



Universidad de Valladolid



CULTIVO TRIDIMENSIONAL DE FIBROBLASTOS CORNEALES PORCINOS

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Realizado por:

Juan Carlos Trejo Fernández

Tutora:

Dra. Yolanda Diebold Luque

Valladolid, Septiembre 2014

JUAN CARLOS TREJO FERNÁNDEZ

05/Abril/1988

Avda. Los Álamos 9, 11407 Jerez de la Frontera, Cádiz

0034 666 877950

Trejofernandez88@gmail.com

EXPERIENCIA Y ESTUDIOS

Interno en el Servicio de Oftalmología, 60 horas.

Interno en el Servicio de Cirugía Plástica y Reparadora, 60 horas.

Omori Medical Center– Toho University, Tokyo, 2013

Curso Intensivo de Preparación del Examen MIR, 638 horas.

Curso MIR Asturias, Oviedo, 2012-13

“Medicina Preventiva, Bioestadística y Metodología aplicada a la Asistencia Médica”, 63 horas.

“Actualización en Patología Clínica General”, 99 horas.

“Actualización en Patología Onco-Hematológica”, 75 horas.

“Atención Materno-Infantil”, 60 horas.

“Bases Quirúrgicas de la Asistencia Sanitaria”, 99 horas.

Ilustre Colegio de Médicos de Asturias, Oviedo, 2012-13

Becario Erasmus.

Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Bari, 2010-2011

Alumno colaborador en el Departamento de Bioquímica Médica, Biología Molecular e Inmunología.

Universidad de Sevilla, Sevilla, 2007 - 2009

Licenciado en Medicina, 5400 horas.

Universidad de Sevilla, Sevilla, 2006 - 2012

APROBACIÓN DEL TRABAJO

Este trabajo fue aprobado para su realización por la Comisión de Investigación del IOBA en su reunión del 12 de febrero de 2014, con número de registro 01/2014.

FINANCIACIÓN

Este trabajo ha recibido financiación por parte del proyecto CICYT MAT2010-20452-C03-01 (Ministerio de Economía y Competitividad), titulado “Combinación de hidrogeles biomiméticos y nanopartículas como plataformas terapéuticas avanzadas para enfermedades oculares” (I.P. Dra. Yolanda Diebold Luque).

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, la Dra. Yolanda Diebold, por su paciencia, comprensión, dedicación y apoyo en todo momento; de quien he aprendido el verdadero significado de la integridad científica y docente.

A todos mis compañeros del Grupo de Superficie Ocular, en especial a Mario Crespo, Laura Soriano, Laura García y Antonio López, que me han ayudado y aguantado en todo este tiempo y han sabido enseñarme a sobrevivir en los laboratorios como científico en formación.

“A día de hoy la humanidad sólo es justificable por dos cosas: el arte y la ciencia.”

-Santiago Ramón y Cajal

ÍNDICE

Resumen	8
1. Introducción.....	10
2. Justificación	14
3. Hipótesis y Objetivos	16
4. Material y métodos	18
4.1 Reactivos y equipos	18
4.2 Síntesis de las matrices de fibrina.....	19
4.3 Procesamiento de tejidos y obtención de fibroblastos primarios.....	19
4.4 Cultivo primario de los fibroblastos corneales	21
4.5 Cuantificación de la proliferación del cultivo celular mediante AlamarBlue®	22
4.6 Visualización de células vivas en las matrices	23
4.7 Procesamiento histológico	24
4.8 Visualización y morfología general de las construcciones.....	26
4.9 Tinciones inmunofluorescentes de las construcciones	26
4.9.1 Identificación de fibroblastos: vimentina.....	26
4.9.2 Exclusión de células epiteliales: e-cadherina	26
4.9.3 Demostración de proliferación en la matriz: Ki-67.....	27
4.10 Estadística	27
5 Resultados	28
5.1 Estudio de proliferación	28
5.2 Visualización de fibroblastos.....	30
5.3 Caracterización de los fibroblastos	31
6 Discusión.....	34
7 Conclusiones	38
8 Bibliografía.....	40

RESUMEN

En la actualidad se persigue desarrollar tejidos biomiméticos de cara a su utilización en trasplantes o como modelos experimentales. Una de las dificultades que presenta esta disciplina es el cultivo celular en tres dimensiones, donde es necesaria una matriz o gel que mantenga la disposición espacial de las células sin alterar sus propiedades. Un tipo de matriz utilizado es la matriz de fibrina a partir de fibrinógeno, obtenido por medio de procedimientos industriales o directamente de derivados sanguíneos, como el plasma fresco o el crioprecipitado de plasma.

El objetivo de este trabajo es comprobar que el cultivo de fibroblastos de estroma corneal porcino en matrices de plasma fresco y de crioprecipitado de plasma no afecta a su morfología ni a la expresión de un marcador específico (vimentina). También se pretende comparar la proliferación celular en ambos tipos de matriz. Para el análisis morfológico y caracterización se realizaron varias tinciones: tinción nuclear de Hoechst, tinción de hematoxilina-eosina, e inmunotinciones de vimentina, Ki67 y e-cadherina. Para comparar la proliferación en ambas matrices esta se midió utilizando la prueba del AlamarBlue®, cuyos resultados se compararon utilizando la prueba de *t* de Student.

Las comparaciones entre la proliferación celular en ambas matrices no arrojó diferencias significativas respecto a ningún parámetro estudiado salvo el crecimiento celular neto ($p=0,02$). Las tinciones de Hoechst y hematoxilina-eosina mostraron la disposición tridimensional de las células y la morfología fusiforme normal de los fibroblastos. Las inmunotinciones mostraron positividad para vimentina y Ki67, así como negatividad para e-cadherina, descartándose así una posible contaminación epitelial de los cultivos.

Estos resultados hacen pensar que el cultivo de fibroblastos en matrices no induce cambio en su morfología ni en la expresión del antígeno vimentina, siendo el crecimiento celular mayor en las matrices de plasma fresco que en las de crioprecipitado de plasma. Por eso, estas matrices son adecuadas para el desarrollo de modelos tridimensionales de córnea porcina.

1. INTRODUCCIÓN

Cuando hablamos de investigación en oftalmología hay que tener en cuenta que estamos hablando de realizar investigaciones sobre un órgano con bastantes peculiaridades. En lo que a tejidos se refiere, la superficie ocular es una de las estructuras más difícil de investigar por dos razones principales: lo complejo y especializado de su histología, cuyas estructuras están todas relacionadas y condicionadas por la lágrima, y su pequeño tamaño, que limita el material del que se puede llegar a disponer para investigar (Potop V. y cols., 2009).

En la actualidad la experimentación biomédica tiene que superar muchos obstáculos para poder obtener resultados y productos antes de reportar ventajas reales para el paciente humano. La experimentación con humanos, aun cuando es bajo la tutela ética del código de Núremberg y la declaración de Helsinki, tiene que superar muchas trabas legales y administrativas para poder realizarse. Y, aunque se lleguen a superar esas trabas, hoy en día resulta muy difícil obtener tejidos humanos para las etapas tempranas de la investigación, ya que existe una gran competencia por el acceso a los tejidos provenientes de donaciones. La necesidad de respuesta a este problema es una de las razones por las que se está extendiendo tanto el desarrollo de alternativas al uso de estos tejidos en la forma de modelos experimentales desarrollados *in vitro*.

Una de las disciplinas biotecnológicas que más crecimiento ha experimentado en las últimas décadas ha sido la ingeniería de tejidos cuyo objetivo es la creación, mediante técnicas avanzadas de cultivo celular y el uso de biomateriales, tejidos que puedan imitar las características del tejido encontrado *in vivo*, ya sea para su implante en un organismo o para su uso en investigación a modo de modelo experimental (Berthiaume F. y cols., 2011). El desarrollo de este tipo de modelos es una de las respuestas al problema de la escasez de tejidos humanos dedicados a investigación, ya que proporcionan sustitutos válidos para investigaciones preliminares, como la permeabilidad o toxicidad de fármacos. Con el valor añadido de que, al ser confeccionados en el laboratorio, estos modelos presentan unas características más reproducibles que las que encontramos al experimentar con tejidos *ex vivo* (Pauly A. y cols., 2011).

Una de las técnicas básicas de la que se nutre la ingeniería de tejidos es el cultivo celular en monocapa, que se corresponde con la capacidad de hacer crecer una población de células procedentes de organismos vivos. Esta técnica permite, entre otras cosas, expandir el material obtenido de una muestra reduciendo el número de sacrificios animales o donaciones humanas

necesarias, pero una de las limitaciones principales de esta técnica es la restricción de cultivar un único tipo celular en una distribución bidimensional. Con todo y con eso, el uso de estos cultivos celulares ya ha demostrado su utilidad como modelos experimentales válidos que simulan patologías propias de la superficie ocular (Langford M. y cols., 1980; García-Posadas L. y cols., 2013).

Un escalón por encima del cultivo en monocapa en complejidad y en similitud con el tejido vivo es el cultivo tridimensional, que permite el crecimiento de células en las tres direcciones del espacio dotando al cultivo de una disposición mucho más parecida a la que encontraríamos *in vivo*. Uno de los grandes avances que supone esta variante de cultivo es la posibilidad de combinar varios tipos de células para realizar una construcción histiotípica que emule un tejido conocido del cuerpo. Un ejemplo claro es la construcción de modelos que intentan emular una hemicórnea a base de realizar un cultivo plano de epitelio corneal sobre un cultivo tridimensional de queratocitos que haga las veces de estroma. En la literatura encontramos ejemplos de construcciones de este tipo con utilidad validada como modelos experimentales (Hahne M. y cols., 2011). Además, estudios recientes hacen pensar que cuanto más similar es la disposición del cultivo a la disposición *in vivo*, mejores son las propiedades fenotípicas de las células (Levis HJ. Y cols., 2013). Para el desarrollo de esta modalidad de cultivo es necesaria la utilización de un sistema de andamiaje que sirva de sostén a las células en crecimiento manteniendo la conformación espacial deseada.

A la hora de construir un cultivo celular es muy importante el material sobre el que se van a cultivar las células ya que este tiene que, como mínimo, permitir el crecimiento de las mismas (Barbaro V. y cols., 2009). Para esto, la ingeniería de tejidos bebe del desarrollo de biomateriales, que según sus propiedades van a permitir una gran variabilidad de usos y condiciones diferentes que proporcionarles al cultivo; este gran abanico de opciones puede abarcar desde condicionar la permeabilidad a sustancias durante el cultivo a permitir después el uso del material como medio de administración de las células para terapia (Dutta RC. Y cols., 2009). Existen soportes de muchos tipos y muchos ejemplos de su uso en el ámbito de los tejidos de la superficie ocular. La primera gran distinción es entre soportes de biomateriales sintéticos diseñados en el laboratorio, ya sea en cultivo plano (Martínez-Osorio H. y cols., 2009) o tridimensional (Hahne M. y cols., 2011) o las matrices de biomateriales naturales como son los xenoinjertos decelularizados (Gonzalez-Andrades M. y cols., 2011) o de biopolímeros gelificables *in vitro* como el colágeno (Auxenfans C. y cols., 2009) o la fibrina (Garzón I. y cols., 2014).

Partiendo de la base de que los materiales naturales son, normalmente, más accesibles y baratos que aquellos sintetizados en el laboratorio, la decisión en este último caso se reduce actualmente a elegir entre colágeno o fibrina. Aunque, según la literatura actual, la fibrina tiene propiedades tan provechosas para el cultivo como las que ofrece el colágeno (Grassl ED. y cols., 2002). Además, la fibrina presenta otras muchas propiedades que la hacen especialmente adecuada para el desarrollo de modelos experimentales que emulen los tejidos de la superficie ocular; ejemplo de esto son sus propiedades de plasticidad y elasticidad (Rajangam T. y cols., 2013). Además investigadores del Establecimiento de Tejidos Fundación Clínica San Francisco de León han desarrollado un método para utilizar como fuente de fibrina, y de los factores de coagulación necesarios para que gelifique, derivados de la sangre fresca como son el plasma fresco y el crioprecipitado de plasma (Vuelta E., 2009).

La otra decisión necesaria a la hora de plantearse la realización de un cultivo tridimensional con finalidades organotípicas es el origen de las células que también pueden ser provenientes de líneas inmortalizadas (Hahne M. y cols., 2012) o de obtención primaria directamente de tejido fresco.

Como se comentaba al principio de esta introducción, el acceso a tejidos humanos es algo costoso y muy restringido lo cual obliga a buscar alternativas en líneas celulares inmortalizadas o en el uso de tejidos provenientes de animales con características análogas a los tejidos humanos. Como ejemplos de esta variante encontramos modelos corneales hechos a base de tejidos procedentes de conejo (Alaminos M. y cols., 2006), de perro (Werner A. y cols., 2008), y de cerdo.

Desde hace años, el uso del tejido porcino como material de investigación análogo al humano ha ido aumentando. La legislación española sobre el uso de animales en experimentación, cuya última actualización fue el Real Decreto 53/2013 de 1 de Febrero, contempla como método para la reducción del uso de animales destinados a la investigación el uso de tejidos provenientes de animales de matadero destinados a la alimentación. Por esto, tejidos como el bovino o el porcino se han vuelto más accesibles, despuntándose este segundo por diversas circunstancias como pudo haber sido la restricción del primero cuando aumentó la incidencia de la enfermedad priónica de Creutzfeld-Jakob. Las propiedades del ojo porcino están altamente estudiadas y documentadas (Sánchez I. y cols., 2011). El uso del tejido porcino como prueba para metodologías destinadas a ser implementadas con material humano también es una práctica bien documentada en la literatura actual (Reichl S. y cols., 2003; Hernandez-Verdejo JL. y cols., 2007). Por esto mismo, para la realización de este trabajo, que

pretende servir como validación del protocolo para el cultivo fibroblastos en matrices de fibrina procedentes de derivados sanguíneos, se optó por utilizar células procedentes de tejidos oculares porcinos.

El cultivo de los queratocitos y fibroblastos corneales en el seno de una matriz está mostrando ser factible para la construcción de modelos que impliquen varios tipos celulares (Levis HJ. y cols., 2013; Diebold Y. y cols., 2014). Sin embargo, los fibroblastos son un tipo celular que aunque presentan cierta facilidad para ser cultivados también se caracterizan por cambiar fácilmente su fenotipo por motivos fisiológicos (Dupps WJ Jr. y cols., 2006) o por influencia del sustrato de cultivo (Dreier B. y cols., 2013). Esto hace importante conocer el efecto de la técnica de cultivo y el tipo de matriz utilizado sobre los fibroblastos si se quieren utilizar para el desarrollo de un modelo experimental válido.

En el Grupo de Superficie Ocular del IOBA, el equipo de la Dra. Diebold investiga el desarrollo de modelos de experimentación, fisiológicos y patológicos, que emulen la superficie ocular. Mientras que modelos de conjuntiva utilizando matrices de fibrina procedentes de derivados sanguíneos ya se encuentran en estados más avanzados de desarrollo, habiendo pasado ya al trabajo con células de origen humano (Diebold Y. y cols., 2014); el desarrollo de modelos corneales aún se encuentra en fases preliminares, estudiando por separado el cultivo del epitelio corneal y de los fibroblastos del estroma. En esta línea de trabajo se encuadra este estudio, que pretende validar el cultivo de fibroblastos corneales en matrices de fibrina de cara a que sea utilizado como sustrato para el cultivo de epitelio y, en el futuro, la construcción de modelos histiotípicos de córnea.

2. JUSTIFICACIÓN

La ingeniería de tejidos es una de las disciplinas que más crecimiento ha experimentado en las últimas décadas, auspiciada por los avances en el desarrollo de tejidos biomiméticos. Estas construcciones biotecnológicas permiten la sustitución temporal, parcial o total, del empleo de tejidos de origen animal o humano, ya sean en medicina aplicada o en investigación. Dos de las metas más ambiciosas de esta práctica concreta son el desarrollo de tejidos sintéticos aplicables en el campo de los trasplantes y el desarrollo de modelos *in vitro* válidos que permitan la reducción de la experimentación en seres vivos.

Un paso intermedio entre el cultivo celular y el desarrollo de verdaderos sustituyentes tisulares son las técnicas de cultivo en tres dimensiones, las cuales dan a los cultivos características de disposición espacial, interacciones intercelulares y condiciones microambientales más parecidas a las que se encontrarían en el individuo vivo que en placas de cultivo tradicionales. Para conseguir este efecto se utilizan andamiajes y construcciones de materiales compatibles con la actividad celular, ya sean naturales o de origen industrial.

Siguiendo la línea de trabajos anteriores, en el IOBA se aboga por el desarrollo de técnicas que impliquen materiales de origen natural, buscando siempre las alternativas que conlleven una mejor accesibilidad y un menor coste. Todo esto persiguiendo el objetivo de que lo importante es trasladar el conocimiento adquirido a la práctica clínica, de un modo eficiente para el sistema y económico para el paciente.

El Grupo de Superficie Ocular tiene experiencia en el uso de andamiajes de fibrina como sustento para cultivos celulares que se acerquen a emular los tejidos nativos del globo ocular. Este uso de la fibrina está altamente documentado por grupos externos al IOBA cuando se refiere a fibrina de origen industrial, pero no tanto para la fibrina de origen natural. En concreto, investigadores de este grupo se dedican al desarrollo de modelos experimentales, normales y patológicos, siendo pioneros en el uso de matrices de fibrina natural (proveniente de plasma fresco y crioprecipitado de plasma) para este fin.

Por otro lado, la utilización de células de origen porcino, de fácil obtención y características biológicas similares a las humanas, puede ayudar al desarrollo de modelos *in vitro* complejos. La facilidad con la que se pueden cultivar células de diferentes tejidos oculares que muestra la literatura, las ventajas que presentan estos cocultivos a la hora de emular las condiciones encontradas *in vivo* y la versatilidad de los diferentes biomateriales usados como sustrato para el cultivo apoyan la necesidad de estudios sobre la propia metodología del cultivo en sí.

En conclusión, un mejor conocimiento del comportamiento de este tipo de andamiaje en condiciones de cultivo y de su interacción con las células como población en crecimiento, permitiría desarrollar aún más la técnica de cultivos tridimensionales utilizada en el Grupo de Superficie Ocular mediante la toma de mejores decisiones técnicas que se ajusten en mayor medida a los requisitos de cada proyecto. Todo esto permitiría alcanzar avances más significativos, en este caso, en el desarrollo de modelos para la investigación.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

El cultivo de fibroblastos porcinos en matrices de fibrina derivadas de plasma fresco o de crioprecipitado de plasma no induce cambios en su fenotipo ni altera la proliferación de los mismos.

OBJETIVOS GENERALES

1. Comprobar el efecto del cultivo en matrices de fibrina derivadas de plasma fresco y crioprecipitado de plasma sobre fibroblastos de estroma corneal porcino aislados por digestión enzimática.
2. Comparar la proliferación de dichos cultivos celulares en ambos tipos de matrices.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Visualizar la disposición tridimensional de los fibroblastos de córnea porcinos en cultivo en las matrices.
- B. Comparar la morfología de los fibroblastos en el cultivo tridimensional con aquella de los fibroblastos cultivados en soporte de plástico.
- C. Analizar la capacidad proliferativa de los fibroblastos cultivados en las matrices durante 10 días.
- D. Comparar las tasas de proliferación de los fibroblastos en las matrices, de plasma fresco y crioprecipitado de plasma, con aquellas de un cultivo similar en plástico y entre ellas.
- E. Comprobar si se producen alteraciones en el fenotipo específico de fibroblastos tras 10 días de cultivo en las matrices en estudio.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. REACTIVOS Y EQUIPOS

Para la realización de este proyecto se utilizaron el medio de cultivo DMEM+Glutamax[®], la solución salina tamponada con fosfato (PBS), la penicilina, la estreptomicina, el suero fetal bovino (FBS) y la tripsina de Invitrogen-GIBCO (Inchinnigan, Reino Unido).

El azul Tripán, el reactivo de Hoechst, el tritón X100 y el suero de burro utilizado fueron de la casa Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). Se utilizó el ácido tranexámico de Rottapharm Madaus (Moza, Italia). El reactivo AlamarBlue[®] fue el distribuido por AbD Serotec (Oxford, Reino Unido).

Los preparados iniciales de plasma fresco y crioprecipitado de plasma fueron cedidos en virtud de un convenio de colaboración con el Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León (CHEMCYL), cuyos técnicos se encargaron de su obtención y preparación. Posteriormente, investigadores del Establecimiento de Tejidos Fundación Clínica San Francisco de León, prepararon las matrices.

El anticuerpo primario anti-Ki67 (Ab16667) fue de Abcam (Cambridge, Reino Unido), el anticuerpo primario anti-E-Cadherina (#610181) fue de BD-Biosciences (San Jose, CA, EE.UU.) y el anticuerpo primario anti-Vimentina fue de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE.UU.). Los anticuerpos secundarios anti-rabbit A31573 y anti-mouse A11001 fueron de Invitrogen-Molecular Probes (Eugene, OR, EE.UU.).

Los equipos utilizados para los cultivos fueron de la campana de flujo laminar vertical de seguridad tipo II Gelaire BSB 4^a de ICN Biomedicals, Flow Laboratories (Sidney, Australia) y el incubador de CO₂ Touch 190S de LEEC (Nottingham, Reino Unido).

El espectrofotómetro empleado para las lecturas de proliferación fue el SpectraMax[®] M5 de Molecular Devices Corporation (Sunnyvale, CA, EE.UU.).

El procesador de tejidos Leica ASP300, el microscopio invertido de fluorescencia Leica CTR600 y el microscopio óptico de contraste de fases Leica DM4000 fueron todos de Leica Microsystems (Wetzlar, Alemania).

4.2. SÍNTESIS DE LAS MATRICES DE FIBRINA

Para la síntesis de las matrices de fibrina se utilizó un protocolo puesto a punto anteriormente por los investigadores del Establecimiento de Tejidos Fundación Clínica San Francisco de León, colaboradores en el proyecto coordinado del MINECO que ha financiado este trabajo. Ellos habían comprobado que la concentración óptima de fibrinógeno en la matriz es de 1,5 mg/ml. Se emplearon sendos preparados de fibrinógeno en las formas de plasma fresco, con una concentración inicial de fibrinógeno de 3'75 mg/ml, y crioprecipitado de plasma, con una concentración inicial de fibrinógeno de 4'50 mg/ml. A estos preparados se les añadió medio de cultivo, con o sin células en suspensión, ácido tranexámico y, por último, cloruro de calcio (Tabla 1). La concentración final de fibrinógeno en las matrices ya preparadas con las suspensiones celulares o con el medio sin células fue la óptima (1,5 mg/ml).

Tabla 1. Composición de las matrices de fibrina.

A) Composición de la matriz de plasma (1 ml):	B) Composición de la matriz de crioprecipitado(1 ml):
- 400 µl de preparado de plasma	- 333 µl de crioprecipitado de plasma
- 520 µl de suspensión celular	- 587 µl de suspensión celular
- 40 µl de ácido tranexámico	- 40 µl de ácido tranexámico
- 40 µl de cloruro de calcio	- 40 µl de cloruro de calcio

4.3. PROCESAMIENTO DE TEJIDOS Y OBTENCIÓN DE FIBROBLASTOS PRIMARIOS

Para la realización de este proyecto se obtuvieron fibroblastos de córnea porcinos directamente de ojos porcinos frescos. Para el aislamiento de los fibroblastos se realizaron explantes corneales, carentes de epitelio, que posteriormente se someterían a digestión enzimática para obtener células en suspensión.

Los globos oculares porcinos se obtuvieron del matadero local Justino Gutiérrez S. L. El transporte de los ojos se realizó hasta el laboratorio de cultivos en un medio de cultivo preparado para tal fin (Tabla 2.A). Una vez en el laboratorio, los ojos se limpiaron y desinfectaron. Para esto primero se retiraron con tijeras todos los restos de párpado que quedaban en los globos. Después se lavaron con Betadine® disuelto al 2% en PBS durante 5 minutos, para después dar dos lavados más de 5 minutos en una solución de antibiótico-antimicótico al 1% en PBS.

Con los ojos limpios y desinfectados se pasó a trabajar en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar y se procedió a la extracción de un trozo de tejido estromal corneal (explante) a partir del cual poder aislar los fibroblastos. La retirada del epitelio corneal se realizó antes que el explante. Para ello se colocó cada ojo en uno de los 24 pocillos de una placa de cultivo para inmovilizarlo y se bañó la córnea con alcohol etílico absoluto, se utilizó un trépano de látex para mantener el alcohol sobre la córnea. Tras 30 segundos se retiraba el trépano de modo que el alcohol caía al pocillo y se procedía a retirar el epitelio raspando con un escarificador.

Tabla 2. Medios de cultivo utilizados.

A) Composición del medio para transporte:

- Medio DMEM+Glutamax®
- 1'5 % penicilina (5000 IU/ml) /estreptomicina (5000 µg/ml)
- 1 % fungizona
- 5 % de sacarosa

B) Composición del medio de cultivo para fibroblastos:

- Medio DMEM+Glutamax®
- 10 % suero fetal bovino
- 1 % penicilina (5000 IU/ml) /estreptomicina (5000 µg/ml)

A) Medio utilizado para el transporte de ojos frescos. B) Medio utilizado para el cultivo de fibroblastos.

No fue necesario ningún procedimiento para retirar el endotelio ya que en trabajos anteriores realizados en el laboratorio se observó que el medio de cultivo utilizado para el cultivo de fibroblastos no permite el crecimiento de células endoteliales (Tabla 2.B).

Posteriormente se prepararon explantes a base de recortar con tijeras la parte central de la córnea. Estos explantes fueron lavados nuevamente en la solución de antibiótico-antimicótico usada anteriormente durante 5 minutos.

Para el aislamiento de los fibroblastos, los explantes desepitelizados se colocaron en tubos de centrifuga con una disolución de colagenasa I 2 mg/ml en medio de cultivo para fibroblastos y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Tras la incubación los tubos fueron centrifugados a 1.200 revoluciones por minuto durante 5 minutos. Con los precipitados celulares formados se retiró el medio con colagenasa I y se cambió por medio de cultivo de fibroblastos, en el que se disgregaron los precipitados celulares para obtener los fibroblastos en suspensión.

Una vez obtenida la suspensión de células se procedió a la cuantificación de las células viables obtenidas. Para esto se preparó una disolución de azul Tripán con suspensión de células a una concentración de 4:1. Se colocaron 10 µl de la suspensión en una cámara de

Neubauer y se procedió a contar el número de células en 5 campos distintos. Las células viables se presentaban de un color pálido brillante mientras que las células con defectos en la membrana habían captado parte del colorante y se presentaban de un color azul oscuro. Cada célula contada al microscopio corresponde a 10^4 células/ml de suspensión.

Con esta suspensión de células ya se puede iniciar el proceso de cultivo, colocándola en un frasco o pocillo de plástico y dejando que las células se adhieran o utilizándola para añadir células a una matriz tridimensional.

De los 15 explantes procesados 6 presentaron una concentración de células viables insuficiente para realizar el estudio. Y de los 9 restantes 4 de los cultivos establecidos sufrieron contaminación bacteriana en los primeros días de cultivo, por lo que el estudio final de proliferación se realizó con los fibroblastos obtenidos de 5 ojos. Dos de estos 5 ojos también se utilizaron para los estudios histológicos.

4.4. CULTIVO PRIMARIO DE LOS FIBROBLASTOS CORNEALES

Para la realización de todas las tareas relativas al cultivo de células vivas se trabajó en campana de flujo laminar vertical, utilizando material estéril.

De cada una de las suspensiones válidas se sembraron 25.000 células en 6 pocillos de placas de cultivo de 24 pocillos. De este modo se sembraron células sobre plástico en dos pocillos, células incluidas en 500 μ l de matriz de plasma en otros dos y células incluidas en 500 μ l de matriz de crioprecipitado en otros dos; después de que las matrices gelificaran completamente se añadieron 500 μ l más de medio de cultivo a cada una de ellas. Además se colocaron controles sin células de ambos tipos de matrices.

Se utilizaron dos suspensiones celulares para los estudios histológicos de las que se sembraron cuatro placas. Las placas de cultivo se mantuvieron en incubador a 37°C y 5% de CO₂. El medio de cultivo se cambió cada día los primeros 3 días y después cada 2 días durante el resto del estudio.

La Figura 1 muestra una de las placas utilizadas para este estudio donde puede apreciarse el aspecto de las matrices tras la siembra de las suspensiones celulares.

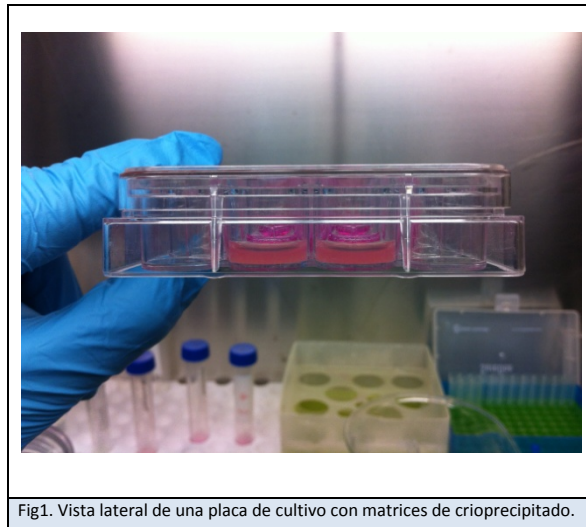
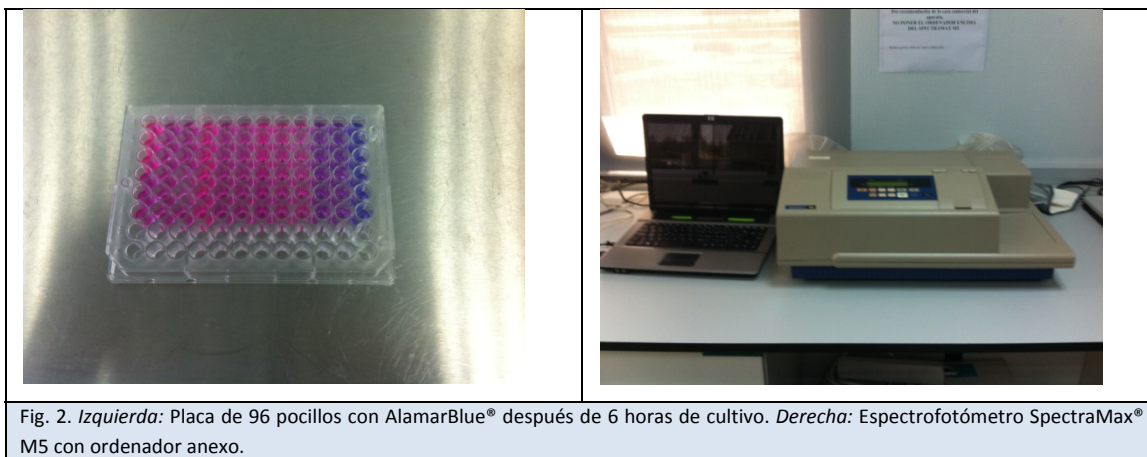


Fig1. Vista lateral de una placa de cultivo con matrices de crioprecipitado.

4.5. CUANTIFICACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DEL CULTIVO CELULAR MEDIANTE ALAMARBLUE®

De las cuatro placas sembradas de cada uno de los cinco ojos incluidos en el estudio se eligió una al azar en la que se mediría la proliferación celular a seis tiempos de la siembra, a saber: a las 24 horas, a las 48 horas, a las 72 horas, a los 6 días, a los 8 días y a los 10 días.

Para la preparación de este experimento se debe trabajar en condiciones de luz tenue ya que la luz ambiente puede afectar a la fluorescencia del reactivo. Se diluyó el reactivo AlamarBlue® en DMEM+Glutamax® sin suplementar, a una proporción de 1:9. Se retiró el medio del cultivo y se cambió por 500 μ l de esta preparación; también se añadieron 500 μ l en un pocillo vacío para que sirviese de blanco. Se cubrió con papel de aluminio y se incubó durante 6 horas. Después se colocaron 300 μ l de cada pocillo en tres pocillos de una placa de 96 pocillos y se procedió a su lectura en el espectrofotómetro (Fig. 2). La fluorescencia del AlamarBlue® reducido por el metabolismo celular es leído por el espectrofotómetro a una longitud de onda de excitación de 560 nm y de emisión de 590 nm. Tras la lectura, el software del espectrofotómetro devuelve un valor en unidades arbitrarias de fluorescencia (uaf) que es proporcional al número de células presentes en el cultivo.



Una vez se ha terminado la lectura, se retira el reactivo del cultivo y se lava varias veces con PBS antes de añadir el medio de cultivo a los cultivos y devolverlos al incubador. Al ser las matrices de fibrina matrices hidratadas siempre queda un poco de reactivo impregnando la matriz por mucho que se lave con PBS; para que este residuo de reactivo fluorescente no influyese en las lecturas posteriores se sometía a los cultivos a un periodo de fotoblanqueo de 20 minutos bajo luz fluorescente antes de la siguiente lectura, de este modo se extinguía la fluorescencia de los residuos de reactivo de la lectura anterior.

Conociendo los valores de fluorescencia de las diferentes lecturas a lo largo del tiempo, y sabiendo que las lecturas se corresponden de manera lineal con el número de células presentes en el cultivo, se pudo construir una curva de crecimiento de los diferentes cultivos, de los cuales se tomaron tres parámetros para comparar entre los dos tipos de matrices. Estos tres parámetros fueron: la cantidad de células de cada matriz con respecto al cultivo en plástico expresada en porcentaje, el área bajo la curva de crecimiento y la pendiente de la curva de crecimiento entre cada dos momentos de lectura.

4.6. VISUALIZACIÓN DE CÉLULAS VIVAS EN LAS MATRICES

Para comprobar la distribución tridimensional de las células dentro de la matriz durante el cultivo se realizó una tinción de núcleos con el reactivo de Hoechst, que no es citotóxico, permitiendo la continuación del cultivo posteriormente. Para la tinción se utilizó una disolución 1:1.000 de reactivo de Hoechst en PBS, se colocaron 200 µl de dicha solución en cada pocillo y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Después se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS y se procedió a su visualización.

Para la visualización de las células teñidas se utilizó un microscopio invertido de fluorescencia con filtro azul cuyo software permite una reconstrucción en 3D del tejido estudiado, mostrando la disposición en varias capas de las células incluidas en la matriz. Para realizar esta reconstrucción el software realiza varias capturas de imágenes mientras mueve la muestra a estudio en el eje vertical, cambiando la altura del foco en la muestra. Posteriormente utiliza una serie de algoritmos matemáticos para interpolar la intensidad luminosa que correspondería al espacio entre las diferentes imágenes tomadas de forma que se crea una imagen tridimensional.

4.7. PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO

Para la visualización y la caracterización de las construcciones preparadas con las matrices y los fibroblastos porcinos, se fijó una placa de cada ojo en 4 momentos distintos: a las 24 horas de la siembra, a las 72 horas, a los 6 días y a los 10 días. Para fijar los cultivos se añadió a los mismos paraformaldehído al 4% y se dejó reposar a 4°C durante 72 horas. Posteriormente las matrices fueron manipuladas y extraídas de la placa de cultivo y vueltas a colocar en una placa de Petri inmersas en paraformaldehído al 4% a 4°C durante 24 horas más (Fig. 3).

Una vez fijadas, las matrices en forma de disco se cortaron por la mitad y se colocaron ambas mitades en un casete de histología para su inclusión en parafina. Para ello se utilizó un procesador de tejidos (Fig. 3) con un programa que consta de: un lavado de 20 minutos con etanol de 60°, un lavado de 20 minutos con etanol de 70°, dos lavados de 20 minutos con etanol de 95°, dos lavados de 20 minutos con etanol de 100°, dos lavados de 20 minutos con etanol de 100° y xileno, dos lavados de 20 minutos con xileno y cuatro baños de 15 minutos con parafina.

Una vez incluidas las muestras en parafina, se montaron en bloques que posteriormente fueron tallados y cortados al microtomo. La disposición de las medias matrices en los bloques se procuró que fuera perpendicular al plano de corte, de modo que en cada corte individual se pudiese apreciar el espesor de la matriz (Fig. 4). De cada combinación de ojo, tipo de matriz y momento de fijación se obtuvieron cuatro cortes de 5 micras de espesor. Estos cuatro cortes se utilizaron para tinción convencional con hematoxilina-eosina e inmunotinciones con anticuerpos frente a vimentina (marcador específico de fibroblastos), e-cadherina (marcador específico de célula epitelial) y Ki67 (marcador específico de proliferación).

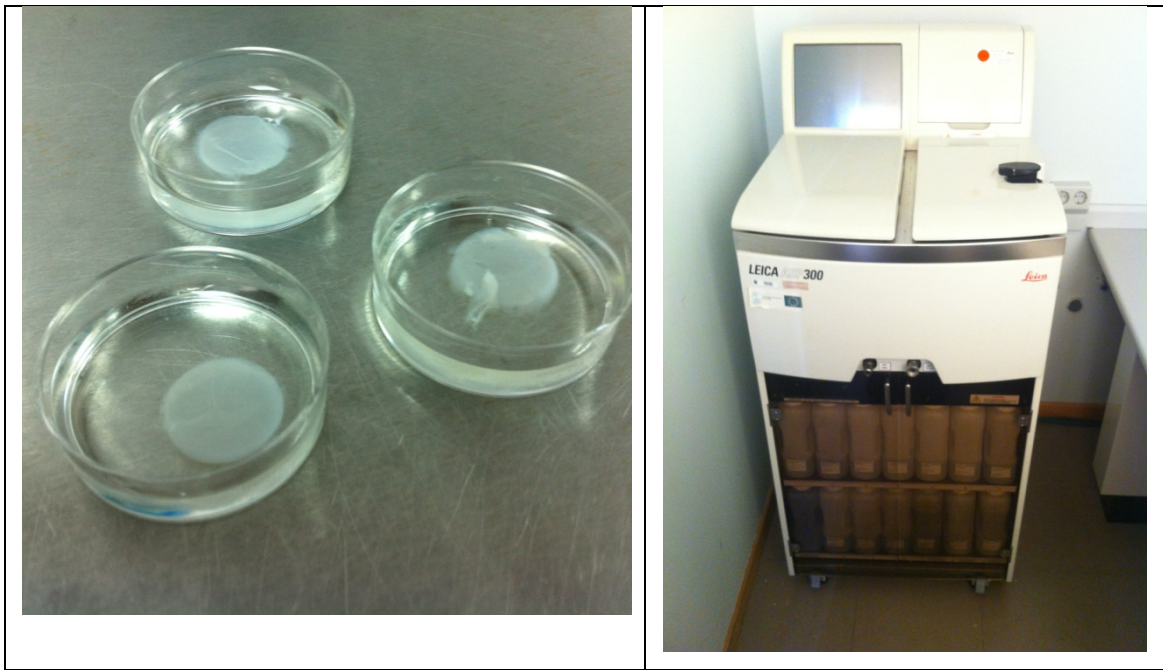


Fig. 3. Izquierda: Matrices de crioprecipitado inmersas en paraformaldehído. Derecha: Procesador de tejidos Leica ASP 300.

Una vez colocados los cortes en portaobjetos se procedió a desparafinarlos e hidratarlos antes de realizar las tinciones. Para ello se utilizó una batería de alcoholes de concentración decreciente. El protocolo seguido consta de: desparafinado con tres baños de 5 minutos en xileno; hidratación con un baño de 5 minutos en etanol de 100º, un baño de 5 minutos en etanol de 96º, un baño de 5 minutos en etanol de 80º y dos baños de 5 minutos en agua destilada.

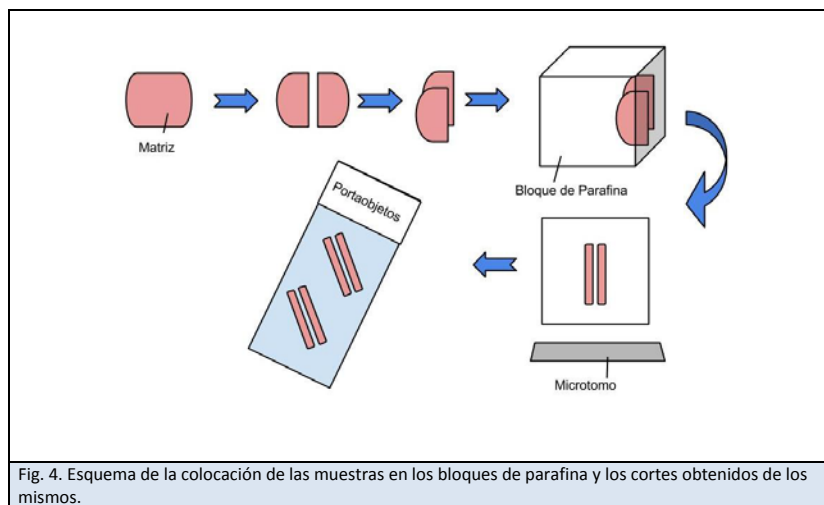


Fig. 4. Esquema de la colocación de las muestras en los bloques de parafina y los cortes obtenidos de los mismos.

4.8. VISUALIZACIÓN Y MORFOLOGÍA GENERAL DE LAS CONSTRUCCIONES

Para la visualización de la morfología de los fibroblastos y el estado de la matriz se utilizó la tinción de hematoxilina-eosina. El protocolo seguido consta de los siguientes pasos: con la muestra ya desparafinada, se tiñó con un baño de 5 minutos en preparado comercial de hematoxilina de Mayer, un lavado de 5 minutos en agua corriente, un lavado de 5 minutos en agua en cubeta, un baño de 2 minutos en etanol de 80º, un baño de 5 minutos en preparado de eosina Y de trabajo, deshidratación con dos baños de 2 minutos en etanol de 96º, dos baños de 2 minutos en etanol de 100º y tres baños de 5 minutos en xileno.

Una vez teñida la muestra se cubrió con medio de montaje de base alcohólica y un cubreobjetos y se visualizó bajo microscopio óptico de campo claro.

4.9. TINCIONES INMUNOFLORESCENTES DE LAS CONSTRUCCIONES

Después de teñir un corte de cada ojo, tipo de matriz y tiempo de cultivo en la misma con hematoxilina eosina, los tres restantes se destinaron a la caracterización mediante inmunofluorescencia. Todas las tinciones de este tipo se realizaron en cámara húmeda y se montaron con medio de montaje de base acuosa antes de colocar el cubreobjetos y proceder a su visualización al microscopio invertido de fluorescencia. Los protocolos utilizados se resumen en la Tabla 3.

4.9.1. IDENTIFICACIÓN DE FIBROBLASTOS: VIMENTINA

La vimentina es una proteína del citoesqueleto celular utilizada como marcador esencial de fibroblastos. Se realizó esta tinción porque la pérdida de la expresión de esta proteína significaría una pérdida de la naturaleza fibroblástica de las células en cultivo.

4.9.2. EXCLUSIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES: E-CADHERINA

La e-cadherina es una proteína de membrana propia de las uniones adherentes de las células epiteliales. La presencia de esta proteína en los cultivos significaría que hay células de estirpe no fibroblástica en el mismo, invalidando los resultados del estudio de proliferación.

4.9.2. DEMOSTRACIÓN DE PROLIFERACIÓN EN LAS MATRICES: KI67

La Ki67 es una proteína nuclear que se expresa en todas las fases del ciclo celular excepto en la G₀ (no proliferativa), por lo que se considera un buen marcador de la proliferación. Observando su expresión en las células del cultivo se puede saber la proporción de las células cultivadas que se encuentran en fase de proliferación activa.

Tabla 3. Protocolos de tinción inmunohistoquímica.	
<p>A) <u>Vimentina y e-cadherina:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Desenmascarar con tripsina al 0'05% en PBS. 10 minutos a 37°C. - Bloquear con suero de burro al 5% en PBS. 1 hora a Tª ambiente. - Aplicar el anticuerpo primario, a concentración 1:100 en bloqueo para mouse anti-e-cadherina y 1:150 en bloqueo para mouse anti-vimentina. Toda la noche a 4°C. - Realizar tres lavados de 5 minutos con PBS. - Aplicar anticuerpo secundario donkey antimouse, a concentración 1:200 para e-cadherina y 1:150 para vimentina. 1 hora a Tª ambiente. - Realizar tres lavados de 5 minutos con PBS. - Contrateñir los núcleos con Hoechst a concentración 1:1000 en PBS. 10 minutos a Tª ambiente. - Lavar con PBS 5 minutos, montar y fotografiar. 	<p>B) <u>Ki67:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Desenmascarar con tripsina al 0'05% en PBS. 10 minutos a 37°C. - Lavar con PBS. 5 minutos a Tª ambiente - Permeabilizar con tritón X100 al 0'5%. 10 minutos a Tª ambiente. - Bloquear con suero de burro al 4% en PBS. 1 hora a Tª ambiente. - Aplicar el anticuerpo primario rabbit anti-Ki67, diluido a concentración 1:50 en bloqueo. 1 hora y 30 minutos a 37°C. - Realizar tres lavados de 5 minutos con PBS. - Aplicar el anticuerpo secundario donkey anti-rabbit, diluido a concentración 1:150 en PBS. 1 hora a Tª ambiente. - Realizar tres lavados de 5 minutos con PBS. - Contrateñir los núcleos con Hoechst a concentración 1:1000 en PBS. 10 minutos a Tª ambiente. - Lavar con PBS 5 minutos, montar y fotografiar.
A) Protocolo para vimentina y e-cadherina, B) Protocolo para Ki67.	

4.10 ESTADÍSTICA

Para el análisis estadístico de los datos y la confección de tablas y gráficas se utilizaron los programas SPSS Statistics 17.0, R i386 3.1.1 y GraphPad Prism 6. Los datos se calcularon como media ± desviación estándar.

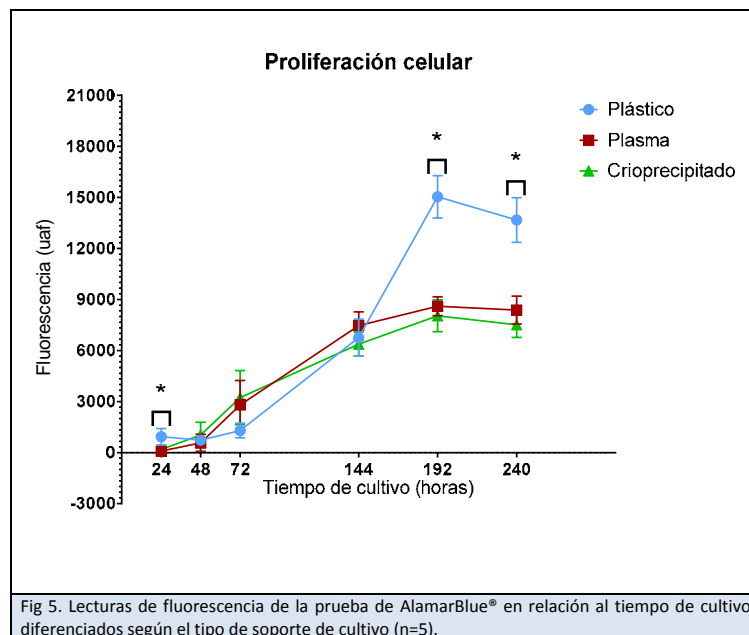
Para la comparación de las poblaciones celulares en cada tipo de matriz en cada momento de lectura, expresadas en porcentaje de la población cultivada en la matriz con respecto a la población cultivada en plástico procedente del mismo ojo, para la comparación del área bajo la curva de crecimiento de observada en cada tipo de matriz y para la comparación de la pendiente de crecimiento entre cada momento de lectura se utilizó el test *t* de Student. La igualdad en las varianzas de las muestras se comprobó mediante el test de Levene.

Se consideraron diferencias significativas cuando $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. ESTUDIO DE PROLIFERACIÓN

Las lecturas de fluorescencia obtenidas de la prueba del AlamarBlue® aparecen representadas en la Figura 4. Como podemos ver, a las 24 horas de la siembra las lecturas obtenidas de las células cultivadas en plástico eran significativamente mayores que aquellas obtenidas de los cultivos en matrices, posteriormente esta diferencia desaparece para reaparecer a las 192 horas (8 días).



Se calcularon tres parámetros: población celular del cultivo (expresado como % con respecto al control en plástico en cada momento puntual de lectura), velocidad de crecimiento (expresado como la pendiente de la curva de crecimiento entre dos lecturas) y crecimiento neto de la población durante el estudio (expresado como área bajo la curva de crecimiento). Los valores medios de estos tres parámetros junto con sus desviaciones estándar están recogidos en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultados de los parámetros relacionados con la proliferación de los fibroblastos en las matrices de fibrina			
Parámetro medido	Matriz	Media ± DE	Valor de p
% de células con respecto a plástico a las 24 horas	Plasma	29,91 ± 6,52	*
	Crioprecipitado	12,32 ± 4,48	0,018
% de células con respecto a plástico a las 48 horas	Plasma	204,98 ± 110,98	0,426
	Crioprecipitado	132,33 ± 89,03	
% de células con respecto a plástico a las 72 horas	Plasma	326,59 ± 180,44	0,809
	Crioprecipitado	286,75 ± 197,32	
% de células con respecto a plástico a los 6 días	Plasma	93,55 ± 21,71	0,508
	Crioprecipitado	108,27 ± 27,64	
% de células con respecto a plástico a los 8 días	Plasma	55,52 ± 9,30	0,637
	Crioprecipitado	58,61 ± 7,08	
% de células con respecto a plástico a los 10 días	Plasma	56,32 ± 7,38	0,426
	Crioprecipitado	59,83 ± 3,28	
Pendiente de la curva de crecimiento entre las 24 y las 48 horas	Plasma	35,28 ± 24,63	0,318
	Crioprecipitado	20,10 ± 17,89	
Pendiente de la curva de crecimiento entre las 48 y las 72h	Plasma	91,73 ± 37,30	0,210
	Crioprecipitado	92,54 ± 42,75	
Pendiente de la curva de crecimiento entre las 72 y las 144h	Plasma	43,66 ± 25,50	0,444
	Crioprecipitado	64,87 ± 20,72	
Pendiente de la curva de crecimiento entre las 144 y las 192h	Plasma	34,79 ± 23,42	0,977
	Crioprecipitado	23,75 ± 17,57	
Pendiente de la curva de crecimiento entre las 192 y las 240h	Plasma	-11,17 ± 23,19	0,679
	Crioprecipitado	-4,74 ± 21,37	
Área bajo la curva de crecimiento	Plasma	9,75 ± 2,36	*
	Crioprecipitado	15,00 ± 2,76	0,020

DE = desviación estándar.

Una vez obtenidas las medias y las desviaciones estándar de cada uno de los parámetros se procedió a la comparación de medias mediante la *t* de Student. Al tratarse de medias se distribuciones de medias muestrales asumimos la normalidad de todas las distribuciones. También realizamos el test de Levene para la comparación de varianzas, el cual no resultó significativo para ninguno de los parámetros estudiados.

Los resultados del test *t* de Student mostraron que no existen diferencias significativas entre los dos tipos de matrices para ninguno de los parámetros estudiados salvo dos: la población celular a las 24 horas ($p = 0,018$) y el crecimiento neto durante el tiempo de estudio ($p = 0,020$), que en ambos casos fueron mayores para los cultivos en las matrices de plasma. Es decir, los fibroblastos cultivados en las matrices de plasma crecieron más en el primer día de cultivo y a lo largo de los diez días de cultivo observados conjuntamente.

5.2. VISUALIZACIÓN DE FIBROBLASTOS

Diariamente durante los diez días de cultivo de las matrices se realizaron observaciones mediante microscopio de contraste de fases de campo claro para controlar la evolución de los cultivos. Durante estas comprobaciones no se percibió ninguna diferencia destacable entre la evolución de los fibroblastos en los dos tipos de matrices. Por otro lado, cabe destacar que las matrices procedentes de crioprecipitado de plasma presentaban una apariencia notablemente más turbia además de numerosos grumos en su estructura.

Al visualizar la tinción con Hoechst (Fig. 6) se puso claramente de manifiesto la disposición en varios niveles de las células suspendidas en la matriz. También se puede ver una mayor fluorescencia en zonas cercanas a la superficie superior del cultivo.

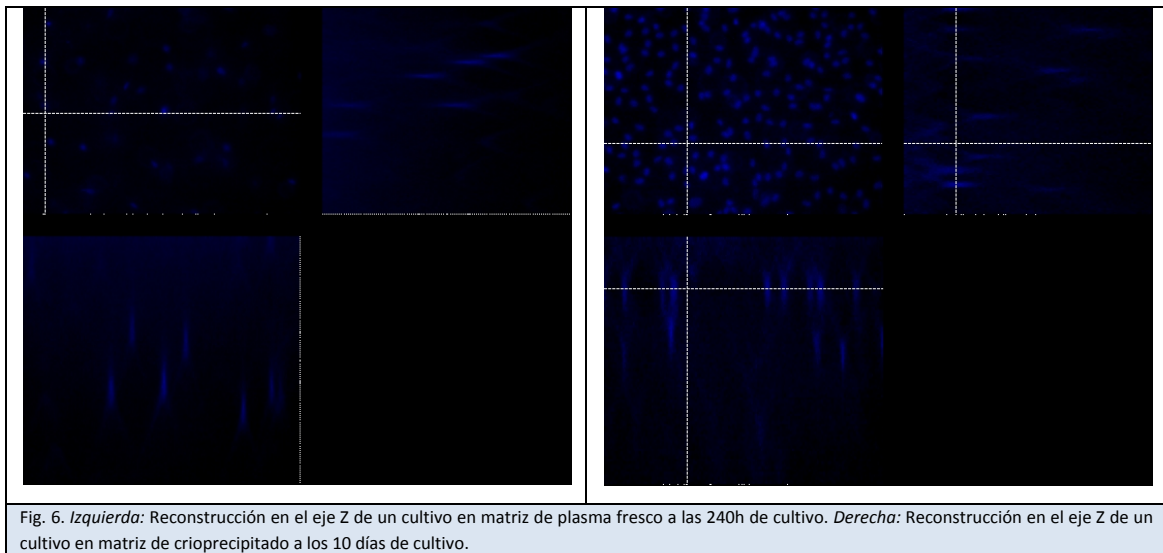
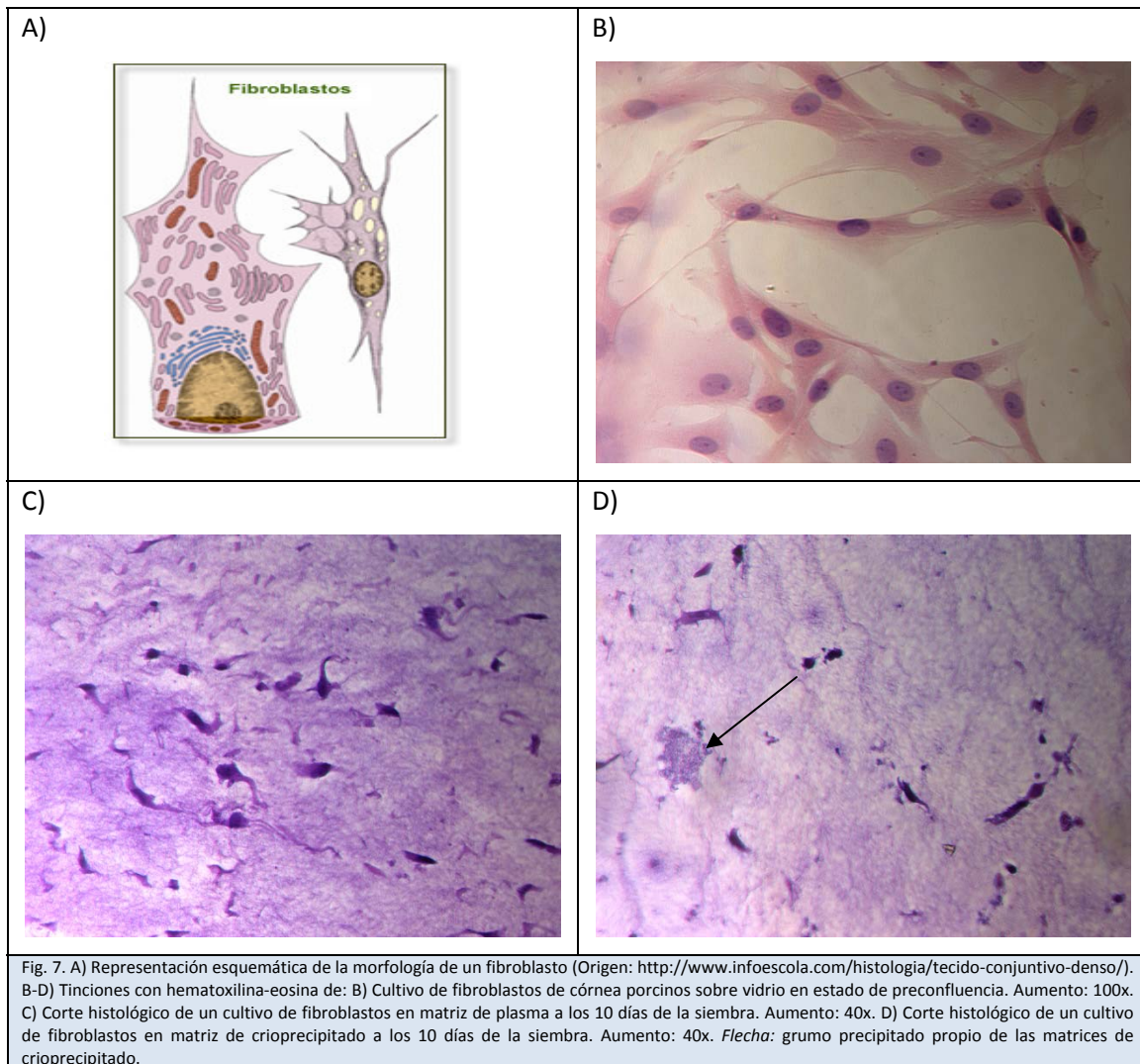


Fig. 6. *Izquierda*: Reconstrucción en el eje Z de un cultivo en matriz de plasma fresco a las 240h de cultivo. *Derecha*: Reconstrucción en el eje Z de un cultivo en matriz de crioprecipitado a los 10 días de cultivo.

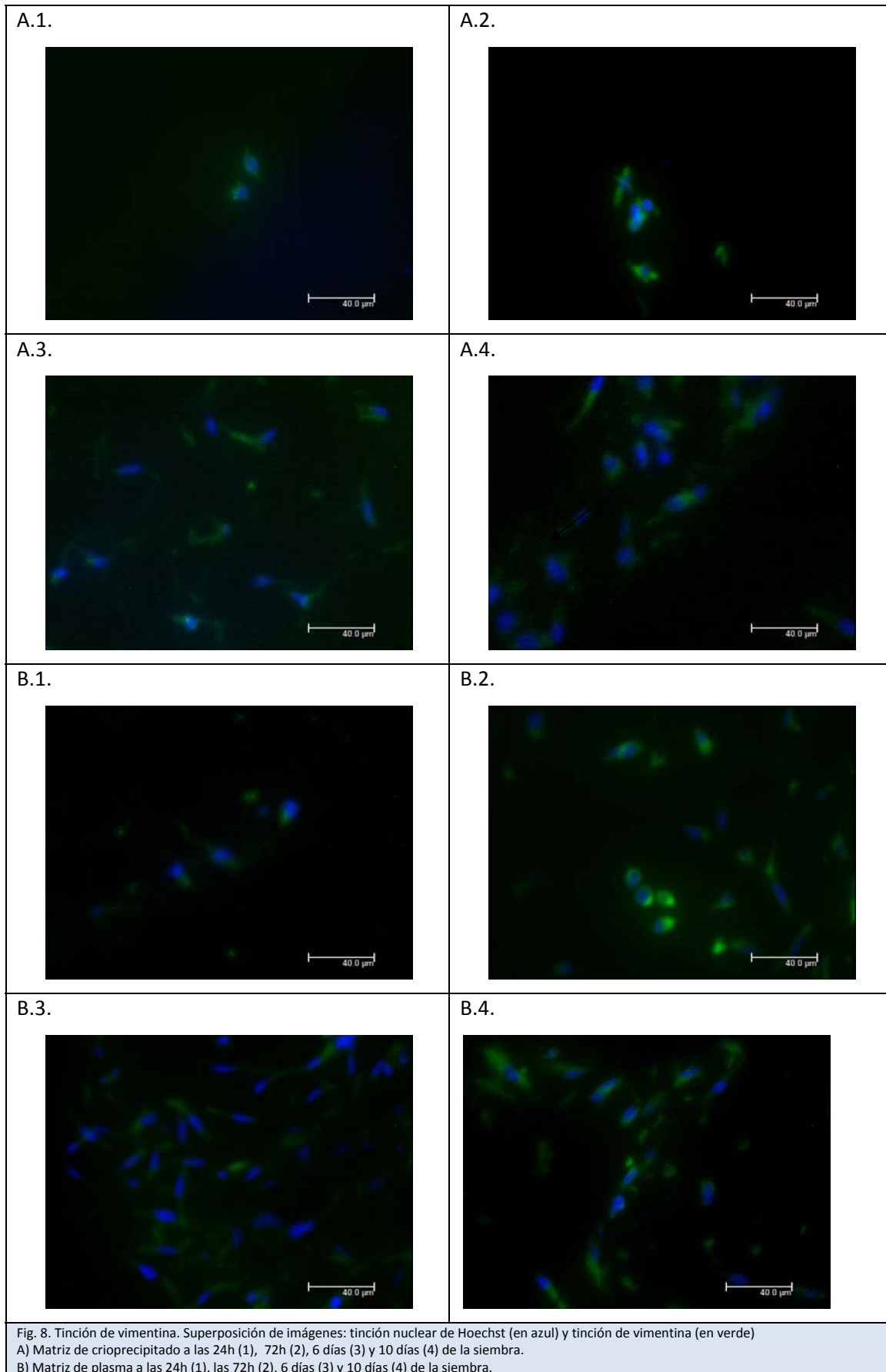
Tanto la morfología fusiforme y rica en prolongaciones característica de los fibroblastos (Fig. 7. A) como la disposición tridimensional dentro de la matriz se pudieron corroborar tras realizarse la tinción de hematoxilina-eosina en los cortes de los tejidos una vez procesados (Fig. 7. B-D). Asimismo también se pudieron observar los grumos presentes en las matrices de crioprecipitado anteriormente descritos (Fig. 7. D).



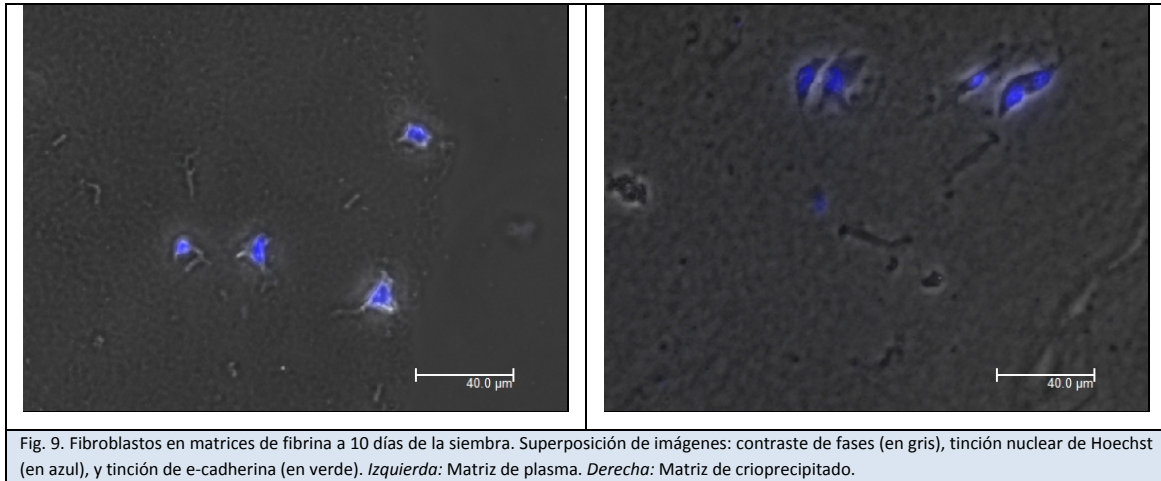
5.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS FIBROBLASTOS

Al observar la tinción de vimentina al microscopio de fluorescencia se comprobó que las células presentes en las matrices, identificadas por la imagen azul correspondiente al núcleo siempre iba acompañada de marcaje específico de vimentina en verde, confirmándonos que la célula en cuestión era un fibroblasto.

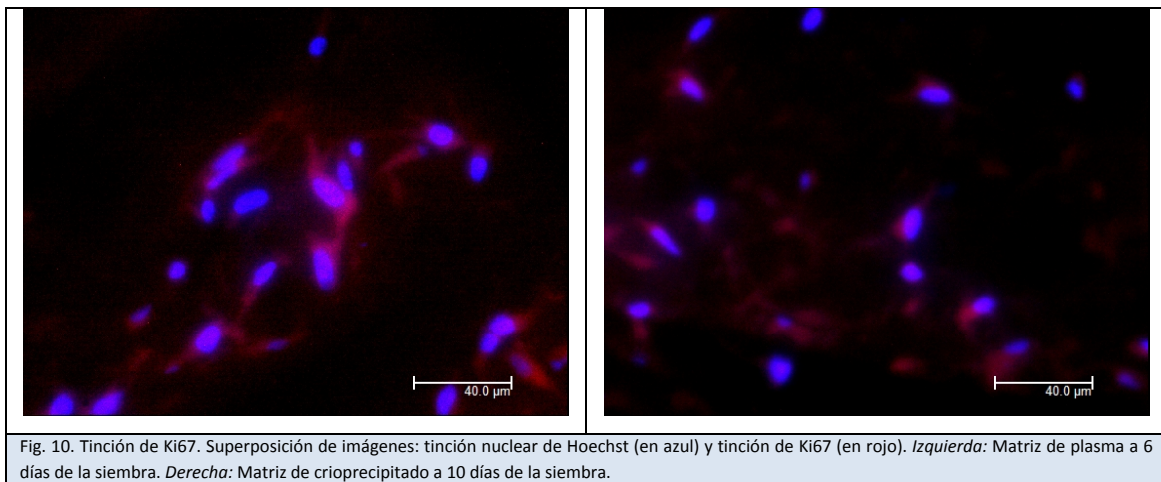
También se observó que la densidad de la población celular aumentaba a tiempos mayores de cultivo, indicando que los fibroblastos cultivados dentro de las matrices estaban proliferando. No obstante, este crecimiento poblacional parecía más acentuado en las matrices de plasma que en las de crioprecipitado (Fig. 8).



Al visualizar la tinción de e-cadherina se observó el azul de los núcleos pero no se identificaron células positivas para esta molécula (Fig. 9), descartándose por lo tanto la presencia de células epiteliales en el cultivo.



Por último, en lo referente a la tinción de Ki67, llama la atención que todas las células presentes en las preparaciones presentasen positividad para esta molécula. Esta correlación fue comprobada en 7 campos de cada una de las preparaciones. Esto indicaría el estado proliferativo de la práctica totalidad de los fibroblastos cultivados dentro de las matrices. Además, se observó mayor positividad en el caso de las matrices de plasma, lo que reforzaría lo observado en la inmunotinción para vimentina.



6. DISCUSIÓN

La ausencia de bibliografía específica sobre estudios similares a éste hace difícil la contrastación de los resultados obtenidos. Los resultados observados en el estudio de proliferación hacen pensar que, aunque no existan diferencias significativas entre el ritmo al que crecen ambas poblaciones celulares incluidas en los dos tipos de matrices a estudio, el crecimiento neto de los fibroblastos de córnea porcinos durante los 10 días que duró el estudio es significativamente mayor en las matrices derivadas de preparados de plasma fresco. Además no sólo muestran las matrices de plasma una diferencia significativa en la proliferación de las células incluidas sino que también se muestran más uniformes a la visualización al microscopio óptico. Esta diferencia hace pensar que, aunque ambas matrices se hayan desarrollado a partir de fibrinógeno sanguíneo, las diferencias en el proceso de síntesis de la matriz pueden afectar a la disposición de las fibras y a las interacciones de las mismas con las células en crecimiento, haciendo interesante el estudio de esta situación por microscopía electrónica de barrido.

Por otra parte, los estudios de caracterización de las células cultivadas en el seno de las matrices nos muestran poca diferencia entre el fenotipo que encontramos en las células en cultivo y aquel que cabría esperar de células similares en condiciones de cultivo sobre plástico, o incluso en organismos vivos. La presencia del antígeno vimentina en todos nuestros fibroblastos nos asegura la naturaleza de los mismos, y la positividad para Ki67 nos confirma su estado de activación; estos dos factores nos permiten asegurar que el protocolo utilizado es válido como método de cultivo. También podemos destacar que tanto esto, como el hecho de que no encontrásemos presencia de epitelio en ninguno de los cultivos nos permite validar asimismo el protocolo de aislamiento del epitelio y digestión de los explantes corneales, protocolo que tampoco se encuentra contemplado en la literatura actual. De todas formas, sería útil realizar estudios similares a este, de proliferación y caracterización, referentes al cultivo de células epiteliales corneales sobre este tipo de matrices de cara a la futura construcción de cocultivos histiotípicos de córnea. De hecho, otros investigadores del Grupo de Superficie Ocular están trabajando en ese aspecto. Y, teniendo en cuenta que en este estudio se ha comprobado el estado proliferativo de los fibroblastos, sería bueno plantear estudios futuros en los que se comprobase el estado funcional de los mismos, por ejemplo comprobando si tienen actividad formadora de matriz extracelular propia. Esto último podría resultar especialmente interesante a la hora de plantear cultivos de más larga duración en la

que los mismos fibroblastos pudiesen verse suspendidos en una matriz segregada por ellos mismos, aumentando así su similitud con el tejido vivo.

Es importante destacar que el hecho de que todas las células observadas fuesen positivas para Ki67, indica que el cultivo en matrices no altera la actividad proliferativa de los fibroblastos en cultivo. Sin embargo, un detalle que hay que tener en cuenta a la hora de valorar la utilización de este protocolo de cultivo es que el uso de suero en el medio de cultivo utilizado para el cultivo de las células y la síntesis de la matriz, induce la activación de los fibroblastos. Este hecho es deseable de cara al cultivo de las células ya que hace más estable su crecimiento y facilita el mantenimiento del cultivo; sin embargo, este no es el estado basal en el que encontramos las células en la córnea *in vivo* (Dupps WJ Jr., 2006), de modo que sería bueno también estudiar las diferencias entre los fibroblastos corneales cultivados en matrices con medio con suero y sin él. Esta diferencia de consideración entre el fibroblasto en su estado activado, el queratocito, o incluso la célula madre del estroma corneal, a la hora de utilizarlos en el desarrollo de modelos experimentales ya se tiene en cuenta en la literatura (Wu J., 2014), aunque no cultivándolos en matrices naturales como son las que se han utilizado en este estudio.

No obstante todo lo anterior, los resultados de este trabajo deben ser interpretados con cautela teniendo en cuenta las limitaciones del mismo.

El primer ejemplo de limitación es la visualización de células vivas mediante tinción con el reactivo de Hoechst. En este caso se observó una mayor presencia de fluorescencia cercana a lo que se correspondería con la superficie superior de la matriz, disminuyendo esta fluorescencia conforme se profundiza. Experiencias previas de nuestro grupo han demostrado que el comportamiento de algunos colorantes y otros reactivos es diferente cuando se trata de preparados de tejidos y de las matrices de fibrina. Estas últimas muestran una tendencia a retener esos reactivos en su superficie, presentando una permeabilidad limitada a los mismos. Por esto último si se quisiera que una cantidad considerable de reactivo llegase a las capas más profundas de la matriz deberíamos aumentar la concentración o el tiempo de exposición a los mismos, lo que conllevaría la saturación de las capas más superficiales dificultando su correcta visualización. Con el Hoechst se han podido visualizar claramente los núcleos celulares y se ha comprobado que las células se disponen a varios niveles de profundidad; sin embargo, no sería correcto afirmar que la distribución de las células es exactamente como la percibimos con esta técnica ya que el hecho de que no se vean núcleos en las capas más profundas puede significar

que realmente no hay células a esa profundidad o, por el contrario, que sí las hay pero no han recibido suficiente tinte como para quedar de manifiesto.

Otro ejemplo estaría relacionado con el estudio de proliferación mediante AlamarBlue®. Esta prueba se basa en las características del resazurín, una sustancia no citotóxica que se introduce en las mitocondrias de la célula donde es reducida por acción del metabolismo celular, cambiando de color en el proceso y adquiriendo fluorescencia. Midiendo esta fluorescencia se puede estimar la concentración de resazurín que ha sido reducido en el tiempo que ha estado en contacto con el cultivo, y con este dato es posible cuantificar el metabolismo celular el cual es proporcional al número de células. Esta técnica está altamente estudiada y ha demostrado gran efectividad frente a otras técnicas de cuantificación que además requieren la finalización del cultivo (Hamid R., 2004). Si bien se están desarrollando métodos específicos para el estudio de la presencia y viabilidad celular en el seno de matrices, estos métodos son aún poco conocidos y requieren unas especificaciones técnicas que sobrepasan con creces las pretensiones de un trabajo como el que nos ocupa, como es la disponibilidad de un microscopio confocal o con tecnología de dos fotones (Dittmar R., 2012). De acuerdo con el conocimiento actual, la técnica escogida es la más apropiada para el tipo de estudio que se quería realizar, aunque haya poco descrito sobre el comportamiento de la misma en lo que a matrices se refiere. Llama la atención observar que las primeras lecturas del AlamarBlue® en matrices toman valores muy bajos o incluso marginalmente negativos, lo cual no tendría sentido. Este paradójico fenómeno podría explicarse por la dinámica de fluidos que se da en el seno de las matrices de fibrina. Las matrices de fibrina son unas matrices con un alto grado de hidratación. Al añadirle a la matriz una disolución, en este caso la preparación con resazurín, parte de esta disolución desplaza al agua de la matriz impregnándola; de este modo la disolución que se recoge para leer al espectrofotómetro tiene una concentración de reactivo ligeramente menor que la que tiene la disolución utilizada como blanco. El estudio de este fenómeno fue dejado fuera de este trabajo por no responder a los objetivos del mismo.

La limitación más importante del trabajo está relacionada con el bajo número de ojos que finalmente se pudieron usar para realizar el estudio, a causa de las contaminaciones bacterianas. Esto tuvo como consecuencia que se realizaron menos experimentos de los planeados inicialmente y se estudiaron menos variables.

Teniendo en cuenta estas limitaciones, se puede interpretar de los resultados obtenidos que efectivamente las matrices de fibrina, especialmente las de plasma fresco, suponen un soporte válido para el cultivo tridimensional de los fibroblastos de córnea porcinos,

permitiendo el crecimiento poblacional del cultivo sin inducir cambios fenotípicos en los 10 días que duró el estudio. Además, esto concuerda con estudios similares llevados a cabo por investigadores del Grupo de Superficie Ocular con fibroblastos conjuntivales humanos sobre los mismos tipos de matrices (Diebold Y., 2014), en los que se llega a la misma conclusión de que las células de estirpe fibroblástica crecen significativamente mejor en las matrices de plasma que en las de crioprecipitado si sufrir cambios fenotípicos.

La futura validación, mediante experimentos complementarios, de este tipo de cultivos como una posibilidad para el sustento de células de estroma corneal porcino abre nuevas posibilidades al desarrollo de construcciones *in vitro* más cercanas al tejido humano y que simulen mejor las diferentes condiciones que encontraríamos en un tejido vivo. Para esto aún habría que realizar muchos más experimentos que comparasen el modelo al tejido *ex vivo*, experimentos que no se han hecho en este tipo de modelos (Seaman CW., 2010) y que puedan garantizarnos que nuestros modelos experimentales son análogos al tejido vivo y, por lo tanto, válidos para investigaciones futuras.

7. CONCLUSIONES

1. Se confirma que es posible cultivar fibroblastos del estroma corneal porcino en matrices de fibrina derivados de plasma fresco o de crioprecipitado, al menos durante 10 días, sin que los fibroblastos pierdan su capacidad proliferativa ni se alteren fenotípicamente.
2. El comportamiento proliferativo de los fibroblastos es significativamente mayor en las matrices de plasma que en las de crioprecipitado, lo que podría ser interesante para modular el crecimiento de estas células según las necesidades experimentales.

8. BIBLIOGRAFÍA

Alaminos M, Del Carmen Sánchez-Quevedo M, Muñoz-Avila JI, Serrano D, Medialdea S, Carreras I, Campos A. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006. Aug;47(8):3311-7.

Auxenfans C, Builles N, Andre V, Lequeux C, Fievet A, Rose S, Braye FM, Fradette J, Janin-Manificat H, Nataf S, Burillon C, Damour O. [Porous matrix and primary-cell culture: a shared concept for skin and cornea tissue engineering]. *Pathol Biol (Paris)*. 2009 Jun;57(4):290-8.

Barbaro V, Ferrari S, Fasolo A, Ponzin D, Di Iorio E. Reconstruction of a human hemicornea through natural scaffolds compatible with the growth of corneal epithelial stem cells and stromal keratocytes. *Mol Vis*. 2009 Oct 17;15:2084-93.

Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng*. 2011;2:403-30.

Langford MP, Stanton GJ. Replication of acute hemorrhagic conjunctivitis viruses in conjunctival-corneal cell cultures of mice, rabbits, and monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1980 Dec;19(12):1477-82.

Deponti D, Di Giancamillo A, Mangiavini L, Pozzi A, Fraschini G, Sosio C, Domeneghini C, Peretti GM. Fibrin-based model for cartilage regeneration: tissue maturation from in vitro to in vivo. *Tissue Eng Part A*. 2012 Jun;18(11-12):1109-22.

Diebold Y, García-Posadas L, Soriano-Romaní L, Arranz-Valsero I, López-García A. Characterization of Human Conjunctival Cells Grown in a 3D-Model. Poster. ARVO. 2014 May.

Dittmar R, Potier E, van Zandvoort M, Ito K. Assessment of cell viability in three-dimensional scaffolds using cellular auto-fluorescence. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012 Mar;18(3):198-204.

Dreier B, Thomasy SM, Mendonsa R, Raghunathan VK, Russell P, Murphy CJ. Substratum compliance modulates corneal fibroblast to myofibroblast transformation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013 Aug 28;54(8):5901-7.

Dupps WJ Jr, Wilson SE. Biomechanics and wound healing in the cornea. *Exp Eye Res*. 2006 Oct;83(4):709-20.

Dutta RC, Dutta AK. Cell-interactive 3D-scaffold; advances and applications. *Biotechnol Adv.* 2009 Jul-Aug;27(4):334-9.

García-Posadas L, Arranz-Valsero I, López-García A, Soriano-Romaní L, Diebold Y. A new human primary epithelial cell culture model to study conjunctival inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013 Oct 29;54(10):7143-52.

Garzón I, Martín-Piedra MA, Alfonso-Rodríguez C, González-Andrades M, Carriel V, Martínez-Gómez C, Campos A, Alaminos M. Generation of a biomimetic human artificial cornea model using Wharton's jelly mesenchymal stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014 Jun 6;55(7):4073-83.

Grassl ED, Oegema TR, Tranquillo RT. Fibrin as an alternative biopolymer to type-I collagen for the fabrication of a media equivalent. *J Biomed Mater Res.* 2002 Jun 15;60(4):607-12.

Gonzalez-Andrades M, de la Cruz Cardona J, Ionescu AM, Campos A, Del Mar Perez M, Alaminos M. Generation of bioengineered corneas with decellularized xenografts and human keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011 Jan 5;52(1):215-22.

Hahne M, Reichl S. Development of a serum-free human cornea construct for in vitro drug absorption studies: the influence of varying cultivation parameters on barrier characteristics. *Int J Pharm.* 2011 Sep 15;416(1):268-79.

Hahne M, Zorn-Kruppa M, Guzman G, Brandner JM, Haltner-Ukomado E, Wätzig H, Reichl S. Prevalidation of a human cornea construct as an alternative to animal corneas for in vitro drug absorption studies. *J Pharm Sci.* 2012 Aug;101(8):2976-88.

Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L, Parikh R, Bullock P. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicol In Vitro.* 2004 Oct;18(5):703-10.

Hernández-Verdejo JL, Teus MA, Román JM, Bolívar G. Porcine model to compare real-time intraocular pressure during LASIK with a mechanical microkeratome and femtosecond laser. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007 Jan;48(1):68-72.

Levis HJ, Massie I, Dziasko MA, Kaasi A, Daniels JT. Rapid tissue engineering of biomimetic human corneal limbal crypts with 3D niche architecture. *Biomaterials.* 2013 Nov;34(35):8860-8.

Martínez-Osorio H, Juárez-Campo M, Diebold Y, Girotti A, Alonso M, Arias FJ, Rodríguez-Cabello JC, García-Vázquez C, Calonge M. Genetically engineered elastin-like polymer as a substratum to culture cells from the ocular surface. *Curr Eye Res.* 2009 Jan;34(1):48-56.

Pauly A, Brasnu E, Riancho L, Brignole-Baudouin F, Baudouin C. Multiple endpoint analysis of BAC-preserved and unpreserved antiallergic eye drops on a 3D-reconstituted corneal epithelial model. *Mol Vis.* 2011 Mar 16;17:745-55.

Potop V, Dumitrache M, Ciocalteu A. The surface of the eye--a superficial entity with deep repercussions. *J Med Life.* 2009 Jan-Mar;2(1):66-71.

Rajangam T, An SS. Fibrinogen and fibrin based micro and nano scaffolds incorporated with drugs, proteins, cells and genes for therapeutic biomedical applications. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:3641-62

Reichl S, Müller-Goymann CC. The use of a porcine organotypic cornea construct for permeation studies from formulations containing befunolol hydrochloride. *Int J Pharm.* 2003 Jan 2;250(1):191-201.

Sánchez I, Martín R, Ussa F, Fernández-Bueno I. The parameters of the porcine eyeball. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2011 Apr;249(4):475-82.

Seaman CW, Whittingham A, Guest R, Warren N, Olson MJ, Guerriero FJ, Adriaens E, De Wever B. An evaluation of a cultured human corneal epithelial tissue model for the determination of the ocular irritation potential of pharmaceutical process materials. *Toxicol In Vitro.* 2010 Sep;24(6):1862-70.

Vuelta E. Ingeniería de tejidos en la reconstrucción de la superficie ocular: utilización de matrices de fibrina como nicho de células madre corneales. Tesis Doctoral. Universidad de León. 2009.

Werner A, Braun M, Reichl S, Kietzmann M. Establishing and functional testing of a canine corneal construct. *Vet Ophthalmol.* 2008 Sep-Oct;11(5):280-9.

Wu J, Du Y, Mann MM, Funderburgh JL, Wagner WR. Corneal stromal stem cells versus corneal fibroblasts in generating structurally appropriate corneal stromal tissue. *Exp Eye Res.* 2014 Mar;120:71-81.