado de la institución. Se observaron los cortes histológicos luego de ser teñidos en microscopía óptica convencional con microscopio Leica DM400B® (Leica). Para la realización de la inmunofluorescencia se utilizó el anticuerpo alfa actina de músculo liso (α -SMA) de Invitrogen® (Fisher scientific). Luego se observaron los tejidos utilizando microscopio de fluorescencia con el equipo Leica CTR6000® (Leica) y se tomaron 3 fotografías representativas de cada una de las muestras evaluadas en el centro de la córnea a nivel del área de la opacidad.

5.8 Análisis estadístico y presentación de resultados

Se realizaron tres experimentos independientes con las condiciones y grupos anteriormente mencionados. Se presentan los resultados como medias \pm desviación estándar de la media. Se realizó una prueba *t de Student* para medias emparejadas para describir las diferencias en el cierre de la herida epitelial en los diferentes grupos de experimentación; considerando significativos los valores de *p* igual o menores a 0,05. En relación a la opacidad corneal para medir la concordancia en la observación y estadificación entre los 4 observadores se utilizó el coeficiente de Kappa-Cohen ponderado. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Microsoft Excel versión 2022 con el paquete de análisis estadístico, para sistema operativo Windows® (Microsoft Excel, CA, EE UU)

7. Resultados

La **Figura 6** muestra de forma macroscópica los distintos grupos experimentales al cabo de los 7 días del estudio. A continuación, se describen los resultados obtenidos en cuanto al cierre de la herida epitelial corneal y la opacidad estromal desarrollada como parte del modelo.

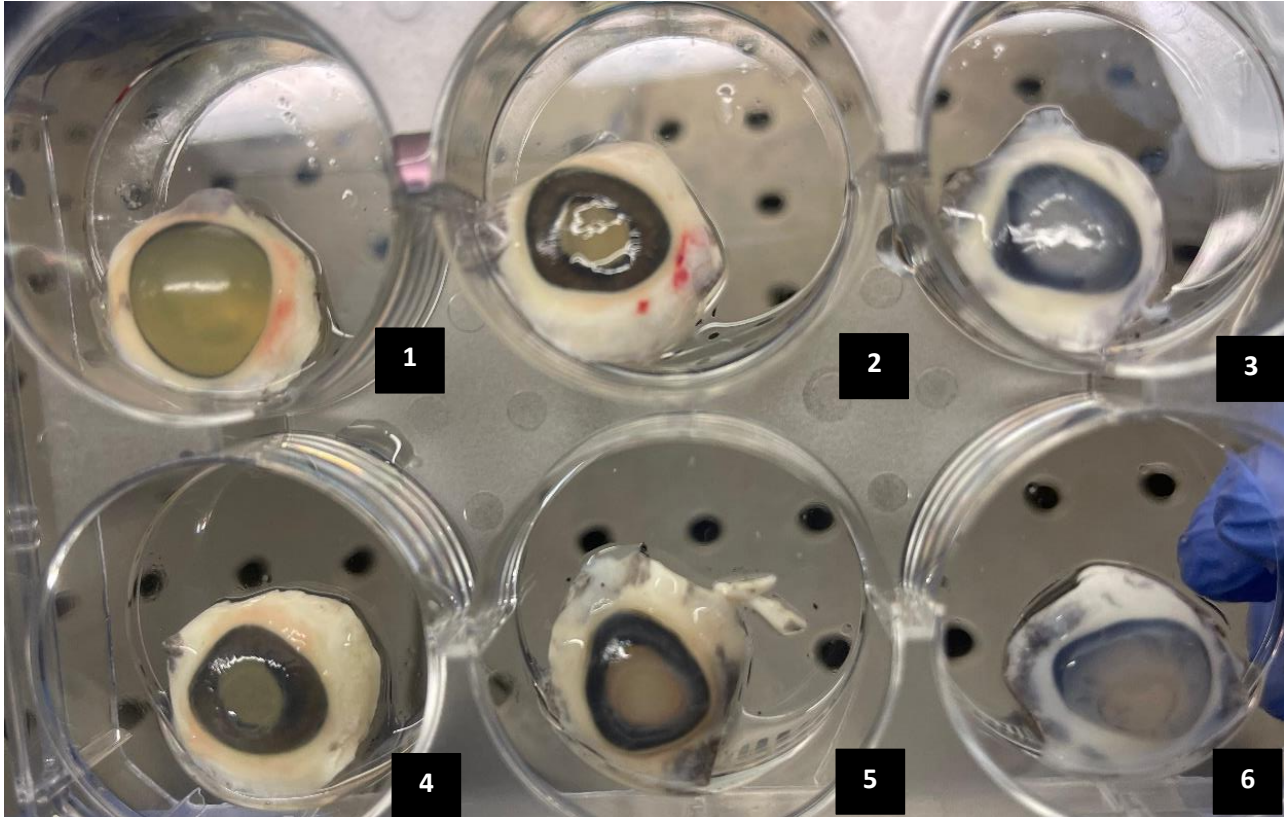


Figura 6: Fotografía macroscópica del experimento de modelo *ex vivo* de cicatrización estromal luego de 7 días. 1: Ojo Control sin herida epitelial, 2: ojo con herida epitelial, 3: ojo con QMPA + TGFβ1, 4: ojo con QMPA, 5: ojo con QMPA+RM, 6 ojo con QMPA+RM+ TGFβ1. QMPA: queratectomía manual asistida por aire. TGFβ1: Factor transformante beta 1. RM: raspado manual.

6.1 Cierre de herida epitelial en modelo *ex vivo* de cicatrización estromal

La cascada de cicatrización estromal que lleva a una opacidad observable inicia con una herida epitelial por lo que se siguió el cierre de la herida epitelial realizada en los diferentes grupos experimentales y controles durante los 7 días del estudio. Se observó una tendencia en el porcentaje de cierre que fue mayor en los grupos controles en contraste con los grupos experimentales (**Figura 7**), esto demostró ser estadísticamente significativo ($p < 0,05$, *t Student*). La evolución del cierre de herida epitelial demostró que el cierre ocurre principalmente en los primeros 2 días y que al cumplirse los 7 días de estudio el modelo, principalmente por desecación, inicia a mostrar defectos epiteliales persistentes tanto en los grupos experimentales como controles. La **Figura 8** demuestra los diferentes grupos y el seguimiento con fotografías del defecto epitelial en los casos de los grupos control y del defecto epitelial y estromal en los grupos experimentales.

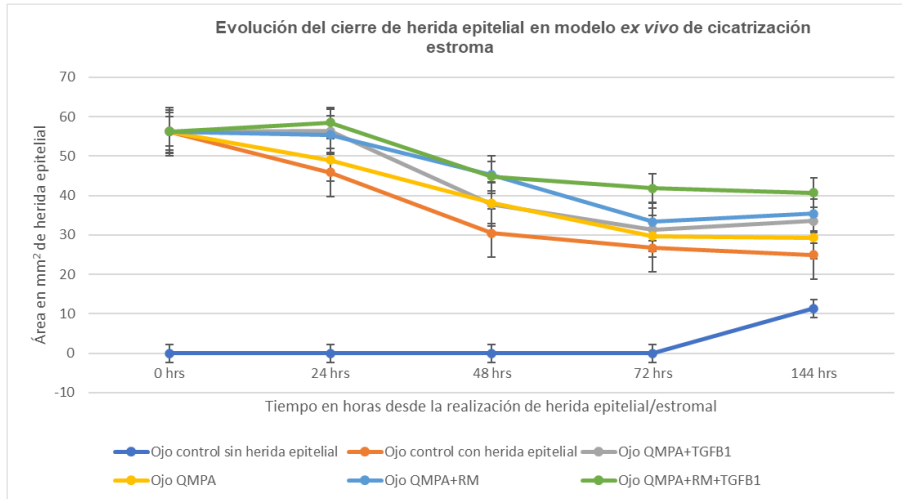


Figura 7: Evolución del cierre medio de herida epitelial en modelo *ex vivo* de cicatrización estromal. Nótese la tendencia al cierre de la herida con el paso del tiempo de mantenimiento del modelo y a partir de las 72 horas inicia un proceso de desecación donde se hacen evidentes defectos epiteliales no observados previamente. QMPA: queratectomía manual asistida por aire. TGFβ1: Factor transformante beta 1. RM: raspado manual

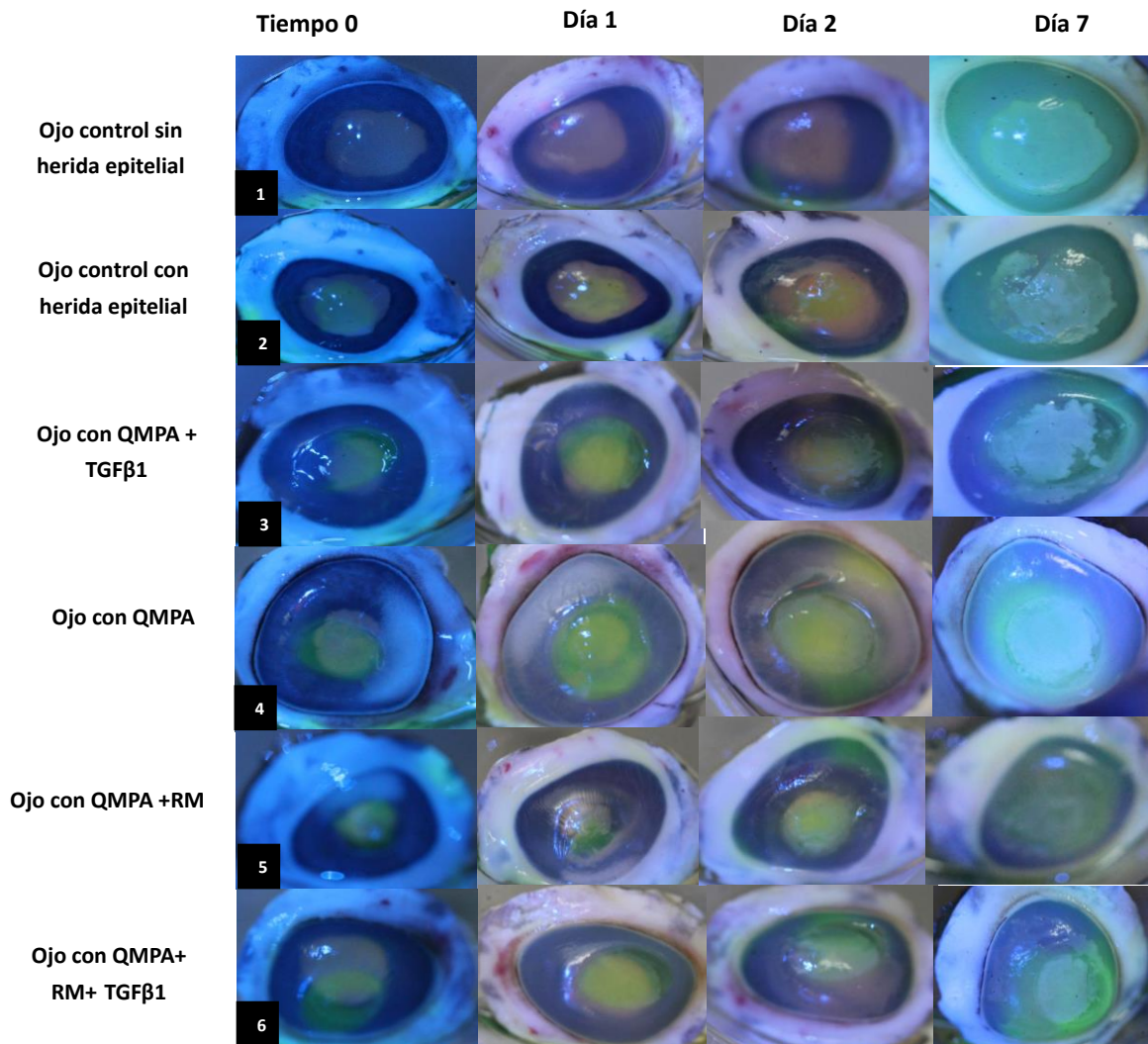


Figura 8: Análisis de la evolución del cierre de herida epitelial en modelo *ex vivo* de cicatrización estromal. Fotografías macroscópicas de un experimento a tiempo 0, 1 día, 2 días y 7 días. 1: Ojo Control sin herida epitelial, 2: ojo control con herida epitelial, 3: ojo con QMPA + TGFβ1, 4: ojo con QMPA, 5: ojo con QMPA+RM, 6: ojo con QMPA+RM+ TGFβ1. QMPA: queratectomía manual asistida por aire. TGFβ1: Factor de crecimiento transformante beta 1. RM: raspado manual.

6.2 Grado de opacidad estromal en modelo *ex vivo*

Se realizó un seguimiento durante 7 días del grado de opacidad estromal en el modelo *ex vivo* de cicatrización estromal desarrollado (**Figura 9**), realizando fotografías seriadas y evaluando por 4 observadores el grado de opacidad corneal según escala nominal descrita previamente.

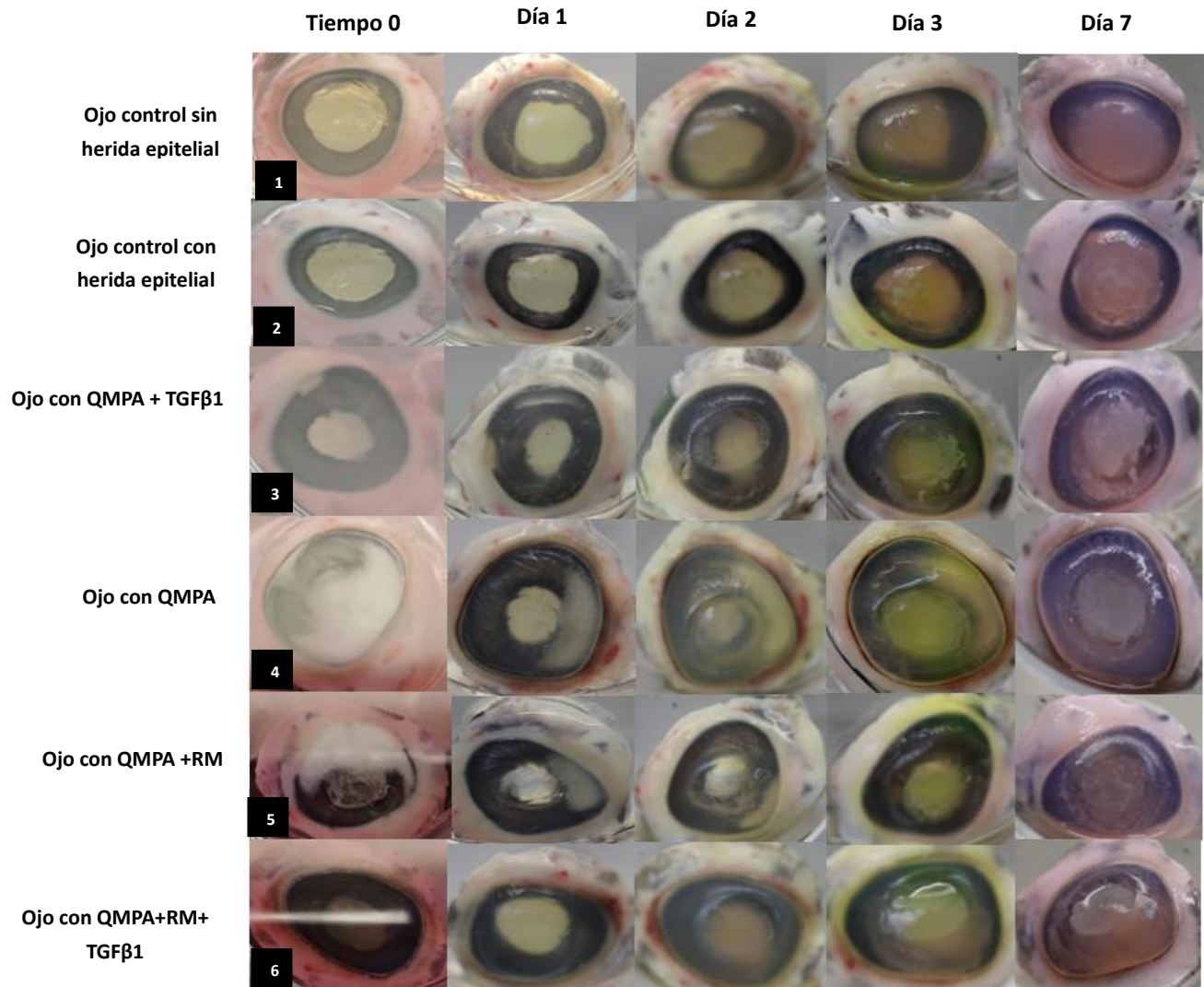


Figura 9: Análisis de la evolución del grado de opacidad corneal en modelo *ex vivo* de cicatrización estromal. Fotografías macroscópicas de un experimento a tiempo 0, 1 día, 2 días, 3 días y 7 días. 1: Ojo Control sin herida epitelial, 2: ojo control con herida epitelial, 3: ojo con QMPA + TGFβ1, 4: ojo con QMPA, 5: ojo con QMPA+RM, 6 ojo con QMPA+RM+ TGFβ1. QMPA: queratectomía manual asistida por aire. TGFβ1: Factor de crecimiento transformante beta 1. RM: raspado manual.

El cálculo del coeficiente de concordancia entre observadores, Kappa-Cohen el cual fue de 0.68 (IC 95% 0,36-0,99) demostró una concordancia aceptable entre lo observado por los examinadores. El porcentaje total de acuerdo entre observadores fue de un 80.56%. Luego del seguimiento de 7 días se observó una tendencia en el aumento de la opacidad corneal formada (Figura 8) con el paso del tiempo. El grado de opacidad estadificado fue mayor en los ojos de los grupos experimentales donde se realizó tanto QMPA y RM ($p < 0.005$) y visualmente mayor donde también se añadió TGFβ1.

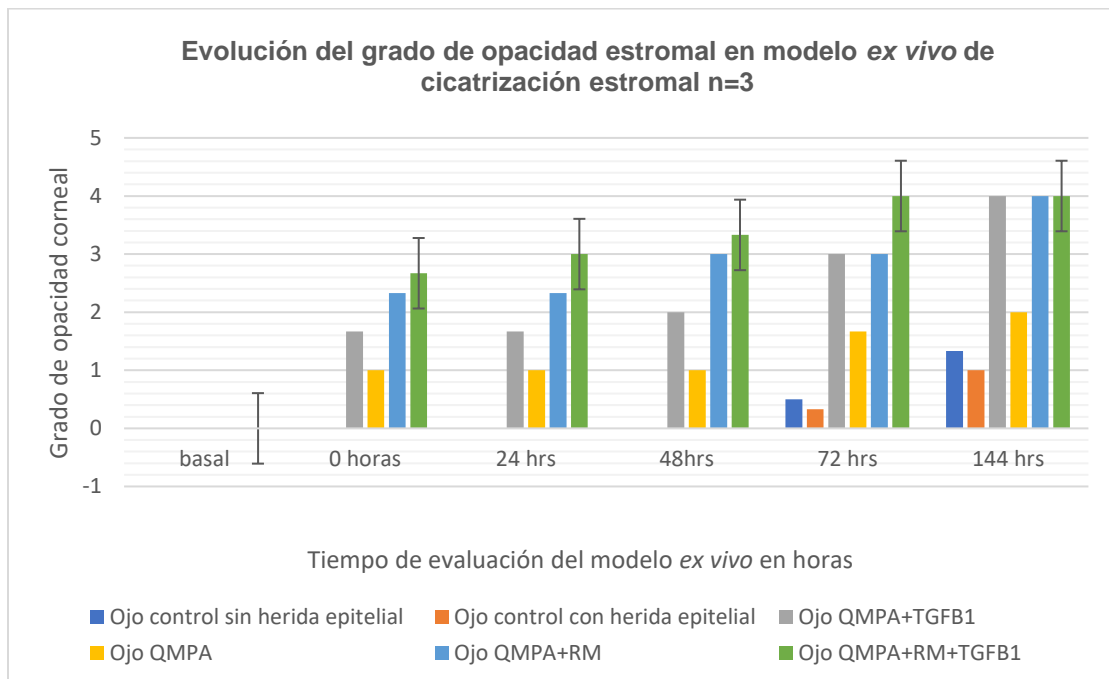


Figura 10: evolución del grado de opacidad corneal en modelo *ex vivo* de cicatrización estromal. Nótese la tendencia al aumento de la opacidad corneal observada con el avance del tiempo y ésta siendo mayor en los ojos del grupo experimental en comparación con los ojos del grupo control. QMPA: queratectomía manual asistida por aire. TGFβ1: Factor transformante beta 1. RM: raspado manual

6.3 Análisis histopatológico y de inmunofluorescencia en modelo *ex vivo* de cicatrización estromal

El análisis histológico de los cortes mostró que el estroma superior a la inyección de aire resultó severamente deformado por las burbujas de aire producidas por la QMPA (**Figura 11 A y B**). La lesión estromal residual luego de la resección del tejido epitelial-estromal superficial demuestra una superficie de ablación no lisa (**Figura 11 C**) donde luego del tiempo del estudio se observa cierta repoblación de células epiteliales y además desorganización de las fibras de colágeno, principalmente en el borde de la lesión realizada. (**Figura 11 D**). Estos hallazgos demuestran la capacidad de la lesión realizada para la ruptura de la anatomía normal de la córnea, el cual es el primer paso en la cascada de cicatrización que conlleva a una opacidad corneal, demostrada en el modelo.

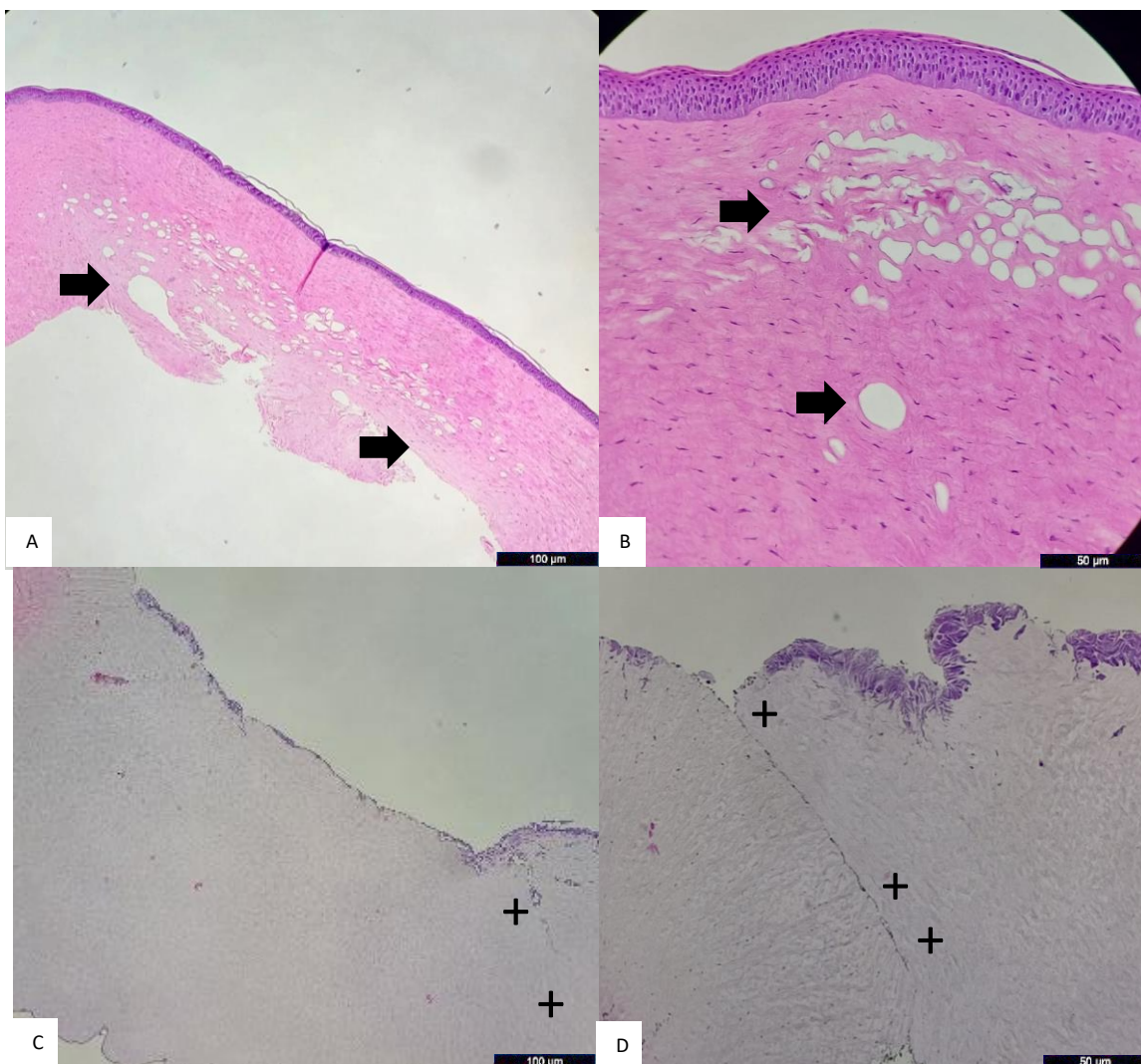


Figura 11. Corte histológico de córnea removida luego de QMPA en modelo *ex vivo* de cicatrización estromal al momento basal con tinción HE. Se nota en **A**: 10x la ruptura de las fibras de colágeno y en **B**: a las burbujas (→) de aire que deforman el estroma corneal superior al plano de inserción de la aguja con aire (40X). **C**: Modelo a los 7 días post lesión donde se muestra la superficie de ablación realizada luego de la resección del tejido mediante QMPA (+) a aproximadamente 500 μm de profundidad (20X). **D**: borde de la lesión corneal (+) realizada a través de QMPA nótese la reorganización desordenada de las fibras de colágeno (40x). QMPA: queratectomía manual asistida por aire.

La morfología de los tejidos se evaluó mediante tinciones de HE y tricrómico de Masson evaluando en el grupo control (**Figura 12**) y en los grupos experimentales donde se realizó QMPA y se colocó TGFβ1 (**Figura 13**). Se evaluó la disposición de las fibras de colágeno luego de la herida (epitelial en controles y estromal profunda en grupos experimentales) y se observó la desorganización de las mismas y producción de matriz extracelular desordenada en el caso de los grupos experimentales, mientras que en los grupos controles se observó una repoblación de la capa epitelial sin desorganización de las fibras de colágeno estromal correlacionado con la presencia de una córnea con mayor transparencia.

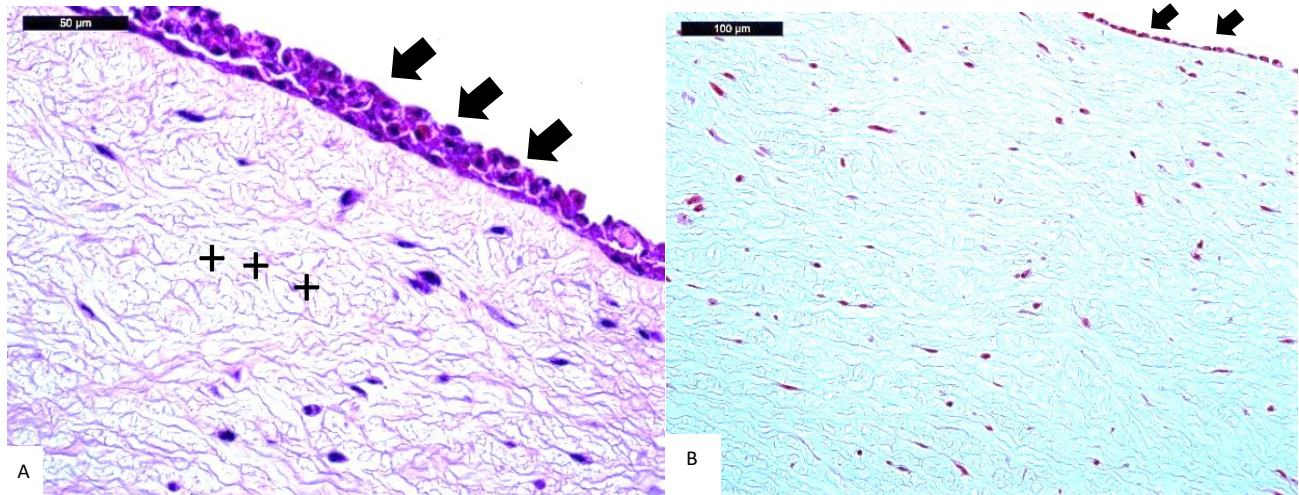


Figura 12. Corte histológico de ojo control con herida epitelial, tinción con HE. **A:** fibras de colágeno paralelas (+) (40X) y **B:** Tinción TM, nótese repoblación (→) de las capas del epitelio corneal y la ausencia de desorganización en las fibras de colágeno estromal, que se mantienen en su configuración paralela normal (20X).

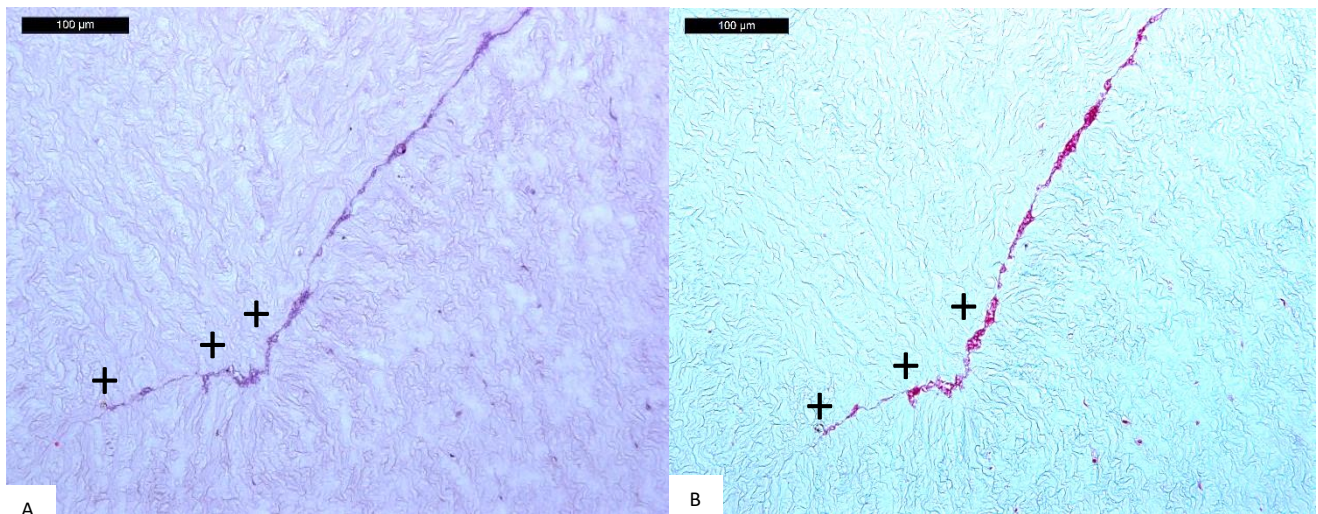


Figura 13. Corte histológico de ojo del grupo experimental donde se realizó QMPA+TGFβ1. **A:** HE (40x) y **B:** Tricrómico de Masson (40X). Nótese ambos cortes la formación de una matriz de fibras de colágeno desorganizada y aberrante (+) que se traduce como una opacidad corneal. QMPA: queratectomía manual asistida por aire. TGFβ1: Factor transformante beta 1.

La inmunofluorescencia realizada con el anticuerpo anti α -SMA demostró positividad en los globos oculares de los grupos experimentales donde se realizó QMPA y RM y también cuando se agregó TGF β 1. Se observa el contraste con el grupo control donde no se aprecia la presencia de este anticuerpo (Figura 13 y 14), lo que demuestra la presencia de miofibroblastos que se han transdiferenciado de fibroblastos como parte del proceso cicatricial.

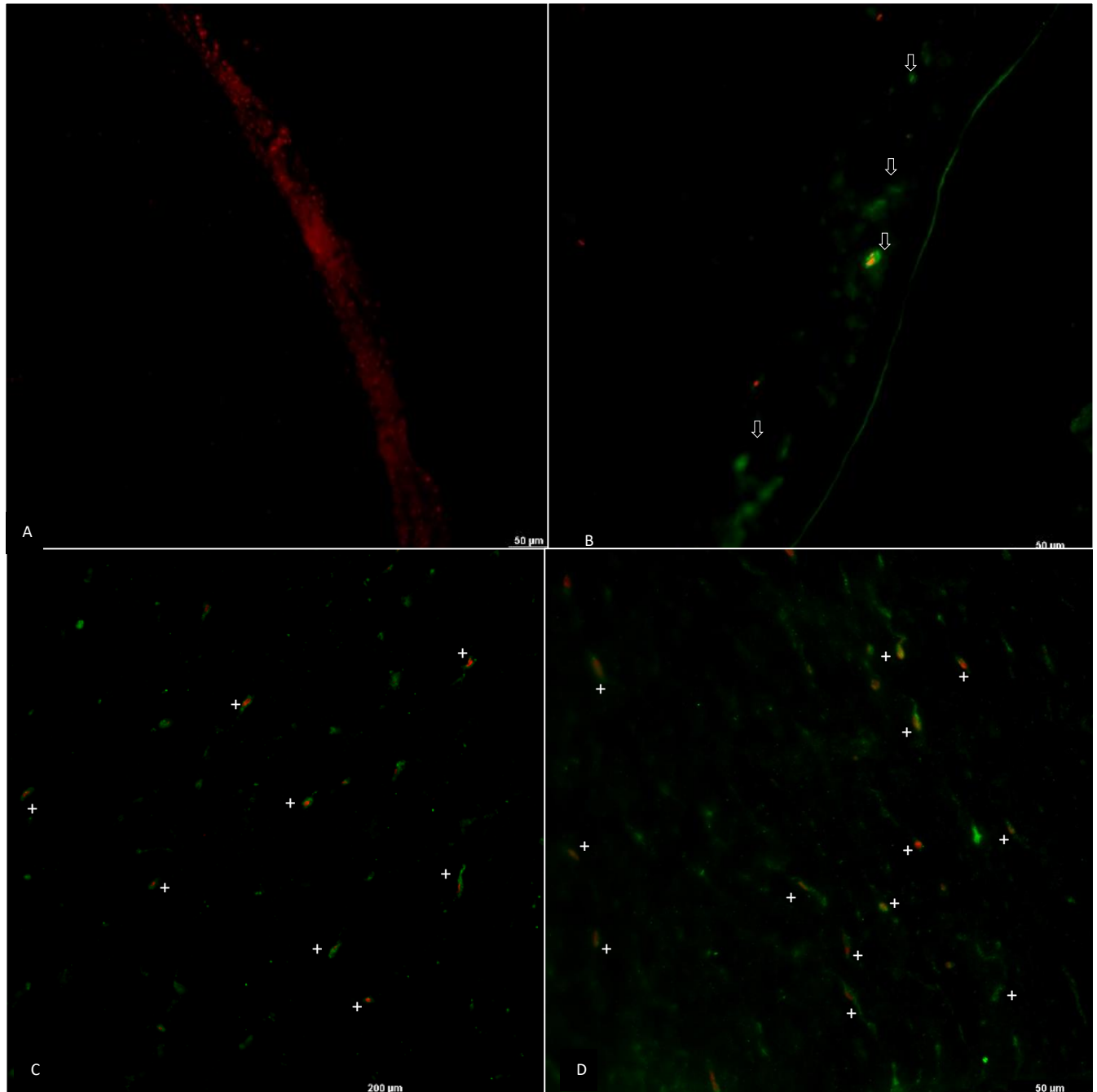


Figura 14. Corte histológico con inmunofluorescencia donde se observa **A:** ojo control con herida epitelial, en rojo se tiñen los núcleos de las células epiteliales corneales (20X). **B:** Se observa en infiltración de miofibroblastos (\rightarrow) debajo del área de ablación luego de QMPA+TGF β 1 a los 7 días del modelo, nótese ausencia del epitelio sobre el área lesionada, se observa en rojo el núcleo y en verde la proteína anti α -SMA (20X) **C:** Estroma profundo subyacente a QMPA+TGF β 1 a los 7 días del modelo de cicatrización estromal, se observan los miofibroblastos transdiferenciados (+) con su núcleo en rojo y la proteína anti α -SMA en verde (20X). **D:** estroma profundo de ojo con QMPA+RM (40X). QMPA: queratectomía manual asistida por aire. TGF β 1: Factor transformante beta 1. α -SMA actina de músculo liso. RM: raspado manual.

La inmunofluorescencia demuestra la forma alargada característica de los miofibroblastos con el núcleo ocupando generalmente un polo de estas células. (**Figura 15 A**). Además, según se observa en la **Figura 15 B**, los vasos sanguíneos del limbo esclero corneal presentan en sus paredes una cantidad abundante de actina de músculo liso que delinea la capa interna de dichos vasos.

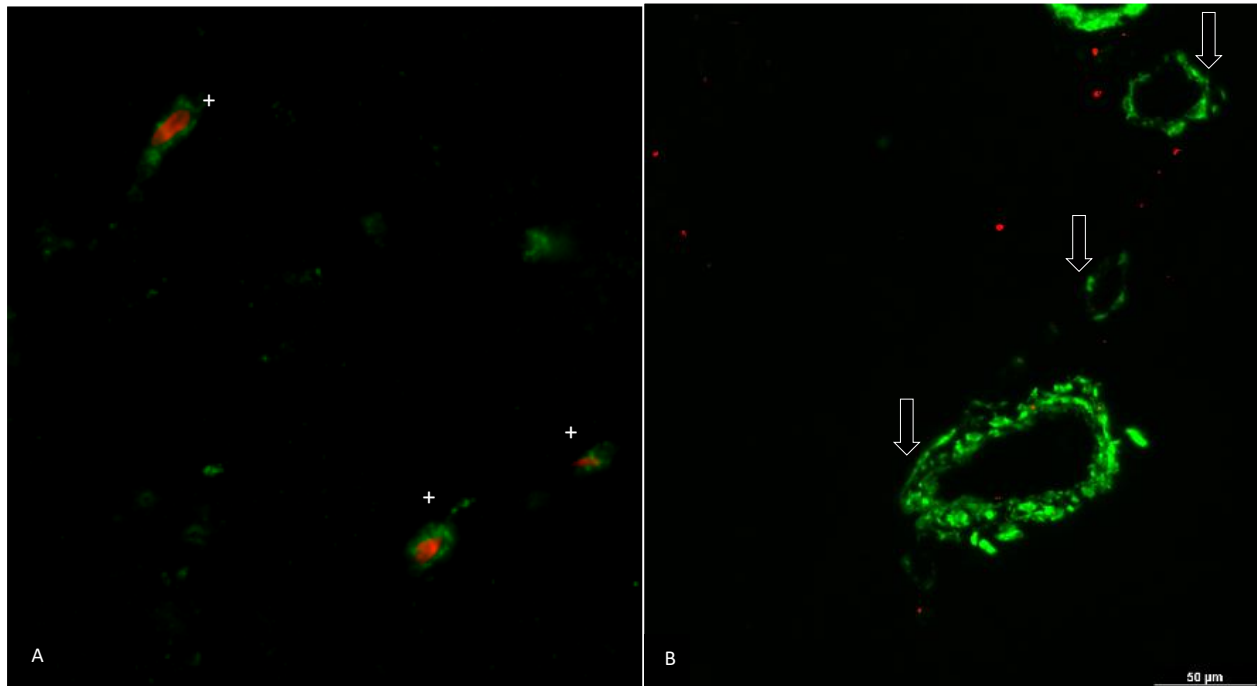


Figura 15. Corte histológico con inmunofluorescencia donde se observa **A**: 40X presencia de miofibroblastos (+) trans diferenciados con su característica morfología y el núcleo teñido en rojo y la proteína α -SMA en verde presentes en el estroma corneal de ojos de cerdo donde se realizó QMPA+RM+TGFB1 a los 7 días del estudio. **B** 40X Presencia de proteína α -SMA a nivel de las paredes de los vasos sanguíneos (flecha) del limbo esclero corneal donde esta es abundante. α -SMA actina de músculo liso.

DISCUSIÓN

La utilización de modelos *ex vivo* en investigación preclínica responde a la necesidad de poder ser un paso intermedio entre los modelos *in vitro* y los modelos *in vivo*, con ventajas propias por su mayor accesibilidad y mejor manejo. Por ello estos modelos son cada vez más utilizados en laboratorios científicos alrededor del mundo. Específicamente en términos de modelos *ex vivo* de patologías de la superficie ocular se han descrito múltiples modelos que buscan representar mecanismos fisiopatológicos con importancia clínica, tales como modelos de cicatrización epitelial (6), modelos de penetración y biodisponibilidad de fármacos (17), modelos de infección corneal (19) y modelos de desecación y ojo seco (20), entre muchos otros.

En el presente trabajo se buscó desarrollar un modelo de cicatrización corneal estromal que pudiera, en un tiempo definido, representar características propias del proceso cicatricial a nivel corneal. Para esto se usó de base el protocolo de recolección, manejo y cultivo *ex vivo* descrito por Crespo y colaboradores (6). En este modelo se utilizaron globos oculares de cerdo común por su facilidad de obtención y su ya conocido manejo, cerciorándose previo al inicio del proceso experimental que los ojos obtenidos no presentaran ninguna lesión epitelial ni opacidad corneal. Está ya caracterizada la SO porcina por el grupo de investigación de superficie ocular del IOBA (14), por lo que su uso es aplicable para desarrollo de modelos *ex vivo*.

Según lo descrito por Gibson y colaboradores. (21) es posible desarrollar un modelo *ex vivo* de cicatrización corneal estromal utilizando globos oculares de conejo y realizando una ablación del tejido estromal con láser excímero para estudiar el proceso que conlleva a una opacidad corneal y específicamente la opacidad luego de una cirugía refractiva. Sin embargo, este modelo se basa en la utilización de equipo médico costoso y poco accesible en laboratorios de investigación. Además, según la legislación tanto europea como española en base al Reglamento (UE) 2017/745, no permite la reutilización de estos equipos en humanos, lo que hace que sea necesario buscar alternativas más asequibles y que puedan ofrecer resultados comparables.

En el presente modelo, se realizó una QMPA tal como lo describió Kim y colaboradores (11) y posteriormente Castro y colaboradores (18) en sus diferentes modelos *ex vivo* de cicatrización corneal. Se realizó de esta forma ya que se sabe que el realizar una lesión profunda a nivel estromal de la córnea iniciará la cascada de inflamación y cicatrización que se da luego de una lesión epitelial con la afectación de la membrana basal epitelial y la disrupción de la capa de Bowman (8). Esta lesión producirá el reclutamiento de células inflamatorias con la liberación correspondiente de citoquinas que finalmente llevarán a la apoptosis y necrosis de los queratocitos, la proliferación de fibroblastos y, específicamente, la transdiferenciación a miofibroblastos. Estos últimos se sabe que producen una matriz extracelular desorganizada, poseen capacidad contráctil y formarán una cicatriz que se traduce en una opacidad corneal. Con el objetivo de acelerar la formación de una opacidad estromal, adicionalmente se utilizó un raspado manual como lesión mecánica para deformar el tejido estromal, ya que según lo descrito por Eckes y cols. (22) los fibroblastos en condiciones de estrés mecánico proliferan, expresan genes asociados a la proliferación y además muestran sobrerregulación en la producción de

mediadores que estimulan el depósito de matriz extracelular. Con ese mismo fin también se expuso el modelo a TGF β 1, un conocido factor estimulador de la aparición de fibrosis añadiéndose TGF β 1 a una concentración de 10 ng/ml según lo descrito por Gallego y colaboradores (23) para promover la transdiferenciación de fibroblastos a miofibroblastos.

Luego de cumplir el tiempo establecido (7 días), se evaluó la opacidad corneal a través de 4 examinadores independientes basándose en la escala descrita por Kim y colaboradores (11) en los distintos grupos experimentales, obteniéndose una concordancia sustancial con un coeficiente un acuerdo del 80,56% entre los observadores, lo que supone esta escala como una manera fiable para estadificar opacidad corneal. La opacidad también puede ser medida a través de OCT de la córnea, sin embargo, este método depende una vez más de equipo costoso y poco accesible por lo que el uso de la escala previamente mencionada supone también la ventaja de su accesibilidad.

El cierre de herida epitelial también se analizó ya que es sabido que existe retraso del mismo luego de una lesión estromal (7). Tal y como se observó el porcentaje de cierre de herida epitelial fue mayor en el grupo control de los ojos donde solo se realizó herida epitelial y fue menor y más retardado en el grupo experimental de QMPA y RM y sobre todo en el grupo donde se añadió TGF β 1. Estos resultados son comparables con lo ya publicado en relación con modelos experimentales *ex vivo* de cicatrización o *haze* corneal (10, 11,12); destacándose una vez más el rol primordial que cumple la integridad del epitelio y su relación con la transparencia corneal.

Por último, y a modo de confirmación de los resultados observados, se realizó un estudio histopatológico y de inmunofluorescencia de los grupos controles y experimentales. En tinción con HE y TM se observó que luego de la herida epitelial, esta se repuebla sin producir cambios a nivel estromal tal y como se ha descrito (6). No obstante, se observó en los grupos experimentales desorganización de las fibras de colágeno y producción de matriz extracelular desordenada que se observa preferiblemente en tinción con tricrómico de Masson (Figura 13B). La positividad a anti α -SMA demuestra la transdiferenciación de los miofibroblastos (11,18), ya que esta proteína citoplasmática no se encuentra en los fibroblastos y es la que le da a los miofibroblastos su capacidad contráctil y por ende la capacidad de formación de una cicatriz estromal.

Si bien el uso de modelos *ex vivo* para cicatrización corneal representa varias ventajas que ya se han mencionado, posee algunas limitaciones. La primera con relación a la duración del modelo más allá de 7 días. Castro y colaboradores (18) reportaron haber mantenido modelos de cultivo *ex vivo* de ojo porcino por 14 días. En nuestro caso, tras de realizar un experimento piloto de viabilidad, se observó que el modelo no era capaz de mantener la estructura principalmente del epitelio corneal más allá de 7 días. Esto limita la utilización del modelo en seguimiento a largo plazo que es justamente lo que ocurre en los pacientes en los que aparece una opacidad luego de cirugía refractiva, pero brinda la posibilidad de poder llevar una prueba de concepto a experimentación en modelos *in vivo* más refinados y donde este seguimiento a largo plazo sí sea posible. Además en este aspecto, el modelo *ex vivo* presentado en este trabajo combina dos tipos de lesiones corneales que han demostrado ser inductores potentes de la cascada de cicatrización

(7,8) tal como lo es la lesión mecánica producido por el raspado manual sobre el estroma corneal y la ablación profunda también del estroma corneal realizada a través de la queratectomía manual, que demostraron en los estudios histopatológicos y de inmunofluorescencia su papel responsable en la formación de una opacidad corneal. Por último, la naturaleza propia del modelo *ex vivo* hace que partes importantes para el mantenimiento de la SO como el humor acuoso, la película lagrimal, el parpadeo, entre otros, no estén presentes lo que también limita su funcionalidad. Es por lo tanto un modelo útil y accesible pero que ofrece información limitada, como cualquier modelo *ex vivo*, pero brinda la base necesaria para poder refinar, reducir y abordar experimentación en modelos *in vivo* de una manera más completa.

Como trabajo a futuro el uso de modelos *ex vivo* supone un cambio en el paradigma de estudio de diferentes patologías de la SO, ya que facilita en gran medida la posibilidad de ampliar y realizar pruebas de concepto que puedan llegar a tener finalidad terapéutica, principalmente en la evaluación de penetración de preparaciones farmacéuticas (17). En el caso concreto del modelo *ex vivo* de cicatrización estromal que se presenta en el actual trabajo es necesario realizar más experimentos con un número mayor de sujetos experimentales para refinar el modelo y que una vez establecida su reproducibilidad pueda ser utilizado para el desarrollo de dianas terapéuticas que prevengan o traten efectivamente la opacidad corneal, principalmente la producida luego de cirugía refractiva.

CONCLUSIONES

1. Se ha podido establecer y mantener por 7 días un modelo *ex vivo* de ojos de cerdo que representa y reproduce características propias de la cicatrización estromal corneal y ha resultado en la formación de una opacidad corneal observable.
2. Luego de la realización de una queratectomía manual profunda asistida por aire y el mantenimiento del modelo de cicatrización estromal se demostró que este método puede reproducir de manera manual y más accesible la desorganización de las fibras de colágeno a nivel estromal que se producen como respuesta a un proceso de cicatrización comparable hasta cierto punto al realizado luego de una cirugía refractiva corneal.
3. La utilización del TGF β 1 demostró promover efectivamente la cascada de cicatrización que se observó en la identificación del proceso de transdiferenciación de fibroblastos a miofibroblastos.
4. El estudio histopatológico en el modelo *ex vivo* determinó características histológicas de cicatrización corneal estromal tales como la formación de una matriz extracelular de fibras de colágeno desorganizada. Además, el estudio con inmunofluorescencia demostró a través de la positividad del anticuerpo anti α -SMA la presencia de miofibroblastos, que junto con los anterior constituyen características propias de la cicatrización corneal estromal que lleva a la producción de una opacidad corneal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tidke, S. C., & Tidake, P. (2022). A review of corneal blindness: Causes and management. *Cureus*, 14(10), e30097. <https://doi.org/10.7759/cureus.30097>
2. Margo, J. A., & Munir, W. M. (2016). Corneal haze following refractive surgery: A review of pathophysiology, incidence, prevention, and treatment. *International Ophthalmology Clinics*, 56(2), 111-125. <https://doi.org/10.1097/IIO.000000000000112>
3. Brar, V, (Ed.). (2023). *2023-2024 Basic and clinical science course™*. American Academy of Ophthalmology.
4. Yanoff M y Duker S, (Ed.). (2019). *Ophthalmology* 5ed. Elsevier.
5. Craig, J. P., Nichols, K. K., Akpek, E. K., Caffery, B., Dua, H. S., Joo, C. K., Liu, Z., Nelson, J. D., Nichols, J. J., Tsubota, K., & Stapleton, F. (2017). TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *Ocular Surface*, 15(3), 276-283. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2017.05.008>
6. Crespo M. (2022). *Desarrollo de un modelo de experimentación tridimensional de cicatrización corneal: facilitando el estudio de nuevos fármacos*. [Tesis de Doctorado, Universidad de Valladolid]. Repositorio Institucional – Universidad de Valladolid.
7. Kamil, S., & Mohan, R. R. (2021). Corneal stromal wound healing: Major regulators and therapeutic targets. *Ocular Surface*, 19, 290-306. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2020.10.006>
8. Ljubimov, A. V., & Saghizadeh, M. (2015). Progress in corneal wound healing. *Progress in Retinal and Eye Research*, 49, 17-45. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.07.002>
9. Yam, G. H. F., Riau, A. K., Funderburgh, M. L., Mehta, J. S., & Jhanji, V. (2020). Keratocyte biology. *Experimental Eye Research*, 196, 108062. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108062>
10. Middleton, S. (2010). Porcine ophthalmology. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 26(3), 557-572. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.09.002>
11. Kim, S., Park, Y. W., Lee, E., Park, S. W., Park, S., Kim, J. W., Seong, J. K., & Seo, K. (2015). Air assisted lamellar keratectomy for the corneal haze model. *Journal of Veterinary Science*, 16(3), 349-356. <https://doi.org/10.4142/jvs.2015.16.3.349>
12. Martínez-García, M. C., Merayo-Llovés, J., Blanco-Mezquita, T., & Mar-Sardaña, S. (2006). Wound healing following refractive surgery in hens. *Experimental Eye Research*, 83(4), 728-735. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2006.02.017>
13. European Union. (2010). Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union*, L276, 33-79. Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32010L0063>
14. 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>

15. Sanchez, I., Martin, R., Ussa, F., & Fernandez-Bueno, I. (2011). The parameters of the porcine eyeball. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 249(4), 475-482. <https://doi.org/10.1007/s00417-011-1617-9>
16. Janin-Manificat, H., Rovère, M. R., Galiacy, S. D., Malecaze, F., Hulmes, D. J., Moali, C., & Damour, O. (2012). Development of ex vivo organ culture models to mimic human corneal scarring. *Molecular Vision*, 18, 2896-2908.
17. Morofuji, R., Kudo, K., Honda, T., Kinugasa, S., Matsuo, T., & Okabe, K. (2024). Enhancing corneal drug penetration using penetratin for ophthalmic suspensions. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 47(5), 1033-1042. <https://doi.org/10.1248/bpb.b24-00077>
18. Castro, N., Gillespie, S. R., & Bernstein, A. M. (2019). Ex vivo corneal organ culture model for wound healing studies. *Journal of Visualized Experiments*, (144), 10.3791/58562. <https://doi.org/10.3791/58562>
19. Ubani-Ukoma, U., Chauhan, A., Schultz, G., & Gibson, D. J. (2020). An ex vivo cornea infection model. *MethodsX*, 7, 100876. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.100876>
20. Choy, E. P., To, T. S., Cho, P., Benzie, I. F., & Choy, C. K. (2004). Viability of porcine corneal epithelium ex vivo and effect of exposure to air: A pilot study for a dry eye model. *Cornea*, 23(7), 715-719. <https://doi.org/10.1097/01.ico.0000127475.29551.56>
21. Gibson, D. J., & Shultz, G. S. (2013). A corneal scarring model. En R. G. Gourdie & T. A. Myers (Eds.), *Wound regeneration and repair: Methods and protocols. Methods in molecular biology* (Vol. 1037, pp. 277-298). Springer Science+Business Media. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-505-7_16
22. Eckes, B., Zweers, M. C., Zhang, Z. G., Hallinger, R., Mauch, C., Aumailley, M., & Krieg, T. (2006). Mechanical tension and integrin alpha 2 beta 1 regulate fibroblast functions. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 11(1), 66-72. <https://doi.org/10.1038/sj.jidsymp.5650003>
23. Gallego-Muñoz, P., Ibares-Frías, L., Valsero-Blanco, M. C., Cantalapedra-Rodríguez, R., Merayo-Llodes, J., & Martínez-García, M. C. (2017). Effects of TGFβ1, PDGF-BB, and bFGF on human corneal fibroblasts proliferation and differentiation during stromal repair. *Cytokine*, 96, 94-101. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.03.011>
24. Vieira, S. M., Kaymak, U., & Sousa, J. M. C. (2010). Cohen's kappa coefficient as a performance measure for feature selection. In *Proceedings of the International Conference on Fuzzy Systems* (pp. 1-8). Barcelona, Spain. <https://doi.org/10.1109/FUZZY.2010.5584447>

