



**UNIVERSIDAD DE LEÓN**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE ANDAMIAJES  
TRIDIMENSIONALES PARA EL CULTIVO DE CÉLULAS DE LA  
CONJUNTIVA**

Tesis doctoral dirigida por

Dra. M<sup>a</sup> José Díez Liébana,

Dra. Marta López Laguna y Dra. Jennifer Ramos Carro

**ANA FERNÁNDEZ GONZÁLEZ**

**León, 2016**





universidad  
de león

## INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

La Dra. Dña. M<sup>a</sup> José Diez Liébana, la Dra. Dña. Marta López Laguna y la Dra. Dña. Jennifer Ramos Carro, como Directores de la Tesis Doctoral titulada “Desarrollo y optimización de andamiajes tridimensionales para el cultivo de células de la conjuntiva” realizada por Dña. Ana Fernández González en el programa de doctorado Investigación Aplicada a las Ciencias Sanitarias, informa favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, en León a            de            de

Fdo: Dra. M<sup>a</sup> José Diez Liébana

Fdo: Dra. Marta López Laguna

Fdo: Dra. Jennifer Ramos Carro



*El más largo aprendizaje de todas las artes,  
es aprender a ver.*  
(Jules Gouncourt)

*Nunca desistas de un sueño.  
Sólo trata de ver las señales que te lleven a él.*  
(Paulo Coelho)



*A mi familia.*

*Para todo... Para siempre!*

*A David.*

*Por todo... Por siempre!*



## AGRADECIMIENTOS

---

“Todo sucede por algo, lo importante es tener paciencia y saber esperar”. Parece mentira como todo tiene un inicio y un fin, y la tesis doctoral no podía ser menos. Durante estos años ha habido momentos buenos y malos, fáciles y difíciles, en los que no veía claro el final, y ahora que ha llegado, me emociona el poder dar las gracias de corazón a todas aquellas personas que habéis compartido conmigo esta etapa de mi vida, que de un modo u otro me habéis aconsejado, ayudado, apoyado o simplemente acompañado para poder terminar lo que un día empecé.

En primer lugar, agradecer a mis directoras su papel fundamental en el desarrollo de esta tesis. Gracias a la Dra. M<sup>a</sup> José Diez Liébana, por facilitarme la continuidad de este trabajo y por su permanente disponibilidad y ayuda. Gracias a la Dra. Marta López Laguna, por su profesionalidad, paciencia y generosidad. Gracias a la doctora Jennifer Ramos Carro, por acompañarme desde el principio, por transmitirme su pasión por el trabajo, por su confianza y cariño.

Jenny y Marta, antes de directoras, habéis sido compañeras pero sobre todo amigas. Gracias por vuestros consejos, apoyo y horas de dedicación. A vuestro lado aprendí el verdadero significado del trabajo en equipo y me enorgullece enormemente que ocupéis el lugar que os merecéis en esta tesis. Los resultados de este trabajo son sin duda el reflejo de muchos años de sacrificio y la recompensa de todo nuestro esfuerzo desinteresado... Gracias por TODO mis BTeranas!

Al Dr. Francisco Javier Iglesias Muñoz, por haberme dado la oportunidad de comenzar a trabajar en el campo de la ingeniería de tejidos, por motivar e impulsar mi desarrollo profesional y por haberme enseñado a explorar mis propios límites.

Al Departamento de Farmacología de la Universidad de León por acogerme en el momento más difícil de esta tesis. En especial, a la próxima doctora Vanesa Huerga Mirantes, me alegro que nuestros caminos se hayan vuelto a cruzar en esta etapa; gracias por tu ayuda.

Al Dr. Ángel Cid Arregui por haberme dado la oportunidad de trabajar en el Centro Alemán de Investigación del Cáncer en Heidelberg. Gracias por el apoyo personal que me has brindado en la distancia y las oportunidades profesionales que me has ofrecido. Gracias a ese grupo de fantásticas personas que estaban cuando yo llegue: Isabel, M<sup>a</sup> José, Angelito y Jacob; y a quien llego cuando yo ya estaba: Vanessa, mi revolution. vielen Dank für alles!!!

Al Instituto de Biomedicina de la Universidad de León. Gracias a todas las personas que formáis parte de la familia IBIOMED... “sobrevivir” a vuestro lado ha sido más fácil. En especial, gracias a Juancho y a Susana por vuestra ayuda en todo momento, gracias a Anna Fernández por tus palabras de ánimo y gracias a las chicas del laboratorio de al lado, las chicas “CM” (Marta, Sandra y Laura) por vuestra continua predisposición a ayudar.

Al Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA) de la Universidad de Valladolid por facilitarnos el acceso a la financiación para la realización de parte de esta tesis.

Al Departamento de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela, por enseñarme el verdadero significado de una colaboración desinteresada.

Al matadero García Carpintero de Pola de Gordón (León) por facilitarnos la recogida de muestras semanalmente para la realización de este trabajo.

A la Empresa Micros por permitirme utilizar sus instalaciones para el procesamiento histológico y facilitarme el trabajo en el día a día.

Al departamento de Anatomía Patológica de la Universidad de León, en especial a la Dra. Carmen Ferreras Alonso y al Dr. Miguel Fuertes, por vuestra ayuda con las técnicas inmunohistoquímicas... porque hay veces que los experimentos si salen a la primera!

Al Departamento de Genética, en especial al Dr. Luis Saenz de Miera, por tu sabiduría estadística.

Al director de la Escuela de Ingenierías de la Universidad de León, el Dr. Ramón Ángel Fernández, por facilitarme un lugar en el cual poder escribir esta tesis. Gracias Ramón por todos tus buenos consejos.

A la Unidad de Producción Celular e Ingeniería Tisular (UPCIT) del Complejo Hospitalario Universitario de Granada, por darme esta gran oportunidad profesional y permitirme escribir los agradecimientos de esta tesis con la ilusión de quien comienza de nuevo.

A todas las personas que han formado parte de nuestra comunidad “*María Josefa Street*”, por haber hecho del piso un verdadero hogar. Desde Brasil hasta Alemania, pasando por Asturias. Gracias Supernenas (Mary, Iris y Leti), gracias Bingen, gracias Vel, gracias Lara y por supuesto... gracias hermana Laura. Por haber sufrido mis horarios raros, mis ojos de cerdo y tener siempre tanto interés en todo lo que hago.

A mis amigas de toda la vida, las de siempre, Judith, Natalia y Sara; porque la distancia nunca ha sido un obstáculo para sentir vuestra cercanía.

A mis compañeros de carrera, que no solo se han quedado en eso. Que 11 años después de habernos conocido, me han demostrado que la amistad prima por encima de otras cosas. Gracias a mi coinqui Helena; a mis gemelas favoritas, Noelia y Stella; a ese amigo excepcional, asturiano tenías que ser, Iñaki; y al rubio alto de Basauri, Andoni. De esa misma etapa, gracias a la Dra. Esther Encinas, por todo vuestro apoyo.

A la Tribu *Omaha*, ese grupo de personas excepcionales que luchan contra vientos y tempestades... ¡Valor, amistad y locura!

A Inma, mi Muleri, por acompañarme en el último sprint de esta tesis, por tu agradable compañía, tu continuo interés y simpatía.

Gracias a mi familia, numerosa en personas, pero sobre todo en valores. Dicen que somos la esencia de lo que vemos y en vosotros he tenido el mejor de los referentes. Gracias a mis padres, por todo el esfuerzo realizado para darnos la oportunidad que vosotros no tuvistéis. Gracias *papa* por enseñarnos a andar con paso firme por la vida. Gracias *mama* por tu protección, entrega y dedicación. Vosotros sois y seréis siempre nuestro gran ejemplo a seguir. Gracias de todo corazón.

Gracias a mis hermanas por vuestra ayuda, cariño y comprensión. A Bea, por tus consejos de hermana mayor en todas las situaciones; a Nuria, por animarme a empezar en el mundo de la ciencia... mira hasta donde hemos llegado; y a Laura, por tu compañía, por aguantarme las 24 horas, los 365 días del año, además de por tu paciencia, gracias por todos los masajes y devolver las articulaciones a su lugar en las jornadas intensas de experimentos.

Gracias a mis hermanos por enseñarme que en la vida como en el fútbol sala, no consiste en ser el mejor, si no en estar rodeado de buenos compañeros. A Alfonso, la leyenda del número 10, por valorar todo lo que hago y animarme a seguir creciendo personal y profesionalmente; y a Javi, el de los regates de ensueño, por alegrarme con tus chistes, incluso los días más grises.

A la parte política de la familia: Alberto, David y Rosalía, por haber encajado tan bien, y ser una pieza más del puzzle familiar.

Y sobre todo, gracias a l@s niñ@s de mis ojos... mis sobrin@s. Sin duda alguna, vuestra sonrisa y alegría, ha sido el mejor aliciente para acabar esta tesis. Raúl, Diego, Claudia e Iris... Os quiero!!!

Y por último, gracias a David... mi persona favorita y ya doctor Álvarez León. Gracias por todo tu apoyo y dedicación, por confiar en que lo conseguiría cuando yo deje de hacerlo, por "obligarme" a acabar esta tesis y devolverme la ilusión por lo que un día empecé. Gracias por reflejar en una imagen todo el esfuerzo de este trabajo y por enseñarme día a día que no existe limitación posible cuando de alcanzar sueños se trata. Tú has formado parte muy activa en el mío, haber llegado hasta aquí es mérito de los dos. Gracias de corazón... Gracias también a tu familia por acogerme como una más desde el principio, por sus palabras de ánimo y apoyo incondicional.

Alguien me dijo, hace no mucho tiempo, que más que una tesis doctoral... lo mío ha sido un libro de principios. Mucho he aprendido en esta etapa, tanto de la ciencia como de la vida. Finalmente no eres lo que logras, si no lo que superas... y sin vuestra ayuda no lo hubiese conseguido. Por eso os dedico esta tesis, la considero tan mía como vuestra...

Muchas gracias a todos.

## **FINANCIACIÓN**

---

La realización de este trabajo de investigación ha sido posible gracias al apoyo económico de las siguientes instituciones:

- Proyecto “Combinación de hidrogeles biomiméticos y nanopartículas como plataformas terapéuticas avanzadas para enfermedades oculares”. Ministerio de Ciencia e Innovación, CICYT MAT-2010-20452-C03-03. Investigador responsable: Dr. Francisco Javier Iglesias Muñoz. Duración: desde 01/01/2011 hasta 31/12/2013.



## **DIVULGACIÓN CIENTÍFICA Y APROVECHAMIENTO DE LOS RESULTADOS**

---

Publicaciones científicas derivadas del presente estudio:

Participación en congresos:

- ❖ Fernández A, Ramos J, López M, Pérez P, Santín E, Llorente L, Diebold Y, Iglesias FJ. Proliferation of porcine conjunctival fibroblasts in fibrin-based scaffolds using Alamar Blue assay. Póster. “54th Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)”. Seattle, USA. 5-9 de Mayo de 2013.  
Publicación en: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54: ARVO E-Abstract 1387.
  
- ❖ Ana Fernández, Jennifer Ramos, Marta López, M<sup>a</sup> José Díez, Antonio Manuel Lizana, Salvador Arias. Porcine bulbar conjunctiva decellularization: Characterization of acellular matrix obtained and repopulation with porcine bulbar conjunctiva cells. Póster. “International Society for Cellular Therapy (ISCT) Regional Europe Meeting”. Sevilla, Spain. 24-26 de Septiembre de 2015.



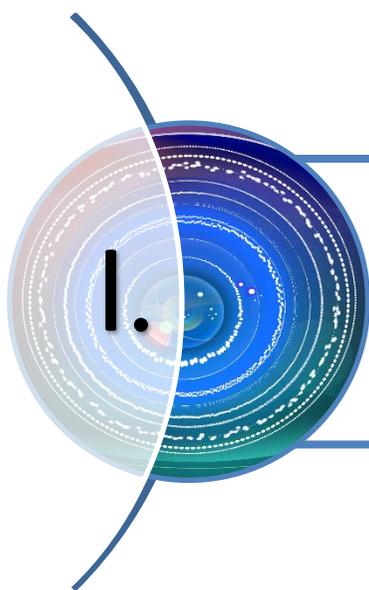
# ÍNDICE

<b>I. ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ABREVIATURAS .....</b>	<b>21</b>
1.1. ÍNDICE DE FIGURAS .....	23
1.2. ÍNDICE DE TABLAS .....	31
1.3. ABREVIATURAS .....	33
<b>II. RESUMEN/SUMMARY .....</b>	<b>37</b>
2.1. RESUMEN .....	39
2.2. SUMMARY .....	41
<b>III. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>43</b>
3.1. EL ÓRGANO DE LA VISIÓN .....	45
3.1.1. <i>Globos oculares</i> .....	45
3.1.2. <i>Aparato lagrimal</i> .....	46
3.1.3. <i>Párpados</i> .....	47
3.1.4. <i>Músculos oculares</i> .....	48
3.2. LA SUPERFICIE OCULAR.....	50
3.2.1. <i>La película lagrimal</i> .....	50
3.2.2. <i>La córnea</i> .....	52
3.2.2.1. <i>Histología</i> .....	53
3.2.2.2. <i>Funciones</i> .....	54
3.2.3. <i>El limbo</i> .....	55
3.2.3.1. <i>Histología</i> .....	55
3.2.3.2. <i>Funciones</i> .....	56
3.2.4. <i>La conjuntiva</i> .....	56
3.3. LA CONJUNTIVA.....	57
3.3.1. <i>Histología</i> .....	59
3.3.2. <i>Células calciformes</i> .....	61
3.3.3. <i>Glándulas de la conjuntiva</i> .....	62
3.3.4. <i>Funciones</i> .....	62
3.3.5. <i>Patologías asociadas y enfoque terapéutico</i> .....	63
3.3.6. <i>Tratamiento</i> .....	65
3.4. INGENIERÍA DE TEJIDOS .....	65
3.4.1. <i>Biomateriales</i> .....	66
3.4.1.1. <i>Fibrina</i> .....	68
3.4.1.2. <i>Descelularización</i> .....	72
3.4.1.2.1. <i>Protocolos de descelularización</i> .....	73
3.4.1.2.2. <i>Descelularización de la superficie ocular</i> .....	74
<b>IV. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>77</b>
4.1. JUSTIFICACIÓN .....	79
4.2. HIPÓTESIS .....	81
4.3. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS .....	81

<b>V. CAPÍTULO 1: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS DE LA CONJUNTIVA PORCINA</b>	<b>83</b>
.....	
<b>V- CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODO</b>	<b>87</b>
5.1. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LOS GLOBOS OCULARES	87
5.2. TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR	89
5.2.1. <i>Técnicas de digestión: protocolo de aislamiento</i>	89
5.2.2. <i>Cuantificación celular y porcentaje de viabilidad</i>	92
5.2.3. <i>Análisis del rendimiento celular</i>	93
5.2.4. <i>Establecimiento de cultivos primarios</i>	93
5.2.5. <i>Realización de subcultivos</i>	94
5.2.6. <i>Análisis de la expresión proteica por inmunofluorescencia</i>	94
5.3. DEFINICIÓN DE LA ZONA DE OBTENCIÓN	98
5.3.1. <i>Análisis del rendimiento celular</i>	98
5.3.2. <i>Análisis de la morfología celular</i>	100
5.3.3. <i>Análisis de la proliferación celular</i>	100
5.3.4. <i>Tinción de ácido periódico de Schiff (periodic acid-Schiff, PAS)</i>	101
5.3.5. <i>Análisis estadístico</i>	101
<b>V- CAPÍTULO 1. RESULTADOS</b>	<b>102</b>
5.4. TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR	102
5.4.1. <i>Análisis del rendimiento celular: células estromales</i>	102
5.4.2. <i>Análisis del rendimiento celular: células epiteliales</i>	104
5.4.3. <i>Establecimiento de cultivos primarios</i>	105
5.4.4. <i>Análisis de la expresión proteica por inmunofluorescencia: células estromales</i>	107
5.4.5. <i>Análisis de la expresión proteica por inmunofluorescencia: células epiteliales</i>	108
5.4.6. <i>Análisis de la expresión proteica por inmunofluorescencia: células caliciformes</i>	110
5.5. DEFINICIÓN DE LA ZONA DE OBTENCIÓN	112
5.5.1. <i>Análisis del rendimiento celular: células estromales</i>	112
5.5.2. <i>Análisis del rendimiento celular: células epiteliales</i>	113
5.5.3. <i>Análisis de la morfología celular</i>	115
5.5.4. <i>Análisis de la proliferación celular</i>	116
5.5.4.1. <i>Análisis de la proliferación: células estromales</i>	117
5.5.4.2. <i>Análisis de la proliferación: células epiteliales</i>	117
5.5.5. <i>Tinción de ácido periódico Schiff</i>	118
<b>V- CAPÍTULO 1. DISCUSIÓN</b>	<b>123</b>
<b>VI. CAPÍTULO 2: DISEÑO DE LA PRIMERA GENERACIÓN DE ANDAMIAJES DE FIBRINA</b>	<b>127</b>
.....	
<b>VI- CAPÍTULO 2. MATERIAL Y MÉTODO</b>	<b>133</b>
6.1. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	133
6.1.1. <i>Obtención de los componentes celulares</i>	133
6.1.2. <i>Obtención del componente plasmático</i>	133
6.2. DEFINICIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL ANDAMIAJE DE FIBRINA ESTÁNDAR	134
6.2.1. <i>Formulación del hidrogel</i>	134
6.2.2. <i>Análisis de la morfología celular</i>	137

6.2.3.	<i>Análisis de la proliferación celular</i> .....	139
6.2.4.	<i>Análisis de la distribución celular</i> .....	139
6.2.5.	<i>Selección del andamiaje idóneo</i> .....	140
6.3.	CÉLULAS DE LA CONJUNTIVA EN LA PRIMERA GENERACIÓN DEL HIDROGEL DE FIBRINA .....	141
6.3.1.	<i>Andamiaje de fibrina que contiene células estromales</i> .....	141
6.3.1.1.	<i>Caracterización del andamiaje de fibrina que contiene células estromales</i> ....	144
6.3.2.	<i>Andamiaje de fibrina que contiene células epiteliales</i> .....	144
6.3.2.1.	<i>Caracterización del andamiaje de fibrina que contiene células epiteliales</i> .....	145
6.4.	ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN ANDAMIAJES TRIDIMENSIONALES DE FIBRINA MEDIANTE EL MÉTODO ALAMAR BLUE (AB) .....	146
6.5.	COCULTIVO EN LA PRIMERA GENERACIÓN DE HIDROGEL DE FIBRINA .....	147
6.5.1.	<i>Estudios de histología</i> .....	148
6.5.2.	<i>Análisis de la distribución celular</i> .....	149
6.5.3.	<i>Caracterización bioquímica</i> .....	149
6.6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	150
<b>VI- CAPÍTULO 2. RESULTADOS</b> .....		151
6.7.	OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS .....	151
6.7.1.	<i>Obtención del componente plasmático</i> .....	151
6.8.	DEFINICIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL HIDROGEL ESTÁNDAR .....	151
6.8.1.	<i>Análisis de la morfología celular</i> .....	151
6.8.2.	<i>Análisis de la distribución celular</i> .....	152
6.8.3.	<i>Análisis de la proliferación celular</i> .....	160
6.9.	CÉLULAS ESTROMALES DE LA CONJUNTIVA EN LA PRIMERA GENERACIÓN DE ANDAMIAJE DE FIBRINA	164
6.9.1.	<i>Estudio de proliferación celular</i> .....	164
6.9.2.	<i>Análisis de la morfología celular</i> .....	165
6.9.3.	<i>Análisis de la distribución celular</i> .....	166
6.9.4.	<i>Inmunohistoquímica</i> .....	167
6.10.	CÉLULAS EPITELIALES DE LA CONJUNTIVA EN LA PRIMERA GENERACIÓN DE HIDROGEL DE FIBRINA ....	168
6.10.1.	<i>Estudio de proliferación celular</i> .....	168
6.10.2.	<i>Análisis de la morfología celular</i> .....	169
6.10.3.	<i>Análisis de la distribución celular</i> .....	170
6.10.4.	<i>Inmunohistoquímica</i> .....	171
6.11.	ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN ANDAMIAJES TRIDIMENSIONALES DE FIBRINA MEDIANTE EL MÉTODO ALAMAR BLUE (AB) .....	172
6.12.	COCULTIVO EN LA PRIMERA GENERACIÓN DE HIDROGEL DE FIBRINA .....	175
6.12.1.	<i>Estudios de histología</i> .....	175
6.12.2.	<i>Análisis de la distribución celular</i> .....	176
6.12.3.	<i>Caracterización bioquímica</i> .....	178
<b>VI- CAPÍTULO 2. DISCUSIÓN</b> .....		199
<b>VII. CAPÍTULO 3: DESCELULARIZACIÓN DE CONJUNTIVA PORCINA: DISEÑO DE LA SEGUNDA Y TERCERA GENERACIÓN DE ANDAMIAJES</b> .....		205
<b>VII- CAPÍTULO 3. MATERIAL Y MÉTODO</b> .....		211
7.1.	DESCRIPCIÓN DE UN PROTOCOLO DE DESCELULARIZACIÓN ÓPTIMO .....	211
7.1.1.	<i>Obtención y procesado de las muestras</i> .....	211
7.1.2.	<i>Aplicación del protocolo de desceldularización en la conjuntiva porcina</i> .....	211

7.1.3.	<i>Caracterización de las estructuras acelulares obtenidas</i> .....	214
7.2.	DISEÑO DE LA SEGUNDA GENERACIÓN DE ANDAMIAJES EMPLEANDO COMO BASE CONJUNTIVA DESCELULARIZADA .....	218
7.2.1.	<i>Obtención de muestras</i> .....	218
7.2.2.	<i>Protocolo de elaboración: recelularización de conjuntiva porcina descelularizada con células conjuntivales</i> .....	218
7.3.	DISEÑO DE LA TERCERA GENERACIÓN DE ANDAMIAJES DE FIBRINA UTILIZANDO COMO BASE FIBRAS OBTENIDAS DE LA DIGESTIÓN ENZIMÁTICA DE LA CONJUNTIVA DESCELULARIZADA .....	221
7.3.1.	<i>Obtención de muestras</i> .....	221
7.3.2.	<i>Protocolo de elaboración: Cocultivo de células conjuntivales en el andamiaje de fibrina elaborado con la solución obtenida tras la digestión de la conjuntiva descelularizada</i> .....	221
<b>VII-</b>	<b>CAPÍTULO 3. RESULTADOS</b> .....	<b>225</b>
7.4.	DESCRIPCIÓN DE UN PROTOCOLO DE DESCELULARIZACIÓN ÓPTIMO .....	225
7.4.1.	<i>Obtención y procesado de las muestras</i> .....	225
7.4.2.	<i>Caracterización de las estructuras acelulares obtenidas</i> .....	225
7.4.2.1.	<i>Estudios de histología</i> .....	225
7.4.2.2.	<i>Estudios de microscopía electrónica de barrido (SEM)</i> .....	227
7.4.2.3.	<i>Viabilidad celular AlamarBlue®</i> .....	228
7.4.2.4.	<i>Valoración del estado de la matriz extracelular: estudio biomecánico</i> .....	229
7.4.2.5.	<i>Citotoxicidad del medio de descelularización</i> .....	231
7.4.2.6.	<i>Valoración del estado de la matriz extracelular: estudio bioquímico</i> .....	233
7.4.2.7.	<i>Inmunohistoquímica</i> .....	236
7.5.	COCULTIVO DE CÉLULAS CONJUNTIVALES EN EL ANDAMIAJE DE FIBRINA ELABORADO CON LA SOLUCIÓN OBTENIDA TRAS LA DIGESTIÓN DE LA CONJUNTIVA DESCELULARIZADA .....	237
7.5.1.	<i>Estudios de histología</i> .....	237
7.5.2.	<i>Estudios de microscopía electrónica de barrido (SEM)</i> .....	238
7.5.3.	<i>Estudios de viabilidad celular Live/Dead</i> .....	239
7.5.4.	<i>Estudios de inmunohistoquímica</i> .....	240
7.5.5.	<i>Caracterización bioquímica</i> .....	241
<b>VII-</b>	<b>CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN</b> .....	<b>259</b>
<b>VIII.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>263</b>
<b>IX.</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>267</b>
<b>X.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>271</b>
<b>XI.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>289</b>
11.1.	ANEXO I. MATERIAL .....	291
11.2.	ANEXO II. PROTOCOLOS .....	299



## **ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ABREVIATURAS**



## 1.1. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. El órgano de la visión. Estructura del globo ocular: túnica fibrosa, túnica vascular y túnica nerviosa. Modificado y traducido de Eye Anatomy, Functions and Structure.....	46
Figura 2. Anatomía del párpado. Modificado de Manual Moderno sección Oftalmología.....	48
Figura 3. Anatomía de los músculos extraoculares. Modificado y traducido de American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus. ....	49
Figura 4. Estructura de la película lagrimal: componentes principales.....	51
Figura 5. Estructura de la córnea. Resumen gráfico de las diferentes capas.....	54
Figura 6. Localización anatómica del limbo en la superficie ocular. ....	55
Figura 7. Estructura del limbo. Componentes principales de cada capa. ....	56
Figura 8. Localización anatómica de la conjuntiva en la superficie ocular. Adaptado de Anatomy of the Conjunctiva. Ophthalmology Atlas.....	57
Figura 9. Zonas de la conjuntiva. ....	58
Figura 10. Estructura histológica de la conjuntiva. Componentes principales de cada capa. ....	61
Figura 11. Estructura de la molécula de fibrinógeno. ....	69
Figura 12. Sitios del fibrinógeno que intervienen en el proceso de ensamblaje de la fibrina. ....	69
Figura 13. Sitios de unión a proteínas de los sistemas de coagulación y fibrinolíticos..	70
Figura 14. Formación de la red de fibrina. ....	71
Figura 15. Fases de un protocolo de descellularización estándar.....	76
Figura 16. Protocolo de aislamiento. ....	85
Figura 17. Zona de obtención.....	86
Figura 18. Procesamiento de globos oculares.....	88
Figura 19. Proceso de esterilización en placa de 24 pocillos. ....	88
Figura 20. Diagrama del protocolo de aislamiento para la obtención de los componentes celulares de la conjuntiva.....	91
Figura 21. Cuantificación celular. ....	92
Figura 22. Técnica de inmunofluorescencia indirecta.....	95
Figura 23. Técnica de inmunofluorescencia directa para la detección de carbohidratos. ....	96
Figura 24. Zonas de obtención de la conjuntiva.....	98
Figura 25. Diagrama del protocolo de aislamiento para la obtención de los componentes celulares de la conjuntiva.....	99
Figura 26. Placa de poliestireno de 24 pocillos con células sembradas para el estudio de proliferación. ....	100

Figura 27. Representación en cajas y bigotes del rendimiento de células estromales. ....	103
Figura 28. Representación en cajas y bigotes del rendimiento de células epiteliales. ....	105
Figura 29. Morfología celular estromal en los cultivos primarios en función de la concentración de colagenasa tipo I. ....	106
Figura 30. Morfología celular epitelial en los cultivos primarios en función del tiempo de incubación con la solución enzimática T/E 0,25/0,05. ....	106
Figura 31. Expresión de marcadores de células estromales en los cultivos de la zona bulbar. ....	108
Figura 32. Expresión de marcadores de células epiteliales en los cultivos de la zona bulbar. ....	109
Figura 33. Expresión de la molécula de adhesión celular E-Cadherina en células epiteliales en pase 4. ....	109
Figura 34. Expresión del marcador lectina. ....	110
Figura 35. Expresión de marcadores de células secretoras de mucinas en células epiteliales. ....	111
Figura 36. Representación en cajas y bigotes del rendimiento de células estromales. ....	113
Figura 37. Representación en cajas y bigotes del rendimiento de células epiteliales. ....	114
Figura 38. Morfología celular estromal en los cultivos primarios (P0), y P1, P3 y P4 en función de la zona de la conjuntiva de aislamiento. ....	115
Figura 39. Morfología celular epitelial en los cultivos primarios (P0), y P1, P3 y P4 en función de la zona de la conjuntiva de aislamiento. ....	116
Figura 40. Curva de proliferación de células estromales a pase 2. ....	117
Figura 41. Curva de proliferación de células epiteliales a pase 2. ....	118
Figura 42. Representación en porcentaje de la intensidad de tinción PAS en las células epiteliales a pase 0 en función de la zona de la conjuntiva. ....	120
Figura 43. Representación en porcentaje de la intensidad de tinción PAS en las células epiteliales a pase 1 en función de la zona de la conjuntiva. ....	121
Figura 44. Estudio para la determinación de la composición del andamiaje idóneo. ....	129
Figura 45. Cultivo de las células aisladas de la conjuntiva en los diferentes tipos de andamiajes tridimensionales. ....	130
Figura 46. Determinación del patrón de proliferación en el interior del andamiaje tridimensional mediante el método Alamar Blue. ....	131
Figura 47. Cocultivo de las células estromales y las células epiteliales en los andamiajes tridimensionales. ....	132
Figura 48. Proceso de elaboración de andamiajes de fibrina. ....	134
Figura 49. Instalaciones del laboratorio de anatomía patológica. ....	138
Figura 50. Microscopía electrónica de barrido. (A) Desecación de las muestras. (B) Recubrimiento de oro de las muestras. (C) Aspecto de las muestras recubiertas, listas para visualizar al microscopio. (D) Microscopio de barrido. ....	140
Figura 51. Cocultivo de los componentes celulares de la conjuntiva. ....	148

Figura 52. Análisis del grado de celularidad y el estado de la matriz de composición crioprecipitado 1 mg/ml.....	154
Figura 53. Análisis del grado de celularidad y el estado de la matriz de composición crioprecipitado 1,5 mg/ml.....	155
Figura 54. Análisis del grado de celularidad y el estado de la matriz de composición crioprecipitado 3 mg/ml.....	156
Figura 55. Análisis del grado de celularidad y el estado de la matriz de composición plasma fresco 1 mg/ml.....	157
Figura 56. Análisis del grado de celularidad y el estado de la matriz de composición plasma fresco 1,5 mg/ml.....	158
Figura 57. Análisis del grado de celularidad y el estado de la matriz de composición plasma fresco 3 mg/ml.....	159
Figura 58. Proliferación celular de los andamiajes de crioprecipitado de 1mg/ml de fibrinógeno.....	160
Figura 59. Proliferación celular de los andamiajes de crioprecipitado de 1,5 mg/ml de fibrinógeno.....	161
Figura 60. Proliferación celular de los andamiajes de crioprecipitado de 3 mg/ml de fibrinógeno.....	161
Figura 61. Proliferación celular de los andamiajes de plasma fresco de 1 mg/ml de fibrinógeno.....	162
Figura 62. Proliferación celular de los andamiajes de plasma fresco de 1,5 mg/ml de fibrinógeno.....	162
Figura 63. Proliferación celular de los andamiajes de plasma fresco de 3 mg/ml de fibrinógeno.....	163
Figura 64. Proliferación celular de las células estromales en el interior de los andamiajes de fibrina de primera generación.....	164
Figura 65. Análisis de la morfología celular mediante tinción H-E en andamiajes de fibrina de primera generación que contienen células estromales.....	165
Figura 66. Análisis de la distribución celular mediante microscopía electrónica de barrido en andamiajes de primera generación que contienen células estromales.....	166
Figura 67. Análisis fenotípico mediante tinción inmunohistoquímica de vimentina de andamiajes de fibrina de primera generación que contienen células estromales.....	167
Figura 68. Proliferación celular de las células epiteliales en la superficie de los andamiajes de fibrina de primera generación.....	168
Figura 69. Análisis de la morfología celular mediante tinción H-E de células epiteliales sobre andamiajes de fibrina de primera generación.....	169
Figura 70. Análisis de la distribución celular mediante microscopía electrónica de barrido de células epiteliales sobre andamiajes de fibrina de primera generación.....	170
Figura 71. Análisis fenotípico mediante tinción inmunohistoquímica de pancitoqueratina de células epiteliales sobre andamiajes de fibrina de primera generación.....	171
Figura 72. Porcentaje de reducción del Alamar Blue en el andamiaje de fibrina con base de crioprecipitado de 1,5 mg/ml de fibrinógeno.....	172

Figura 73. Porcentaje de reducción del Alamar Blue en el andamiaje de fibrina con base de crioprecipitado de 3 mg/ml de fibrinógeno.....	173
Figura 74. Porcentaje de reducción del Alamar Blue en el andamiaje de fibrina con base de plasma fresco de 1,5 mg/ml de fibrinógeno.....	173
Figura 75. Porcentaje de reducción del Alamar Blue en el andamiaje de fibrina con base de plasma fresco de 3 mg/ml de fibrinógeno.....	174
Figura 76. Análisis de la morfología celular mediante tinción H-E de los andamiajes de primera generación que contienen células estromales en el interior y células epiteliales en la superficie. ....	175
Figura 77. Análisis de colágeno mediante tinción Tricrómico de Masson de los andamiajes de primera generación que contienen células estromales en el interior y células epiteliales en la superficie. ....	176
Figura 78. Análisis de la distribución celular mediante la técnica microscopía electrónica de barrido de los andamiajes de primera generación que contienen células estromales en el interior y células epiteliales en la superficie.....	177
Figura 79. Resultado colorimétrico obtenido al analizar la concentración de colágeno en los andamiajes de fibrina de la primera generación mediante el kit Sicol. ....	178
Figura 80. Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno en función del tipo de Estudio, Biomaterial y Concentración de fibrinógeno. ....	179
Figura 81. Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno en función del tipo de Estudio. ....	179
Figura 82. Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno en función del tipo de Biomaterial.....	180
Figura 83. Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno en función de la Concentración de fibrinógeno.....	180
Figura 84. Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno en el Estudio Control según el Biomaterial y la Concentración de fibrinógeno. ....	181
Figura 85. Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno en el Estudio Cocultivo según el Biomaterial y la Concentración.....	182
Figura 86. Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno en el Biomaterial Crioprecipitado y Plasma según el Estudio.....	183
Figura 87. Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno a la Concentración de fibrinógeno 1,5 mg/ml y 3 mg/ml según el Estudio.....	184
Figura 88. Resultado colorimétrico obtenido al analizar la concentración de elastina en los andamiajes de fibrina de la primera generación mediante el kit Fastin. ....	185
Figura 89. Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina en función del tipo de Estudio, Biomaterial y Concentración de fibrinógeno. ....	186
Figura 90. Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina en función del tipo de Estudio. ....	186
Figura 91. Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina en función del tipo de Biomaterial.....	187

Figura 92. Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina en función de la Concentración de fibrinógeno.....	187
Figura 93. Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina en el Estudio Cocultivo según el Biomaterial y la Concentración. ....	188
Figura 94. Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina en el Biomaterial Crioprecipitado y Plasma según el Estudio.....	189
Figura 95. Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina a la Concentración de Fibrinógeno 1,5 mg/ml y 3 mg/ml en función del estudio Estudio.....	190
Figura 96. Resultado colorimétrico obtenido al analizar la concentración de GAG en los andamiajes de fibrina de la primera generación mediante el kit Blyscan. ....	191
Figura 97. Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG en función del tipo de Estudio, Biomaterial y Concentración de fibrinógeno. ....	192
Figura 98. Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG en función del tipo de Estudio.....	192
Figura 99. Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG en función del tipo de Biomateria.....	193
Figura 100. Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG en función de la Concentración de fibrinógeno.....	193
Figura 101. Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG en el Estudio Control y Cocultivo según la Concentración de fibrinógeno.....	194
Figura 102. Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG en el Biomaterial Crioprecipitado y Plasma según el Estudio.....	195
Figura 103. Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG a la Concentración de Fibrinógeno 1,5 mg/ml y 3 mg/ml en función del Estudio. ....	196
Figura 104. Esquema resumen de la composición de la segunda y tercera generación de andamiajes. ....	207
Figura 105. Estudio para comprobar la efectividad de un protocolo de descelularización en la conjuntiva porcina. ....	208
Figura 106. Cultivo de las células aisladas de la conjuntiva en conjuntiva descelularizada.....	209
Figura 107. Cultivo de las células aisladas de la conjuntiva en un andamiaje de fibrina con fibras de conjuntiva descelularizada. ....	210
Figura 108. Diagrama esquemático del protocolo de descelularización. ....	213
Figura 109. Representación esquemática del protocolo para la medida de viabilidad celular.....	215
Figura 110. Esquema del funcionamiento del marcaje celular Live/Dead.....	217
Figura 111. Cocultivo de los componentes celulares de la conjuntiva en el andamiaje de 2ª generación. ....	219
Figura 112. Cocultivo de los componentes celulares de la conjuntiva en el andamiaje de 3ª generación. ....	223

Figura 113. Comparación histológica de la conjuntiva en fresco (primera columna), conjuntiva descelularizada (segunda columna) y conjuntiva recelularizada (tercera columna).....	226
Figura 114. Comparación de la microestructura mediante la técnica SEM. ....	227
Figura 115. Viabilidad celular mediante la técnica AlamarBlue®.....	228
Figura 116. Ejemplo de gráficas obtenidas tras la realización del ensayo uniaxial.....	229
Figura 117. Representación en cajas y bigotes de la rigidez según el factor Condición. ....	230
Figura 118. Representación en cajas y bigotes del módulo elástico según el factor Condición.....	231
Figura 119. Resultados del ensayo de citotoxicidad sobre los componentes celulares de la conjuntiva. ....	232
Figura 120. Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno en la conjuntiva en fresco, la conjuntiva descelularizada y la conjuntiva recelularizada....	234
Figura 121. Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina en la conjuntiva en fresco, la conjuntiva descelularizada y la conjuntiva recelularizada....	235
Figura 122. Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG en la conjuntiva en fresco, la conjuntiva descelularizada y la conjuntiva recelularizada....	236
Figura 123. Comparación inmunohistoquímica de la conjuntiva en fresco (primera columna), conjuntiva descelularizada (segunda columna) y conjuntiva recelularizada (tercera columna). ....	237
Figura 124. Análisis de la morfología celular mediante tinción H-E de los andamiajes de tercera generación que contienen células estromales en el interior y células epiteliales en la superficie. ....	238
Figura 125. Análisis de la distribución celular mediante la técnica microscopía electrónica de barrido de los andamiajes de tercera generación que contienen células estromales en el interior y células epiteliales en la superficie.....	239
Figura 126. Análisis de la viabilidad celular mediante la técnica Live/Dead de los andamiajes de tercera generación que contienen células estromales en el interior y células epiteliales en la superficie. ....	240
Figura 127. Análisis fenotípico mediante tinción inmunohistoquímica de vimentina de células estromales en el interior de andamiajes de fibrina de tercera generación. ....	240
Figura 128. Análisis fenotípico mediante tinción inmunohistoquímica de pancitoqueratina de células epiteliales sobre andamiajes de fibrina de tercera generación.....	241
Figura 129. Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno en función del tipo de Estudio, Biomaterial y Concentración de fibrinógeno. ....	242
Figura 130. Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno en función del tipo de Estudio. ....	243
Figura 131. Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno en función del tipo de Biomaterial.....	243

Figura 132. Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno en función de la Concentración de fibrinógeno.....	244
Figura 133. Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno en el Biomaterial Crioprecipitado y Plasma según el Estudio.....	245
Figura 134. Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno a la Concentración de fibrinógeno 1,5 mg/ml y 3 mg/ml según el Estudio.....	246
Figura 135. Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina en función del tipo de Estudio, Biomaterial y Concentración de fibrinógeno. ....	247
Figura 136. Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina en función del tipo de Estudio. ....	248
Figura 137. Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina en función del tipo de Biomaterial. Los círculos se corresponden con valores atípicos. N/S: No significación; n=5. ....	248
Figura 138. Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina en función de la Concentración de fibrinógeno.....	249
Figura 139. Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina en el Biomaterial Crioprecipitado y Plasma según el Estudio.....	250
Figura 140. Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina a la Concentración de Fibrinógeno 1,5 mg/ml y 3 mg/ml en función del estudio Estudio.....	251
Figura 141. Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG en función del tipo de Estudio, Biomaterial y Concentración de fibrinógeno. ....	253
Figura 142. Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG en función del tipo de Estudio.....	253
Figura 143. Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG en función del tipo de Biomaterial. ....	254
Figura 144. Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG en función de la Concentración de fibrinógeno. N/S: No significación; n=5.....	254
Figura 145. Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG en el Estudio Control y Cocultivo según el Biomaterial. ....	255
Figura 146. Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG en el Biomaterial Crioprecipitado y Plasma según el Estudio.....	256
Figura 147. Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG a la Concentración de Fibrinógeno 1,5 mg/ml y 3 mg/ml en función del Estudio. ....	257



## 1.2. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estructura de la película lagrimal: origen, componentes principales y funciones. ....	51
Tabla 2. Relación de tejidos descelularizados según el agente descelularizante, clasificados por especie. ....	75
Tabla 3. Protocolo de esterilización. Composición de las soluciones de esterilización y su correspondiente tiempo de acción. ....	89
Tabla 4. Composición del medio de cultivo de células estromales/fibroblastos (MCF). ....	90
Tabla 5. Composición del medio de cultivo de células epiteliales (MCE). ....	91
Tabla 6. Marcadores específicos para células estromales, células epiteliales y células caliciformes. ....	97
Tabla 7. ANOVA para la concentración de colagenasa I. ....	103
Tabla 8. ANOVA para el tiempo de incubación con la solución T/E. ....	104
Tabla 9. Resultados de los estudios de inmunofluorescencia realizados sobre células de naturaleza estromal y epitelial en P1, P4 y P14. ....	111
Tabla 10. ANOVA para el rendimiento de células estromales. ....	112
Tabla 11. ANOVA para el rendimiento de células epiteliales. ....	113
Tabla 12. Parámetros de intensidad de tinción PAS. ....	119
Tabla 13. Andamiajes tridimensionales con base de CF. ....	135
Tabla 14. Andamiajes tridimensionales con base de PF. ....	136
Tabla 15. Valoración de la estructura obtenida según la formulación del andamiaje. ....	139
Tabla 16. Composición de los andamiajes de fibrina que contienen células estromales. Volumen específico de cada componente en función del tipo de andamiaje. ....	142
Tabla 17. Resumen de los estudios realizados en los andamiajes que contienen células estromales. ....	143
Tabla 18. Composición de los andamiajes de fibrina que contienen células epiteliales. ....	145
Tabla 19. ANOVA de los factores Estudio, Biomaterial y Concentración en el análisis global de los datos. ....	178
Tabla 20. ANOVA de los factores Estudio, Biomaterial y Concentración en el análisis global de los datos. ....	185
Tabla 21. ANOVA de los factores Estudio, Biomaterial y Concentración en el análisis global de los datos. ....	191
Tabla 22. Resumen de los componentes en la elaboración de los andamiajes de tercera generación. ....	222
Tabla 23. ANOVA para la rigidez con el factor Condición. ....	230
Tabla 24. ANOVA para el módulo elástico con el factor Condición. ....	231
Tabla 25. ANOVA para la concentración de colágeno con el factor Condición. ....	233
Tabla 26. ANOVA para la concentración de elastina con el factor Condición. ....	234
Tabla 27. ANOVA para la concentración de colágeno con el factor Condición. ....	235

Tabla 28. ANOVA de los factores Estudio, Biomaterial y Concentración en el análisis global de los datos.....	242
Tabla 29. ANOVA de los factores Estudio, Biomaterial y Concentración en el análisis global de los datos.....	247
Tabla 30. ANOVA de los factores Estudio, Biomaterial y Concentración en el análisis global de los datos.....	252

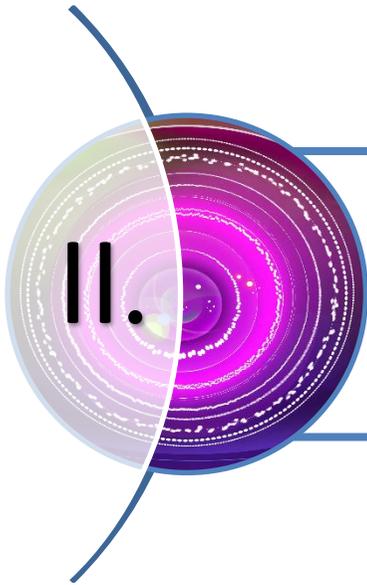
### 1.3. ABREVIATURAS

A/B	pH Ácido/ pH Básico
AB	AlamarBlue™
ANOVA	Análisis de varianza ( <i>ANalysis Of VAriance</i> )
BrdU	Bromodesoxiuridina
BSS	Solución buffer salino ( <i>Buffer Saline Solution</i> )
CC	Cocultivo
CD90	Cluster of Differentiation 90
CF	Crioprecipitado de plasma fresco
CHEMCYL	Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León
CK 7	Citoqueratina-7 ( <i>Cytokeratin-7</i> )
cm <sup>2</sup>	Centímetro cuadrado
CPCs	Cultivos primarios conjuntivales
CTRL	Control
DAB	Diaminobencidina
DMEM	Medio de cultivo base ( <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> )
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNAsa I	Dexosirribonucleasa I
DPX	Medio de montaje ( <i>Distyrene Plasticizer Xylene</i> )
EDTA	Ácido etilendiaminetetraacético ( <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> )
EEM	Error estándar de la media
FD	Factor de dilución
fmol	Femtomole
GAG	Glicosaminoglicanos
GL	Grados de libertad
H-E	Hematoxilina-Eosina
HPA	<i>Helix pomatia</i>

HPS	Solución peróxido de hidrógeno ( <i>Hydrogen Peroxidase Solution</i> )
IL-10	Interleucina-10
MCE	Medio de cultivo de células epiteliales
MCF	Medio de cultivo de células estromales (fibroblastos)
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MPa	Megapascal
N	Newton
NET	Necrólisis epidérmica tóxica
nm	Nanómetro
N/S	No significación
OH	Hidroxilo
P	Probabilidad
P0	Cultivo celular primario
P1, P2...P15	Subcultivos celulares
P/S	Penicilina/ Estreptomicina ( <i>Penicillin/ Streptomycin</i> )
PAS	<i>Periodic Acid-Schiff</i>
PBS	Tampón fosfato salino ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PF	Plasma fresco
PGA	Ácido poliglicólico
PLA	Ácido poliláctico
PLA2	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo ( <i>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</i> )
RNAse A	Ribonucleasa A
rpm	Revoluciones por minuto
SBF	Suero Bovino Fetal

SD	Desoxicolato de sodio ( <i>Sodium Deoxycholate</i> )
SDS	Dodecilsulfato sódico ( <i>Sodium Dodecylsulfate</i> )
SEM	Microscopía electrónica de barrido ( <i>Scanning Electron Microscopy</i> )
TªA	Temperatura ambiente
T/E	Tripsina/EDTA ( <i>Trypsin /Ethylenediaminetetraacetic</i> )
TCPS	<i>Tissue Culture Polystyrene</i>
TFFs	<i>Trefoil factor family</i>
TNF-alfa	<i>Tumor necrosis factor alfa</i>
TRIS	Tri (hidroximetil) aminometano
V <sub>c</sub>	Volumen de crioprecipitado de plasma fresco
V <sub>p</sub>	Volumen de plasma fresco
V/V	Volumen/Volumen
μl	Microlitro





**RESUMEN  
SUMMARY**



## 2.1. RESUMEN

La reconstrucción de la superficie ocular, por ingeniería tisular, representa una modalidad terapéutica con grandes perspectivas. La restauración de la conjuntiva constituye una parte esencial en la regeneración de la superficie ocular, especialmente cuando un área extensa o toda la superficie ocular se ve afectada, como ocurre en pacientes con penfigoide ocular cicatricial, síndrome de Stevens-Johnson, necrosis epidérmica tóxica, o quemaduras térmicas y químicas. En estas situaciones, la superficie conjuntival debe repararse primero para que el fórnix se restablezca.

En el presente trabajo, para desarrollar un modelo de conjuntiva *in vitro* se han establecido una serie de etapas que han sido englobadas en tres capítulos.

Las muestras de conjuntiva para la realización de este estudio han sido de origen porcino. En el primer capítulo, se ha conseguido optimizar un protocolo de digestión basado en la acción secuencial de dos enzimas: colagenasa tipo I y solución Tripsina/EDTA, para la obtención de células estromales y células epiteliales, respectivamente. Mediante inmunofluorescencia se ha comprobado que los componentes celulares aislados mantuvieron sus características fenotípicas durante el proceso de expansión *in vitro*. Se ha definido la zona bulbar de la conjuntiva como la localización anatómica para la extracción de biopsias, porque las células epiteliales aisladas tienen capacidad de sintetizar mucinas.

En el segundo capítulo de este trabajo se han diseñado hidrogeles de fibrina, denominados andamiajes tridimensionales de primera generación, utilizando como biomaterial biológico la fibrina procedente de plasma fresco y de crioprecipitado de plasma fresco. Se han cultivado en su interior células estromales y en su superficie células epiteliales. Los estudios realizados a las dos semanas de cultivo mediante técnicas de histología, así como microscopía electrónica de barrido, mostraron una correcta adhesión y distribución de las células estromales en el interior de los andamiajes y la estratificación de células epiteliales en la superficie. También se ha determinado la composición bioquímica de los sustitutivos conjuntivales resultantes.

Por último, en el tercer capítulo de este trabajo se ha aplicado un protocolo de descelularización para la obtención de conjuntiva acelular. Los estudios microestructurales, de viabilidad celular, biomecánicos, bioquímicos y de citotoxicidad permitieron caracterizar la conjuntiva acelular resultante que se ha utilizado como material biológico de partida en el diseño de sustitutivos conjuntivales. Como segunda generación de andamiajes se ha utilizado la conjuntiva porcina descelularizada. Para la tercera generación de andamiajes tridimensionales se ha elaborado una formulación innovadora utilizando como base la fibrina y las fibras obtenidas de la digestión de la

conjuntiva porcina descelularizada. En ambos andamiajes, se han cultivado simultáneamente los dos tipos celulares de la conjuntiva: en la segunda generación, las células estromales se inyectaron en el interior de la conjuntiva y en la tercera generación se combinaron con fibrina y con fibras de conjuntiva descelularizada; las células epiteliales se cultivaron sobre la superficie. Los estudios realizados a las dos semanas de cultivo mediante técnicas de histología, así como microscopía electrónica de barrido, mostraron la estratificación de células epiteliales en la superficie y una correcta adhesión y distribución de las células estromales en el interior de los andamiajes. En los sustitutos conjuntivales resultantes se ha determinado la composición bioquímica.

En conclusión, los resultados de nuestro estudio han demostrado que la aplicación de las técnicas de cultivo celular y de ingeniería tisular, han permitido generar un equivalente de la conjuntiva del cerdo, estructuralmente análogo a la conjuntiva nativa de este animal, utilizando diferentes andamiajes tridimensionales biológicos.

## 2.2. SUMMARY

The reconstruction of the ocular surface by tissue engineering represents a therapeutic modality with great prospects. The restoration of the conjunctiva is an essential part of ocular surface regeneration, especially when a large area or the whole ocular surface is affected, as occurs in patients with ocular cicatricial pemphigoid, Stevens-Johnson syndrome, toxic epidermal necrolysis, or thermal and chemical burns. The conjunctival surface must be first repaired and a deep fornix is restored in these situations.

In this study, we have established a serie of steps that have been encompassed into three chapters to develop an in vitro model of conjunctiva.

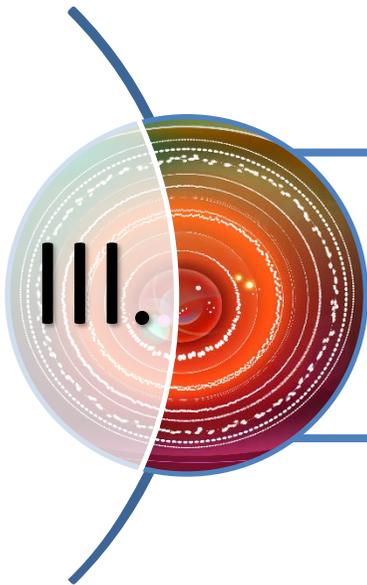
The conjunctiva samples for carrying out this work have been of porcine origin. In the first chapter, it has managed to optimize a digestion protocol based on the sequential action of two enzymes: collagenase type I and Trypsin / EDTA solution for obtaining stromal cells and epithelial cells, respectively. It was determined that the isolated cellular components retained their phenotypic characteristics during in vitro expansion by immunofluorescence. The bulbar conjunctiva area has been defined as the anatomical location for biopsies extraction, because the isolated epithelial cells have ability to synthesize mucins.

They have been designed fibrin hydrogels in the second chapter of this study, called first-generation of three-dimensional scaffolds, using the fibrin from fresh plasma and from cryoprecipitate of fresh plasma as biological biomaterial. Stromal cells have been grown inside the scaffold and epithelial cells on their surface. The histological and scanning electron microscopy analysis at two weeks of culture showed good adhesion and distribution of the stromal cells within scaffolds and stratification of epithelial cells on the surface. It has also been determined the biochemical composition of the resulting conjunctival substitutes.

Finally, in the third chapter of this work it has been applied a decellularization protocol for obtaining acellular conjunctiva. The acellular conjunctiva characterization has been carried out through microstructural studies, cell viability, cytotoxicity, biomechanical and biochemical assays. This acellular conjunctiva has been used as biomaterial in the design of conjunctival substitutes. As second generation of scaffolds has been used the decellularized porcine conjunctiva. For the third generation of three-dimensional scaffolds has been developed an innovative formulation based on fibrin and fibers derived from digestion of decellularized porcine conjunctiva. In both generations of scaffolds have been cultured simultaneously the two types of conjunctival cells. Stromal cells were injected into the inside of the decellularized conjunctiva in the second generation. Stromal cells have been combined with fibrin and fibers from decellularized

conjunctiva in the third generation. Epithelial cells were cultured on the surface. The histological and scanning electron microscopy analysis at two weeks of culture showed stratification of epithelial cells on the surface and good adhesion and distribution of the stromal cells within the scaffolds. It has been determined the biochemical composition in the resulting conjunctival substitutes.

In conclusion, the results of our study have showed that the application of cell culture and tissue engineering techniques have allowed generate an equivalent of the porcine conjunctiva, structurally similar to the native conjunctiva of this animal, by using different biological three-dimensional scaffolds.



III.

## INTRODUCCIÓN



Gracias a los sentidos obtenemos la información vital que nos permite relacionarnos con el mundo que nos rodea. Una de las principales capacidades sensoriales del ser humano es la visión, pues a través de ella conseguimos la mayor parte de la información con la que conocemos e interpretamos nuestro entorno.

El órgano de la visión está compuesto por los globos oculares, el aparato lagrimal, los párpados y los músculos; denominando superficie ocular a la parte anterior del ojo, donde se distinguen: la película lagrimal, la córnea, el limbo y la conjuntiva. Existe una interdependencia entre todas estas estructuras que son las encargadas de dar funcionalidad a la superficie ocular.

### 3.1. El órgano de la visión

El ojo humano, denominado por su forma globo ocular, es el órgano anatómico que recoge en su interior la estructura que hace posible el proceso de la visión<sup>1</sup>.

Es un órgano par situado a ambos lados del plano sagital, protegido por grasa y tejidos blandos y por las paredes óseas que componen las cavidades orbitarias, donde además del globo ocular se alojan el nervio óptico, los músculos oculares, la glándula lagrimal, los vasos y los nervios. Los párpados, las pestañas y las lágrimas actúan como protectores del ojo<sup>2</sup>.

#### 3.1.1. Globos oculares

El globo ocular es una esfera de unos 24 mm de diámetro anteroposterior, está formado de fuera a dentro por tres capas concéntricas (Figura 1).

La capa exterior es la *túnica fibrosa o córneo-escleral* que se compone de dos segmentos esféricos; el anterior la córnea, es la porción más pequeña y prominente; el posterior es la esclerótica. Revistiendo los párpados por su cara posterior (interior) y parte de la esclera anterior (por su exterior) está la conjuntiva, membrana en la que se vierte la secreción lagrimal que participará en la nutrición y protección de las capas superficiales de la córnea.

La capa intermedia (úvea) es la *túnica vascular*, la componen por delante, el iris, por detrás, la coroides y, la unión de ambos, un engrosamiento que se conoce con el nombre de cuerpo ciliar.

La capa interna, *túnica nerviosa* es la retina, que se continúa por delante con la capa profunda del cuerpo ciliar y del iris.

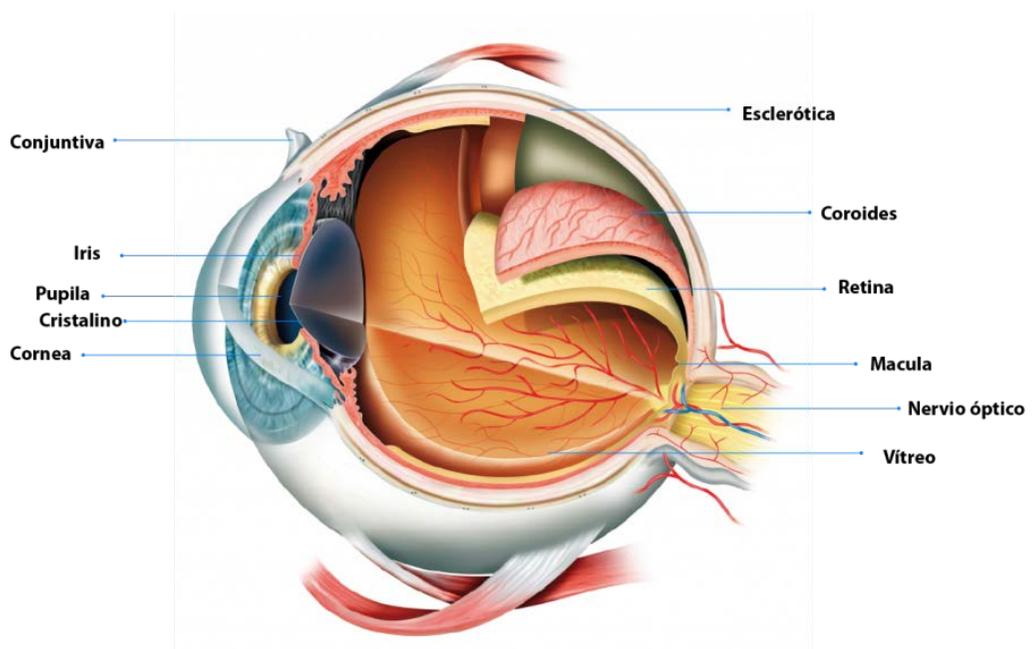


Figura 1. El órgano de la visión. Estructura del globo ocular: túnica fibrosa, túnica vascular y túnica nerviosa. Modificado y traducido de *Eye Anatomy, Functions and Structure*.

### 3.1.2. Aparato lagrimal

El aparato lagrimal se constituye de una parte secretora y una excretora. La función secretora la realiza la glándula lagrimal principal, así como las glándulas accesorias.

La glándula lagrimal principal se sitúa en la pared superotemporal e interna de la órbita; consta de dos lóbulos, uno ligado a la pared ósea y el otro cerca de la órbita. Dicha glándula secreta líquido a los fondos de saco superiores a través de túbulos que nacen de los acinos glandulares. El producto de la secreción es la lágrima. Ésta es el componente acuoso de la película lagrimal y está formada por agua y sustancias sólidas disueltas. Los componentes sólidos más notables son cloruro de sodio, albúminas y globulinas. La glándula lagrimal principal produce la secreción refleja, de tal manera que ante estímulos dañinos, irritativos y psicógenos, la glándula lagrimal principal es la que vacía su contenido sobre la superficie ocular.

Las glándulas lagrimales accesorias se sitúan en los párpados y fondos de saco, y reciben el nombre de glándulas de Krause y Wolfring; son múltiples, 50 en cada ojo, y vierten su secreción de manera constante. Ésta se llama secreción lagrimal basal y es la que mantiene húmeda la superficie ocular de manera continua.

Con cada parpadeo, la película lagrimal se distribuye de manera homogénea sobre la superficie. El menisco lagrimal se acerca al aparato excretor de la lágrima, renovándose de modo constante, a lo cual contribuyen los distintos componentes de la lágrima.

### 3.1.3. Párpados

Los párpados constituyen la primera barrera mecánica de protección del globo ocular frente a estímulos externos<sup>3,4,5</sup>. Son pliegues cutáneos modificados que se continúan con el resto de la piel facial.

En cuanto a su estructura (Figura 2) podemos distinguir de fuera a dentro cuatro capas:

1.-*Piel*: reviste la cara anterior de los párpados y está constituida por la dermis y la epidermis.

2.-*Capa muscular*:

- Músculo orbicular inervado por el nervio facial, responsable del parpadeo.
- Músculo elevador del párpado, inervado por el III par.
- Músculo de Müller o tarsal superior y el músculo tarsal inferior inervados por el simpático. Junto con el elevador son los responsables del tono palpebral.

3.-*Capa fibrosa*:

- Tarsos palpebrales: tejido fibroso que soporta las demás estructuras. En su interior se alojan las glándulas de Meibomio.
- Septos orbitarios: se continúan desde los tarsos al reborde orbitario.
- Ligamentos palpebrales externo e interno: mantienen unidos los tarsos a los rebordes orbitarios lateral y medial.

4.-*Conjuntiva palpebral*: recubre el párpado en su superficie interna.

El borde palpebral se divide en una parte anterior y otra posterior por la línea gris. Las pestañas se originan en la parte anterior, en cuyos folículos van a desembocar las glándulas de Zeis, consideradas glándulas sebáceas modificadas. Las glándulas de Moll son glándulas sudoríparas modificadas, que pueden desembocar en el folículo de la pestaña, o bien directamente en el borde palpebral anterior. Los conductos de las glándulas de Meibomio se localizan en la parte posterior de la línea gris. Éstas junto con las de Zeis se encargan de formar la capa lipídica externa de la película lagrimal precorneal.

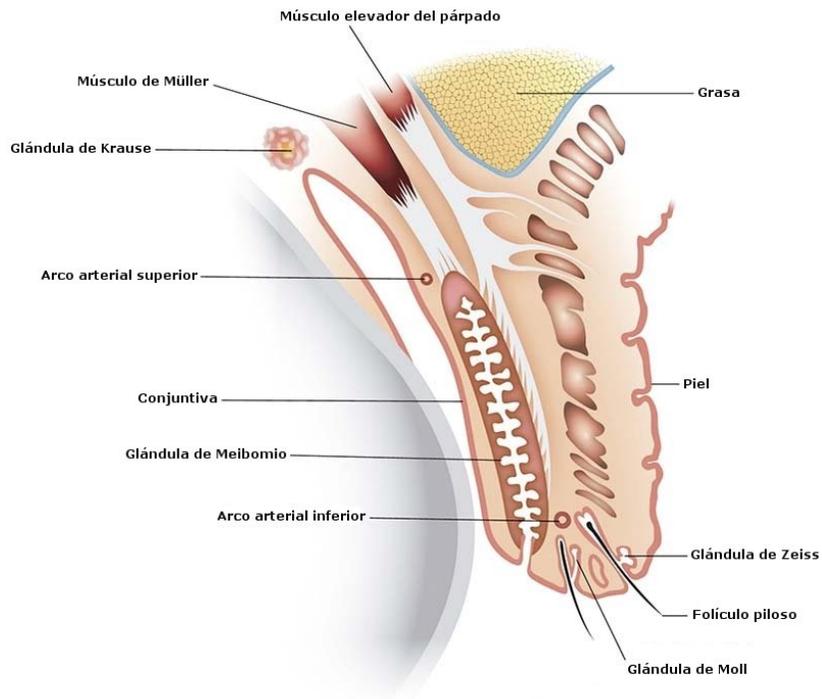


Figura 2. Anatomía del párpado. Modificado de Manual Moderno sección Oftalmología.

La función de los párpados es el parpadeo, con él se distribuye y se renueva la película lagrimal. Los párpados se cierran en forma de cremallera; este mecanismo les permite empujar la película lagrimal hacia el borde interno, haciendo llegar la lágrima al punto lagrimal (orificio de salida que se encuentra situado inmediatamente por detrás de la última pestaña interna), lo cual facilita la evacuación lagrimal<sup>6</sup>.

#### 3.1.4. Músculos oculares

En el globo ocular hay 6 músculos que se adhieren a él para facilitar el movimiento. Estos músculos trabajan para rotar y mover el ojo hacia arriba, hacia abajo y hacia los lados (Figura 3).

El músculo recto superior es un músculo extraocular que se adhiere a la parte superior del ojo y lo mueve hacia arriba.

El músculo recto inferior se adhiere a la parte inferior del ojo y lo mueve hacia abajo.

El músculo recto medial es un músculo extraocular que se adhiere a la parte interna del ojo cerca de la nariz y lo mueve hacia adentro.

El músculo recto lateral se adhiere al ojo en la parte lateral y lo mueve hacia afuera.

El músculo oblicuo superior es un músculo extraocular que se origina en la parte posterior de la órbita y viaja a través de una polea que se localiza cerca de la nariz, para posteriormente insertarse en la parte superior del ojo. El músculo oblicuo superior rota el ojo en el sentido de las manecillas del reloj. Este músculo también mueve el ojo hacia abajo.

El músculo oblicuo inferior se inserta a la parte anterior de la órbita cerca a la nariz y viaja hasta insertarse en la parte inferior del ojo. Este músculo rota el ojo en sentido contrario a las manecillas del reloj y hacia arriba.

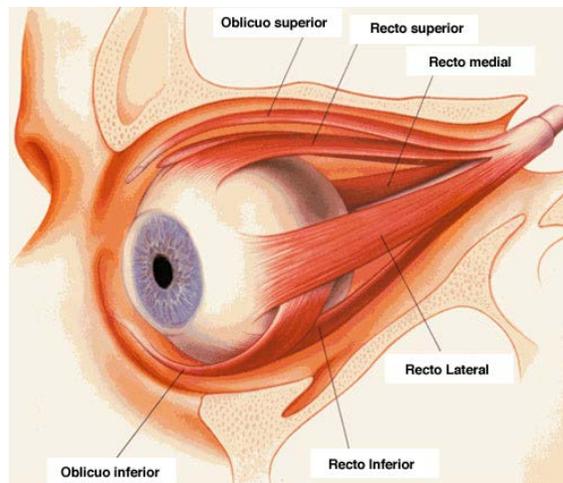


Figura 3. Anatomía de los músculos extraoculares. Modificado y traducido de American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus.

## 3.2. La superficie ocular

La superficie del ojo es un componente extraordinario y vital para el proceso de la visión.

El concepto de superficie ocular incluye a todas las estructuras oculares y anejos que se encuentran en contacto con el exterior. A diferencia de todos los demás epitelios húmedos de la superficie del cuerpo, la superficie ocular está directamente expuesta al exterior, estando especialmente sujeta a la desecación, las lesiones y los patógenos. Como consecuencia, numerosos mecanismos de protección son proporcionados por el sistema de la superficie ocular para asegurar la visión<sup>7,8</sup>.

La superficie ocular se define como una unidad anatómica, fisiológica, histológica y patológica constituida por la película lagrimal y por los epitelios que recubren las superficies palpebrales, la córnea, el limbo y la conjuntiva<sup>9</sup>.

El epitelio corneal requiere de un sistema de mantenimiento y defensa para permitir al ojo su relación con el exterior y que le provea de una humectación constante. La conjuntiva, los párpados y el aparato lagrimal están dirigidos fundamentalmente hacia ese mantenimiento<sup>10</sup>.

La función principal de la superficie ocular es permitir la visión manteniendo la transparencia corneal y protegiendo al globo ocular de los agentes externos tóxicos, infecciosos y traumáticos<sup>11</sup>. Para cumplir esta función, la superficie ocular debe mantener la integridad estructural, así como un continuo equilibrio fisiológico.

La interdependencia de las estructuras que componen la superficie ocular y su influencia sobre el epitelio corneal hace que sea necesaria su correcta integridad para garantizar la salud del ojo.

### 3.2.1. La película lagrimal

La película lagrimal es una estructura de tres capas, compuesta por una capa superficial lipídica, un componente acuoso y una capa basal mucosa (Figura 4)<sup>12</sup>. Los tres componentes mayoritarios de la lágrima funcionan conjuntamente para mantener la estructura general.

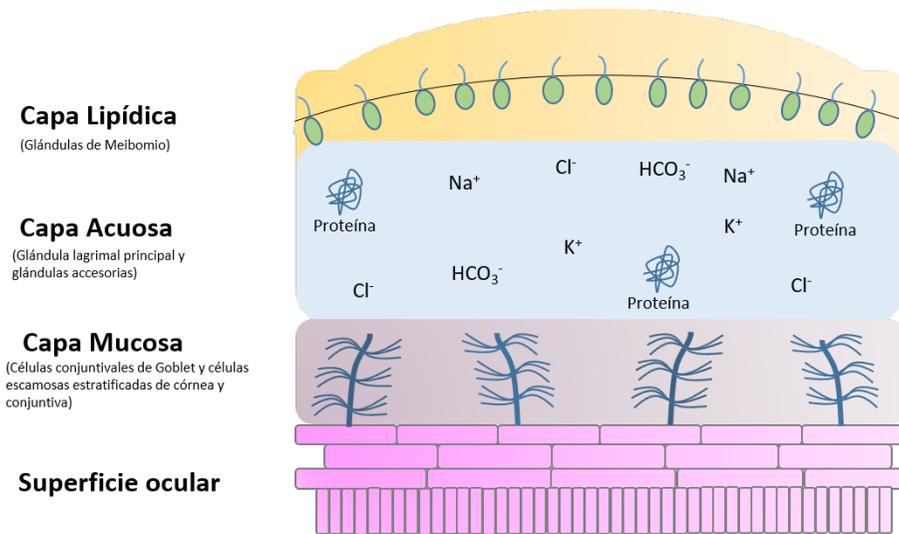


Figura 4. Estructura de la película lagrimal: componentes principales.

La capa externa o lipídica provee una superficie oleosa que retarda la evaporación de la lágrima. La capa intermedia o capa acuosa está compuesta principalmente por agua, así como sales y proteínas. La capa basal o mucosa cubre directamente la superficie ocular facilitando que el resto de capas conformen una película<sup>13</sup>.

El origen, los componentes principales y las funciones de cada capa se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Estructura de la película lagrimal: origen, componentes principales y funciones.

ESTRUCTURA	ORIGEN	COMPONENTES PRINCIPALES	FUNCIONES
Capa lipídica	Glándulas de Meibomio	Ésteres de colesterol Ésteres de ceras	Evita la evaporación Proporciona una superficie ópticamente suave
Capa acuosa	Glándulas lagrimales	Agua Proteína Sales	Bacteriostática Limpieza del debris Mantenimiento de la hidratación epitelial
Capa mucosa	Células conjuntivales de Goblet Glándulas de Moll y Krase	Glicoproteína	Convierte en hidrófila la superficie epitelial para que la capa acuosa la humecte

### 3.2.2. La córnea

La córnea es una de las estructuras más especializadas de la superficie corporal. Es la estructura más externa y frontal del globo ocular; junto con los párpados y el sistema lagrimal, la conjuntiva bulbar y tarsal, los fórnix conjuntivales, el limbo, y la película lagrimal conforma la superficie ocular. Todas estas estructuras permiten proteger al ojo de agresiones externas y mantener la transparencia e integridad de la superficie corneal y del medio intraocular.

Una de las principales características de la córnea es su transparencia<sup>14</sup>, condición indispensable para permitir el paso de la luz. Para mantener esta transparencia la córnea es avascular, es decir, carece de vasos sanguíneos por lo que la mayor parte de los nutrientes (carbohidratos, vitaminas, aminoácidos) y otros sustratos son aportados por el endotelio (capa más interna).

La córnea es un tejido altamente diferenciado que permite la refracción y la transmisión de la luz. Su forma consiste básicamente en una lente cóncavo-convexa con una cara anterior, en contacto íntimo con la película lagrimal precorneal y otra cara posterior, bañada por el humor acuoso. Estas relaciones permiten a la córnea carecer de vascularización, pues estos líquidos son los máximos responsables de mantener sus requerimientos fisiológicos.

La córnea<sup>15</sup> se compone de un epitelio estratificado escamoso no queratinizado, un estroma de tejido conectivo y una monocapa celular endotelial. Aunque este tejido avascular es aparentemente simple en su composición, la enorme regularidad y uniformidad de su estructura son las que permiten su precisa transmisión y refracción de la luz.

Debe destacarse que la córnea, por añadidura, debe cumplir sus funciones en contacto con el exterior, con todas las agresiones posibles por sequedad, contaminación, bacterias, etc. Para ello necesita de unos sistemas protectores y de soporte que constituyen los anejos oculares la conjuntiva, el aparato lagrimal y los párpados.

### 3.2.2.1. Histología

La córnea histológicamente<sup>16</sup>, desde la superficie externa hasta la interna, consta de 6 capas (Figura 5).

*Epitelio corneal*: epitelio de tipo escamoso estratificado no queratinizado, consta de 4 a 7 capas de células, que se van aplanando a medida que se hacen más superficiales.

*Capa de Bowman*: también conocida como lámina anterior, es una capa acelular constituida por fibras de colágeno localizadas de forma aleatoria. En esta región se encuentran las terminaciones nerviosas que dan al epitelio.

*Estroma corneal*: es la capa más gruesa de la córnea, representa el 90% del espesor total corneal. Está compuesta por fibras de colágeno organizadas paralelamente, lo que le proporciona la característica de transparencia a la córnea<sup>17</sup>.

*Capa de Dua*: debe su nombre a su descubridor<sup>18</sup> en el año 2013. Se trata de una capa de 15  $\mu\text{m}$  de grosor, compuesta por fibras de colágeno tipo I, organizadas longitudinal, transversal y oblicuamente.

*Membrana de Descemet*: también conocida como lámina posterior, está formada por varios tipos de colágeno y organizada de forma hexagonal lo que le proporciona gran resistencia.

*Endotelio*: es la capa más profunda, constituida por una monocapa de células hexagonales incapaces de regenerarse. Gracias a su función de bombeo, es capaz de mantener un adecuado estado de hidratación de las capas suprayacentes; bombea iones para evitar la deshidratación del estroma a la vez que lo oxigena. También es importante para el mantenimiento de la transparencia de la córnea.

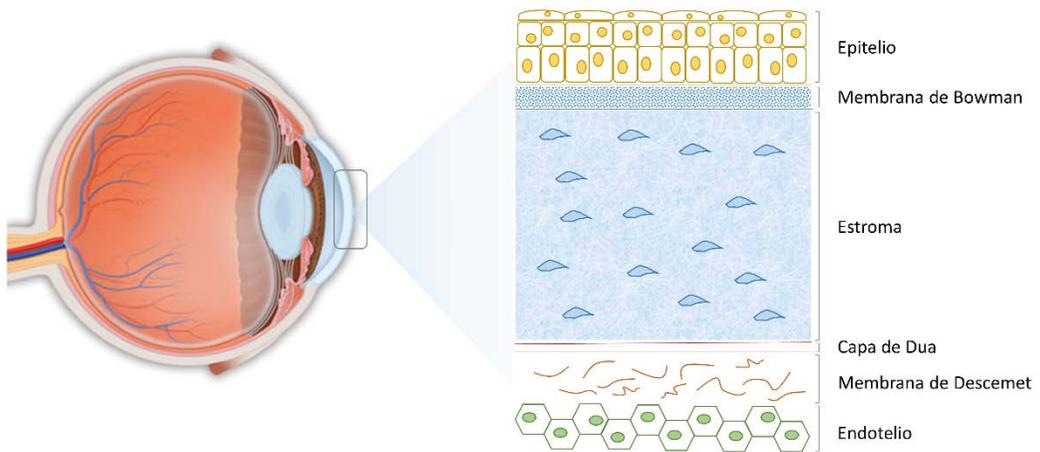


Figura 5. Estructura de la córnea. Resumen gráfico de las diferentes capas.

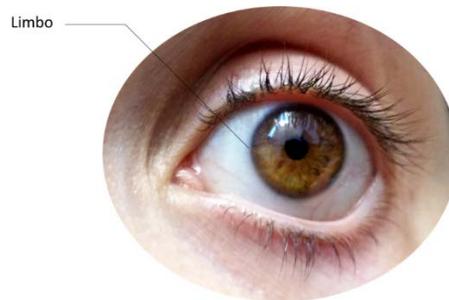
### 3.2.2.2. Funciones

La córnea tiene dos funciones principales, basadas en su transparencia y su localización como barrera. Por un lado, su transparencia permite la transmisión de la luz, a la vez que su elevado poder de refracción ayuda a la focalización de la misma en el fondo del ojo para la posterior formación de la imagen de manera nítida sobre la retina. Por otro lado, actúa protegiendo las estructuras intraoculares, como una barrera mecánica y química entre el medio ambiente y el interior del globo ocular.

En resumen, sus principales funciones son permitir la transmisión y refracción de la luz, contener la presión intraocular y proporcionar una interfaz de protección con el medio ambiente.

### 3.2.3. El limbo

El limbo constituye la zona de transición entre la córnea y la esclero-conjuntiva. Macroscópicamente, se distingue como una línea grisácea de 2 mm de espesor que rodea la córnea (Figura 6).



*Figura 6. Localización anatómica del limbo en la superficie ocular.*

Se trata de una región altamente vascularizada. Los vasos sanguíneos que posee desempeñan un papel muy importante en los procesos inflamatorios de la córnea. Sus células madre se regeneran constantemente, moviéndose desde la periferia hacia el centro y desde las capas más profundas hacia la superficie, donde acaban su vida útil cada siete días<sup>19</sup>. Cuando este proceso de regeneración se interrumpe, ocasiona molestias, opacidad en el ojo y pérdida de visión.

#### 3.2.3.1. Histología

Histológicamente, el limbo está formado por el epitelio limbar, la membrana basal y el estroma limbar (Figura 7).

**Epitelio limbar:** se encuentra situado entre el epitelio corneal y el epitelio conjuntival, manteniendo características de ambos<sup>20</sup>. Las células madre del epitelio limbar poseen una alta actividad mitótica y están protegidas frente a agresiones externas al localizarse en las empalizadas de Vogt<sup>21-23</sup>. Se diferencia del epitelio corneal por poseer células de Langerhans y melanocitos.

**Membrana basal:** carece de células y está compuesta por fibras de colágeno, glicoproteínas y proteoglicanos<sup>24</sup>.

*Estroma limbar:* posee fibroblastos como componente celular, que interaccionan con el epitelio limbar a través de la producción de citoquinas y factores de crecimiento<sup>25</sup>.

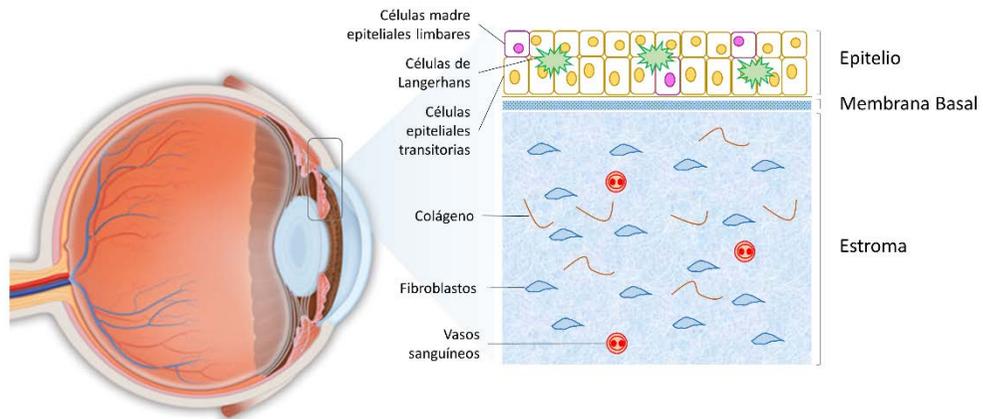


Figura 7. Estructura del limbo. Componentes principales de cada capa.

### 3.2.3.2. Funciones

Entre las funciones del limbo<sup>26,27,28</sup> destaca la renovación y reparación del epitelio corneal, así como contribuir a la nutrición de la periferia corneal. El limbo es el encargado de mantener la presión intraocular, además de actuar como barrera impidiendo la conjuntivalización corneal. Destaca también su papel como responsable de las reacciones de hipersensibilidad a nivel corneal.

Un fracaso en las células madre limbares se traduce como un epitelio corneal anormal que es reemplazado por un epitelio más opaco al ser invadido por los vasos sanguíneos conjuntivales, provocando la pérdida de la visión. El trasplante de tejido limbal sano o epitelio limbal cultivado que contiene células madre limbares se ha demostrado en numerosos estudios que es capaz de reestablecer el epitelio corneal<sup>29,30</sup>.

### 3.2.4. La conjuntiva

La conjuntiva es una membrana delgada, transparente y mucosa que cubre la superficie posterior de los párpados y luego se refleja sobre el globo ocular, donde se extiende hasta el limbo<sup>31</sup>. La conjuntiva toma su nombre porque se conjuga con los párpados del

globo ocular. Esta unión es indirecta, con la conjuntiva que forma un fondo de saco en tres lados del globo y una plica extensible en el cuarto lado. Tal disposición permite que el globo y los párpados se muevan independientemente uno del otro<sup>32</sup>.

### 3.3. La conjuntiva

La conjuntiva es la membrana mucosa transparente<sup>33</sup> que reviste la superficie posterior de los párpados (conjuntiva tarsal o palpebral) y que tapiza a su vez la parte anterior del globo ocular (conjuntiva bulbar), formando el llamado saco conjuntival (fórnix) (Figura 8). A pesar de su pequeño tamaño, la conjuntiva juega un papel vital en la visión y en la inmunidad, debido a que protege físicamente a las delicadas estructuras del ojo, al actuar como una barrera mecánica frente a sustancias extrañas. Además, la conjuntiva ayuda a lubricar el globo ocular, produciendo la capa mucosa de la película lagrimal.

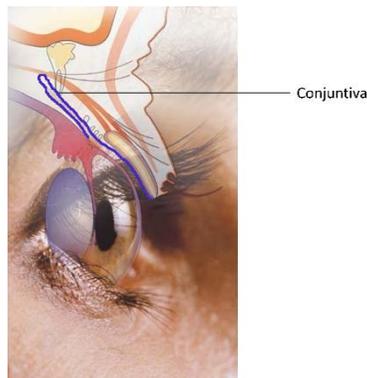


Figura 8. Localización anatómica de la conjuntiva en la superficie ocular. Adaptado de *Anatomy of the Conjunctiva. Ophthalmology Atlas*.

Aunque la conjuntiva constituye un continuo, se divide en 3 secciones con fines descriptivos (Figura 9).

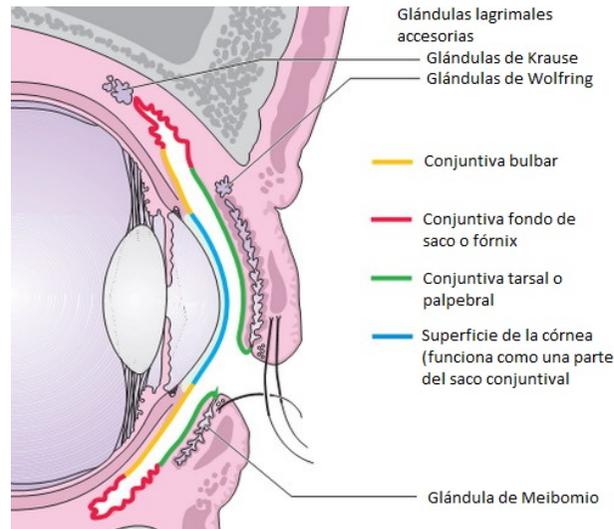


Figura 9. Zonas de la conjuntiva. Adaptado de *Anatomy of the Conjunctiva. Ophthalmology Atlas*.

#### Conjuntiva bulbar:

Es la sección de menor grosor de la conjuntiva. Anatómicamente recubre la parte libre del globo ocular y en función de su localización se divide en tres secciones:

- ❖ Sección esclerótica: se localiza delante de los tendones de los cuatro músculos rectos. Es delgada y transparente, dejando ver en toda su extensión el color blanco de la membrana subyacente. Está unida a la esclerótica por un tejido celular laxo, que se confunde insensiblemente con la parte anterior de la cápsula de Tenon.
- ❖ Sección corneal: la conjuntiva se adhiere íntimamente al contorno de la membrana corneal y forma, en la línea de soldadura esclerocorneal, una zona circular de estructura particular y de reacción patológica especial, que se designa con el nombre de limbo o anillo conjuntival. Pasado el limbo, ya encima de la córnea, la conjuntiva pierde su corion, constituyendo la capa epitelial anterior de la córnea reforzada con la lámina elástica anterior.
- ❖ Sección del ángulo interno: destaca la carúncula lagrimal como pequeña eminencia rojiza, que ocupa el espacio que interceptan entre sí las porciones lagrimales de los dos párpados. Está constituida por una masa de 10 a 12 folículos pilosos provistos de glándulas sebáceas, glándulas sebáceas

independientes y glándulas acinotubulares de Krause (glándulas lagrimales accesorias conjuntivales).

#### *Conjuntiva del fondo de saco o fórnix:*

Es la sección que engloba el repliegue formado por la mucosa conjuntival al pasar del párpado al globo ocular. Se trata de un fondo de saco irregularmente circular que corresponde sucesivamente al surco orbitopalpebral superior, al surco orbitopalpebral inferior, a la comisura interna y la comisura externa.

#### *Conjuntiva palpebral o tarsal:*

Es la sección adherida íntimamente a la cara posterior de los tarsos y, relacionándose más allá de estos, con las fibras musculares lisas del músculo de Müller. En el borde libre de los párpados se une a la piel, formándose a nivel de su unión una clara línea divisoria, la línea gris. Cerca del fondo de saco presenta una serie de pliegues transversales que empiezan en el borde orbitario del tarso y limitan surcos dirigidos en igual sentido.

### 3.3.1. Histología

La conjuntiva está constituida por un tejido epitelial mixto de recubrimiento y secretor glandular, que reposa sobre un tejido trofomecánico subyacente, del que está separado por una membrana basal (Figura 10).

La conjuntiva se compone de una capa de epitelio no queratinizado estratificado y de una capa profunda denominada estroma o lámina propia.

#### *Capa epitelial:*

El epitelio conjuntival consta de 2 a 5 estratos celulares. La capa basal está compuesta por células cuboideas y en los estratos superiores las células adoptan morfología poliédrica.

El estrato superficial está compuesto por células aplanadas hexagonales que presentan microvellosidades que van a aumentar la superficie de absorción favoreciendo así el anclaje de la película lagrimal. La expresión de glicoproteínas promueve la formación de un glicocálix altamente hidrofílico, al cual se adhiere la película lagrimal e impide a su vez la adherencia bacteriana. La capa basal epitelial se ancla a su membrana basal y al estroma subyacente a través de hemidesmosomas.

El epitelio de la conjuntiva tarsal suele tener menos estratos celulares y la morfología tiende a ser de aspecto cuboideo, mientras que en los fondos de saco es de aspecto columnar. Se ha identificado una población de células madre del epitelio conjuntival, que se localizan en mayor cantidad en los fondos de saco. Las mucinas son glicoproteínas de alto peso molecular, con una alta proporción de carbohidratos y constituyen el principal componente de la capa más interna de la película lagrimal. El epitelio conjuntival participa en la síntesis de mucinas. Destaca la mucina secretora MUC5AC que es producida por las células caliciformes<sup>34,35</sup>.

El epitelio conjuntival juega un papel importante para garantizar la claridad óptica de la córnea proporcionando lubricación para mantener una superficie lisa de refracción, mediante la producción de mucinas que estabilicen la película lagrimal y la protección frente a la tensión mecánica y los agentes infecciosos.

#### *Estroma o lámina propia:*

El estroma conjuntival es un tejido conectivo laxo altamente vascularizado donde predominan las células inmunitarias: linfocitos, mastocitos, células plasmáticas y neutrófilos. Este tejido se divide a su vez en dos capas:

- ❖ Capa superficial o linfoide: se adhiere a la membrana basal del epitelio. Está formada por mallas conjuntivas y en ella se encuentran gran cantidad de linfocitos formando una capa linfoide, que en ausencia de inflamación forman pequeños nódulos, pero no folículos.
- ❖ Capa profunda o fibrosa: se compone de tejido colágeno y elástico y contiene vasos sanguíneos, nervios y algunas glándulas.

El estroma de la conjuntiva bulbar hacia el limbo se funde con la cápsula de Tenon (epiesclera); se caracteriza por ser muy laxo facilitando la movilidad del globo ocular. Por el contrario, el estroma de la conjuntiva tarsal está firmemente adherido al tarso, destacando este segmento por su escasa movilidad. En el estroma de la conjuntiva tarsal se ubican las glándulas lagrimales accesorias de Wolfring. La conjuntiva en los fondos de saco es redundante, formando varios repliegues denominados criptas de Henle<sup>36</sup>.

En el fórnix, existe una mayor concentración de glándulas lagrimales accesorias de Krause, así como acúmulos linfocitarios y células plasmáticas productoras de inmunoglobulina A, que atraviesa el epitelio y se disuelve en la película lagrimal.

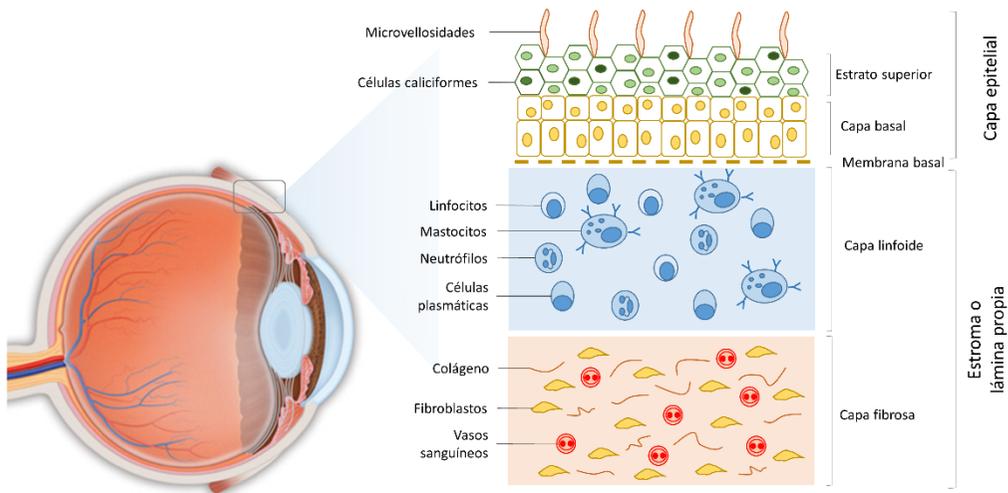


Figura 10. Estructura histológica de la conjuntiva. Componentes principales de cada capa.

### 3.3.2. Células calciformes

Las células calciformes, se encuentran distribuidas en la superficie ocular intercaladas entre las células epiteliales, predominando una mayor concentración en la carúncula, pliegue semilunar y fondos de saco<sup>36</sup>. Se estima que las células calciformes constituyen el 5 a 10% de la población epitelial conjuntival. Morfológicamente se caracterizan por poseer un citoplasma con abundantes gránulos electrodensos de mucina, un aparato de Golgi prominente y un núcleo localizado en el citoplasma basal. Suelen encontrarse en la mitad externa del epitelio conjuntival, en ocasiones unidas por una extensión hacia la membrana basal, y conectadas mediante desmosomas a las células epiteliales adyacentes.

La secreción mucosa de las células calciformes facilita la adherencia de la película lagrimal al epitelio corneal. La mucina<sup>37,38,39</sup> lubrica y protege las células epiteliales, reduciendo la tensión superficial de la película lagrimal asegurando su estabilidad y favoreciendo la captura y el arrastre de cuerpos extraños y bacterias. La renovación y multiplicación del epitelio conjuntival y las células calciformes depende de la vitamina A y los retinoides, en cuya ausencia se producen las formas más graves de ojo seco<sup>40-42</sup>. Se denomina metaplasia escamosa a la transformación del epitelio conjuntival secretor en un epitelio queratinizado no secretor, asociado a una disminución significativa de la densidad de las células calciformes. De este modo, la capa mucosa de la película

lagrimal disminuye, la película lagrimal se vuelve inestable, y el epitelio conjuntival y corneal se lesionan. Los procesos inflamatorios crónicos cicatriciales, como quemaduras químicas, síndrome de Sjögren, penfigoide ocular cicatricial y Stevens-Johnson, están relacionados con una disminución en la densidad de las células caliciformes.

### 3.3.3. Glándulas de la conjuntiva

Además de las células caliciformes, se distinguen dos tipos distintos de disposiciones descritos como formaciones glandulares<sup>43</sup>.

- ❖ Glándulas tubulosas de Henle: localizadas en el fondo de saco de la conjuntiva tarsal y formadas por una inflexión del epitelio en el estroma. Carecen de red vascular propia.
- ❖ Glándulas acinosas de Krause y de Wolfring: son formaciones análogas a las glándulas lagrimales, proporcionan el componente acuoso de la película lagrimal. Las glándulas de Krause se encuentran a nivel de fórnix superior. Las glándulas de Wolfring se localizan a nivel tarsal, sobre las glándulas de Meibomio. Las glándulas de Meibomio son glándulas sebáceas localizadas en los párpados superior e inferior, encargadas de producir la capa lipídica de la película lagrimal previniendo su evaporación.

### 3.3.4. Funciones

Las dos funciones principales de la conjuntiva se describen a continuación:

- ❖ Aportar la capa mucosa de la película lagrimal.

La conjuntiva protege a la córnea y por lo tanto el interior del ojo desde el entorno externo gracias a las mucinas secretoras, proteínas antibacterianas, electrolitos y agua que le permiten formar la capa mucosa interna de la película lagrimal. Sin estas secreciones conjuntivales, se podrían desarrollar una variedad de enfermedades por deficiencia de mucosa que conducen a graves daños en la córnea afectando a una correcta visión.

- ❖ Participar en el sistema de defensa del ojo.

La conjuntiva normal constituye una barrera natural a la invasión por sustancias exógenas biológicas o inertes; posee un enorme potencial de respuesta a la infección dada su alta vascularización, gran cantidad de células inmunitarias y secreción de inmunoglobulinas y enzimas bactericidas. Su superficie externa está constituida por un epitelio estratificado de gran cohesión, situados sobre una lámina linfocitaria, que se moviliza rápidamente ante cualquier estímulo antigénico, interviniendo en la síntesis local de anticuerpos; siendo capaz de absorber sustancias diluidas en la película lagrimal por fagocitosis o por difusión a través de las uniones intercelulares.

### 3.3.5. Patologías asociadas y enfoque terapéutico

Existen numerosas patologías que llevan asociadas la afectación de toda la superficie ocular o de un área lo suficientemente extensa. En estos casos, la reconstrucción de la conjuntiva constituye una parte esencial en la regeneración de la superficie ocular, como ocurre en pacientes con penfigoide ocular cicatricial, síndrome de Stevens-Johnson, necrosis epidérmica tóxica, o quemaduras térmicas o químicas. En estas situaciones, la superficie conjuntival debe repararse para promover que el fórnix se restablezca.

#### *Penfigoide ocular cicatricial:*

Es una enfermedad sistémica de etiología autoinmune que produce daño conjuntival grave<sup>44</sup>, debido a que se manifiesta inicialmente como una conjuntivitis crónica cicatrizante. Posteriormente, se continúa con una vascularización corneal y finalmente con el fenómeno de opacificación.

Aunque es una enfermedad que afecta principalmente a la conjuntiva, con frecuencia implica a otras membranas mucosas. Las manifestaciones oculares, durante la fase aguda, consisten en una bullosa conjuntival, que conduce rápidamente a lesiones ulcerosas. Durante la fase crónica las alteraciones afectan a la estática y la dinámica palpebrales, se desarrolla el síndrome de sequedad ocular, así como lesiones corneales<sup>45</sup>.

El enfoque terapéutico asociado a este tipo de patología cicatricial ocular está basado en la terapia inmunomoduladora<sup>46,47</sup>, que ha proporcionado una vía para la preservación de la visión y la prevención de consecuencias potencialmente fatales de la penfigoide sistémica<sup>48</sup>. El tratamiento convencional persigue mejorar tanto la inflamación como la cicatrización de la conjuntiva.

También se ha utilizado la terapia quirúrgica que incluye el aloinjerto queratolimbial y el trasplante de membrana amniótica, para mejorar la rehabilitación visual en los pacientes con penfigoide ocular<sup>49</sup>.

#### *Síndrome de Stevens-Johnson y necrolisis epidérmica tóxica:*

Las complicaciones oculares del síndrome de Stevens-Johnson (SJS), si son suficientemente graves, pueden llevar a úlceras corneales recurrentes, leucoma, perforación y, finalmente, ceguera. La morbilidad causada por esta enfermedad puede deberse a complicaciones corneales agudas, pero usualmente son el resultado de la cicatrización corneal, por lo que se producen secuelas crónicas en el 35% de los pacientes<sup>50,51</sup>.

La necrolisis epidérmica tóxica (NET) es la variante más severa del síndrome de Stevens-Johnson, constituyen un espectro de la misma enfermedad, compartiendo aspectos etiológicos, patogénéticos, histológicos y terapéuticos<sup>52</sup>.

Las secuelas oculares más comunes que afectan a la mayoría de los pacientes son: ausencia de mucina en las lágrimas, pérdida de pestañas, metaplasia escamosa, cicatrices corneales, sinequias palpebrales y conjuntivales, queratitis, fotofobia persistente, ardor ocular, simblefaron, triquiasis, opacidad de córnea y ceguera.

#### *Quemaduras térmicas y químicas:*

En función del agente causante pueden ser químicas, de origen ácido o alcalino, o térmicas. Su espectro es muy amplio y va desde un daño leve, unilateral del epitelio hasta quemaduras bilaterales que amenazan la visión, con destrucción de la superficie ocular y daños de las estructuras intraoculares. Las quemaduras severas afectan a las células madre del limbo y el ojo seco asociado, provocan defectos epiteliales persistentes, así como queratitis infecciosas, lisis estromal y perforación. Las quemaduras por álcalis, a menudo tienen pobre pronóstico, ya que la saponificación de las membranas celulares desencadena la rápida penetración del álcali a través de la córnea y la esclera<sup>53,54</sup>.

#### *Síndrome de Sjögren:*

Es una enfermedad autoinmune inflamatoria. El sistema de defensa inmunitario ataca a las glándulas lagrimales<sup>55</sup> y las salivares, los linfocitos invaden las glándulas de secreción externa, evitando que funcionen adecuadamente, provocando sequedad en los ojos y en la boca.

La sequedad ocular puede tratarse con lágrimas artificiales y cirugía para cerrar los ductos lagrimales.

Cuando la superficie conjuntival presenta alguna afectación, la rápida capacidad de diferenciación de las células madre de la conjuntiva promueve su restablecimiento. Aunque el daño del epitelio conjuntival sea reparable, la destrucción severa puede ser causada por infección bacteriana (tracoma), papiloma viral, trastorno inmunológico (síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide ocular cicatricial), quemaduras térmicas, lesión química, tumor conjuntival y las condiciones post-quirúrgicas, tales como el pterigión, síndrome anoftálmico o la presencia de dispositivos de filtrado de glaucoma. Esta destrucción severa puede conducir a una disminución en el epitelio conjuntival de las células caliciformes secretoras de mucina y, en última instancia, a trastornos de la superficie ocular<sup>56</sup>. En estos casos, sería necesario un injerto de reemplazo conjuntival para eliminar o modular temporalmente cada uno de estos trastornos. El uso de células epiteliales de la conjuntiva, junto con un sustrato adecuado, puede ayudar en el desarrollo del tejido equivalente ideal para promover la regeneración de la conjuntiva<sup>32</sup>.

### 3.3.6. Tratamiento

La reconstrucción de la conjuntiva es una parte esencial en la regeneración de la superficie ocular, especialmente si un área extensa o toda la superficie ocular se ve afectada, como ocurre en pacientes con penfigoide ocular cicatricial, síndrome de Stevens-Johnson, necrosis epidérmica tóxica o quemaduras térmicas químicas. En estas situaciones, los métodos de tratamiento convencionales tienen generalmente resultados poco satisfactorios y las consecuencias a largo plazo de estos trastornos oculares son devastadoras. La ingeniería de tejidos y los avances en la investigación con células madre ofrecen nuevas alternativas prometedoras para estos retos. En este sentido, en los últimos años han surgido nuevas metodologías para la reconstrucción de la superficie conjuntival<sup>57</sup>.

## 3.4. Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos<sup>58</sup> es un nuevo área de la biotecnología que, con sus técnicas innovadoras, está haciendo posible fabricar sustitutos tisulares orgánicos a partir de pequeños fragmentos de tejidos sanos<sup>59</sup>, logrando restaurar la funcionalidad parcial o

total de tejidos u órganos dañados<sup>60,61</sup>, como lo ejemplifican los logros alcanzados con los cultivos de piel<sup>62-73</sup>, córnea<sup>74-64</sup> o cartílago<sup>75-82</sup>.

La mayoría de la información sensorial humana es adquirida a través de la vista. Por esta razón, para garantizar una buena visión, es indispensable la integridad de la superficie ocular, incluyendo la córnea y la conjuntiva<sup>83</sup>. Se cree que daños severos en las células madre epiteliales de la córnea desencadenan una enfermedad devastadora en la superficie ocular<sup>84</sup>. Por esta razón, muchos investigadores y científicos han tratado de reconstruir la superficie ocular mediante enfoques médicos y quirúrgicos<sup>29</sup>.

La reconstrucción de la superficie ocular a través de la terapia regenerativa<sup>85,86</sup> es un campo de la medicina de nuevo desarrollo que promete ser la próxima generación de modalidades terapéuticas, basado en el uso de células madre específicas de un tejido para generar sustitutos biológicos y mejorar las funciones tisulares. El logro de estos objetivos depende de tres factores principales: las células madre, las cuales tienen capacidad de proliferación y longevidad; los sustratos que determinan el nicho ambiental; y los factores de crecimiento que los apoyan adecuadamente<sup>87</sup>.

Para garantizar una función visual normal es esencial la presencia de barreras que actúen controlando el medio ambiente de los tejidos oculares en la parte anterior y posterior del ojo. Durante los últimos años, mediante ingeniería de tejidos se han establecido numerosos modelos de cultivo celular de las barreras oculares (córnea, conjuntiva y barrera hemato-retiniana). En el desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en el suministro ocular de fármacos dirigidos es indispensable poder atravesar este tipo de barreras. Estos modelos son considerados herramientas prometedoras para estudiar el transporte de drogas en los tejidos oculares y, para muchos otros fines, tales como la investigación de las condiciones patológicas oculares, y el cribado toxicológico de compuestos como alternativa a las pruebas de toxicidad *in vivo*. El desarrollo adicional de estos modelos *in vitro* requerirá de investigaciones más detalladas de las propiedades de barrera tanto de los modelos de cultivo celular como de las barreras oculares *in vivo*<sup>88</sup>.

### 3.4.1. Biomateriales

En el ámbito de la ingeniería de tejidos, los biomateriales han desempeñado un papel cada vez más importante, inspirándose en la construcción de matrices extracelulares que faciliten el cultivo de células en un ambiente tridimensional.

El tipo y el grado de sofisticación de los biomateriales han evolucionado a través de la ciencia de los materiales, la biología celular y la matriz extracelular del tejido.

Sin embargo, el logro de la traslación clínica y el éxito comercial requiere de biomateriales regenerativos que no sólo sean eficaces y seguros, sino también rentables y compatibles para que la producción sea fácilmente reproducible y favorecer la aplicación.

Los requisitos que debe cumplir un biomaterial se detallan a continuación:

- ❖ Biocompatible: debe ser aceptado por el organismo receptor, y evitar que el individuo desarrolle mecanismos de rechazo.
- ❖ No tóxico, ni carcinógeno.
- ❖ Biodegradable: presentar estabilidad química e ir degradándose durante un tiempo programado a productos no tóxicos.
- ❖ Resistente: debe poseer propiedades mecánicas.
- ❖ Diseño, tamaño y forma: deben ser los adecuados.

La clasificación de los biomateriales puede realizarse según el comportamiento cuando se implantan o según la naturaleza química que posean<sup>89</sup>. De este modo, se establecen dos grandes grupos: biomateriales sintéticos (metales, cerámicas, polímeros) y biomateriales naturales (de origen biológico).

Los metales han sido ampliamente utilizados en la fabricación de prótesis para reemplazar una parte del cuerpo o como implante para estabilizar un tejido lesionado, como por ejemplo, el titanio<sup>90</sup>. Las cerámicas, a pesar de ser mecánicamente débiles, son materiales químicamente inertes y no son susceptibles de ataque microbiano, como la hidroxiapatita<sup>91-94</sup>. Una gran variedad de polímeros sintéticos pueden ser utilizados como biomateriales, destacan el ácido poliláctico (PLA) y el ácido poliglicólico (PGA)<sup>95</sup>.

La utilización de biomateriales naturales representa la mejor alternativa como base para el diseño de andamiajes tridimensionales con fines terapéuticos, tanto en ingeniería de tejidos como en cirugía reconstructiva. Este tipo de productos se caracteriza por poseer propiedades físicas y químicas que se asemejan al tejido nativo.

El polímero natural más utilizado es el colágeno<sup>96-98</sup>, componente mayoritario del tejido conjuntivo. El colágeno se caracteriza por poseer elevada fuerza tensil<sup>99</sup>, facilitar la formación de agregados, retener el agua y facilitar la formación de geles. Además, biológicamente, favorece la adhesión celular, interacciona con plaquetas y produce la activación de los componentes del sistema de coagulación sanguínea<sup>100</sup>.

Los derivados sanguíneos<sup>101</sup>, se presentan como el biomaterial biológico idóneo para formar parte de la composición del andamiaje, por su facilidad de obtención y la posibilidad de obtener equivalentes autólogos<sup>102</sup>. La fibrina utilizada como biomaterial presenta propiedades similares al colágeno<sup>103</sup>.

El éxito de la ingeniería de tejidos implica la combinación de biomateriales con las células adecuadas tanto *in vitro* como *in vivo*. Existe la posibilidad de utilizar andamiajes de origen tisular para promover el crecimiento celular. Este tipo de andamiajes biológicos se obtienen aplicando sobre los tejidos una técnica llamada descelularización<sup>104,105</sup>.

#### 3.4.1.1. Fibrina

Los andamiajes de fibrina<sup>106</sup> se caracterizan por promover la proliferación y la adhesión celular y facilitar la correcta distribución de las células en la estructura tridimensional<sup>107,108</sup>.

En condiciones fisiológicas, la reparación tisular de un tejido dañado se inicia con la formación de una compleja red proteica a base de fibrina en la zona afectada.

En cuanto a su composición, los polímeros de fibrina consisten en un entramado de moléculas de fibrina entrecruzadas, que se originan mediante un mecanismo de coagulación a partir de monómeros de fibrinógeno.

El fibrinógeno es un precursor de la fibrina, que posee como estructura un dímero de tetrámeros ( $A\alpha, B\beta, \gamma$ )<sub>2</sub>, constituido por dos cadenas  $A\alpha$ ,  $B\beta$  y  $\gamma$  unidas por puentes disulfuro<sup>109</sup>. Es una glicoproteína de gran tamaño (340 kD) y estructura alargada (45 nm de longitud y 9 nm de diámetro). Está dividida en tres secciones: el nódulo central (dominio E) formado por 6 extremos aminoterminal de las cadenas proteicas unidos por puentes disulfuro, mientras que los nódulos externos D están formados por los extremos carboxi-terminal (Figura 11).

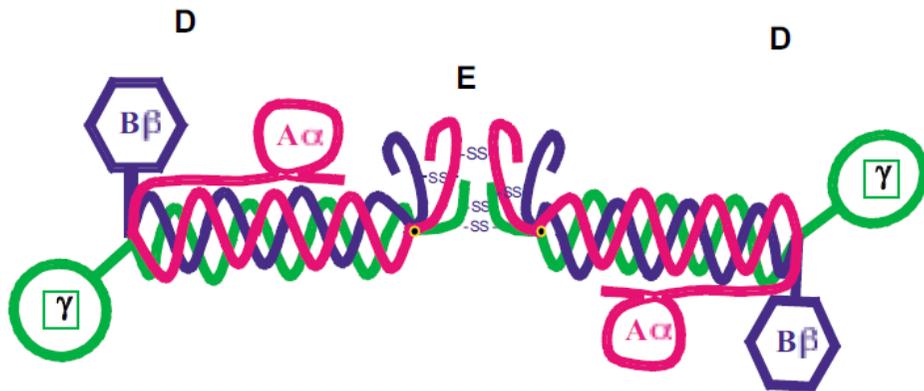


Figura 11. Estructura de la molécula de fibrinógeno. Cada cadena polipeptídica se representa de un color. Tomado de *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2007; 41 (1): 7-19<sup>110</sup>.

Las tres cadenas polipeptídicas se pliegan a través de los segmentos centrales formando una tripe α-hélice, que proporciona flexibilidad y estabilidad mecánica a la molécula<sup>111</sup>. El extremo carboxi-terminal de la cadena Aα, es un brazo flexible que puede variar su posición y conectarse con otras moléculas de fibrinógeno<sup>112</sup>.

En la molécula de fibrinógeno hay sitios constitutivos con funciones definidas (Figura 12). En el proceso de ensamblaje de la fibrina participan los dominios D. Los sitios DD contribuyen a alinear perfectamente los monómeros de fibrina, mientras que los sitios D<sub>A</sub> y D<sub>B</sub> son los huecos donde se insertan las cadenas A y B de monómeros vecinos, respectivamente. El sitio γ<sub>XL</sub> también interviene en el ensamblaje de la fibrina y al mismo tiempo ubica a las moléculas en la posición exacta para que el Factor XIII activado (F XIIIa) catalice la transglutaminación<sup>113</sup>.

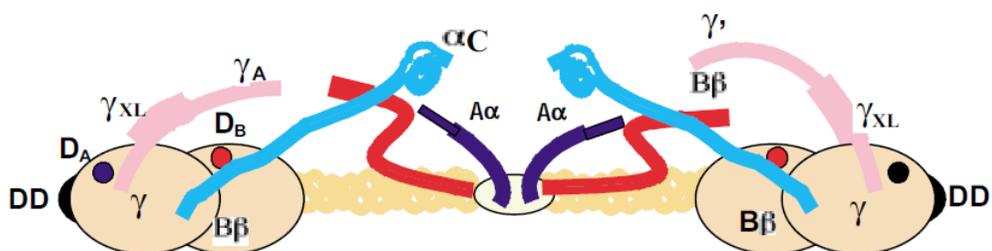


Figura 12. Sitios del fibrinógeno que intervienen en el proceso de ensamblaje de la fibrina. Tomado de *Biochemistry* 1996; 35: 10448-53.<sup>113</sup>.



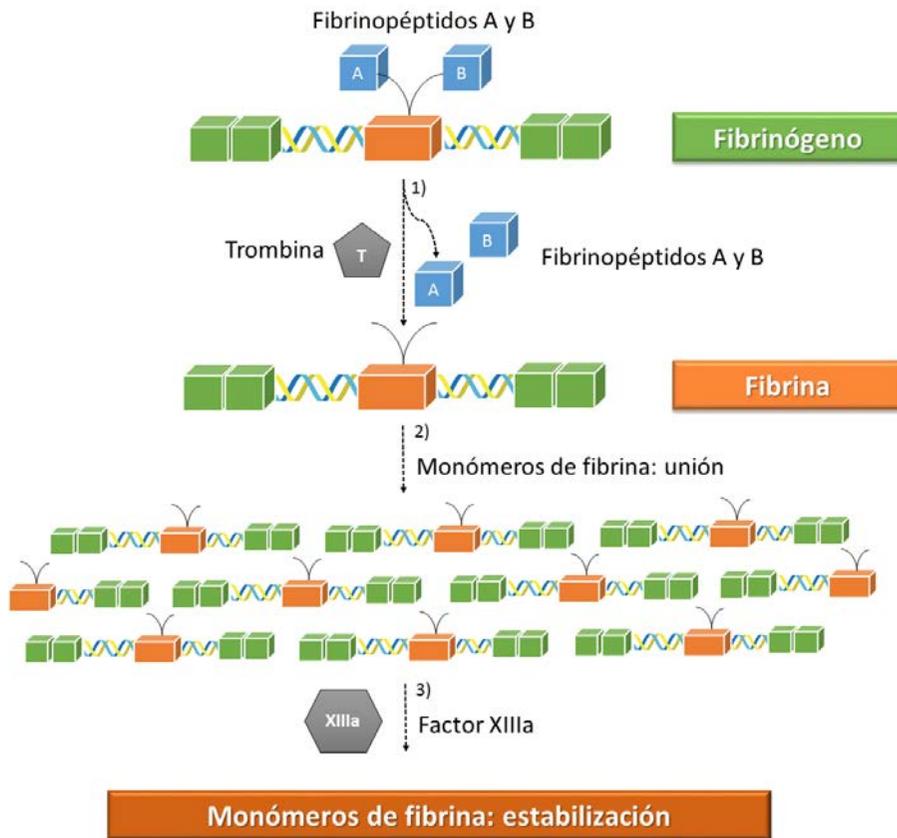


Figura 14. Formación de la red de fibrina. 1) Proteólisis del fibrinógeno en fibrinopéptido A y B por acción de trombina. 2) Polimerización de los monómeros de fibrina. 3) Estabilización de la fibrina por el Factor XIIIa.

Durante más de 30 años, diversos biomateriales a base de fibrina, se han utilizado como hemostático quirúrgico y agentes de sellado; lo que demuestra sus beneficios en prácticamente todos los campos de la cirugía, incluyendo la cirugía plástica reconstructiva y el tratamiento de heridas<sup>102,117</sup>.

De manera aislada o en combinación con otros materiales, la fibrina ha sido utilizada como andamiaje biológico para la curación de las úlceras recalcitrantes y quemaduras, y la estimulación de la regeneración de tejido óseo en odontología, implantología y cirugía maxilofacial y plástica.

La fibrina también se ha utilizado de manera eficiente en el desarrollo de sustitutos de tejidos oculares estables<sup>118,119</sup>. Para la regeneración de la superficie ocular se ha diseñado un tejido que consiste en células madre epiteliales corneales humanas

inmersas en un gel de fibrina autólogo para trasplante<sup>120</sup>, lo que representa una mejora potencial en los intentos actuales para crear un reemplazo de tejido flexible y estable. Además, se ha creado un sustitutivo de córnea de conejo completo utilizando un andamiaje de fibrina-agarosa. Sus resultados sugieren que es posible desarrollar un modelo de córnea de conejo de espesor total en el laboratorio mediante el cultivo de tres tipos de células de la córnea en diferentes posiciones<sup>74</sup>.

Cuando la fibrina se utiliza como sellador o adhesivo, se necesita una alta resistencia a la tracción y que la fuerza de adhesión y sus propiedades mecánicas requieran una alta concentración de fibrinógeno<sup>121</sup>. A medida que aumenta la concentración de fibrinógeno, la fibrina se hace más compacta, rígida y menos permeable<sup>110</sup>. Una estructura tridimensional ideal para el cultivo celular requiere bajas concentraciones de fibrinógeno con el fin de contribuir a mejorar la proliferación celular. De acuerdo con ello, la concentración óptima de fibrinógeno en un andamiaje de fibrina sería de aproximadamente entre 3-5 mg / ml<sup>122,123,124</sup>.

La fibrina se puede obtener de plasma fresco y de crioprecipitado de plasma fresco<sup>102,125,126</sup>.

El crioprecipitado es un hemoderivado rico en fibrinógeno, factor Von Willebrand (vW), factor VIII, factor XIII (estabilizante de la fibrina) y fibronectina. Recibe este nombre porque es la fracción del plasma que permanece insoluble cuando se descongela a baja temperatura. El crioprecipitado se introdujo como alternativa terapéutica en 1960, inicialmente se empleó en el tratamiento de la hemofilia A y de la enfermedad de von Willebrand y, más adelante, en la hipofibrinogenemia y en la coagulopatía de la uremia<sup>127,128</sup>.

El crioprecipitado permite obtener una mayor concentración de fibrinógeno en el andamiaje, utilizando una menor cantidad de biomaterial. En ingeniería de tejidos, la concentración de fibrinógeno de los andamiajes afecta a la proliferación celular y a la síntesis de colágeno<sup>129</sup>.

#### 3.4.1.2. Descelularización

Dentro del campo de la ingeniería tisular, la descelularización es una disciplina que permite eliminar el componente celular del tejido, preservando su estructura tridimensional<sup>130</sup>.

A través de esta técnica se consigue eliminar el potencial componente inmunogénico asociado tanto al material génico como citoplasmático de las células, minimizando el

daño en la estructura proteica extracelular. De este modo, se obtienen matrices acelulares muy similares a las nativas sobre las cuales se puede introducir un componente celular autólogo. A su vez, existen diversas técnicas de descelularización, pero la técnica más ampliamente utilizada se basa en la adicción de detergentes iónicos y aniónicos como desestabilizantes de las membranas celulares en las soluciones de descelularización<sup>131</sup>.

Con el proceso de descelularización se persigue preservar la compleja composición y la ultraestructura tridimensional de la matriz extracelular del tejido, pero en función del método de descelularización se puede dañar la estructura alterándose la composición. Existen métodos físicos, agentes químicos y agentes biológicos que se pueden combinar para favorecer la lisis de las células. Y se realizan lavados para la eliminación de los restos celulares.

Para definir la metodología del proceso de descelularización hay que tener en cuenta factores tales como la densidad del tejido y la organización, así como las propiedades geométricas y biológicas deseadas en el producto final y la futura aplicación clínica específica<sup>132,133</sup>.

#### 3.4.1.2.1. Protocolos de descelularización

Los métodos de descelularización se pueden clasificar según el agente descelularizante aplicado<sup>134</sup>:

- ❖ *Métodos físicos.* Se persigue la ruptura de la membrana celular, pero puede generar un daño directo e irreversible sobre la matriz.  
La ruptura celular directa se genera mediante ciclos de congelación-descongelación o congelación rápida, aplicación de fuerza mecánica, ultrasonidos aplicados por sonicación, alta presión y eliminación de oxígeno o generación de anaerobiosis.
- ❖ *Métodos químicos.* Se solubiliza la membrana plasmática de las células para inducir la lisis celular a través de la acción de detergentes (iónicos, no iónicos o *zwitteriónicos*), alcoholes, soluciones hipotónicas e hipertónicas (generan choques osmóticos) y ácidos o bases. Son muy efectivos porque rompen las interacciones lipídicas, sin embargo, también eliminan componentes de la matriz como los glicosaminoglicanos (GAG) o los factores de crecimiento.

- ❖ *Métodos biológicos.* Se pretenden eliminar las interacciones célula-matriz con enzimas como colagenasa, tripsina, dispasa, lipasa o termolisina. El problema es que su acción prolongada disgrega las proteínas de la matriz extracelular.

#### 3.4.1.2.2. Descelularización de la superficie ocular

Un análisis bibliográfico realizado sobre la aplicación de la técnica de descelularización en los tejidos de la superficie ocular de diferentes especies, reflejó que mayoritariamente se ha aplicado en tejidos de origen porcino y fundamentalmente en la córnea<sup>135-142</sup>, destacando el detergente iónico dodecilsulfato sódico (*Sodium Dodecyl Sulfate*, SDS) como agente descelularizante (Tabla 2).

Por lo tanto, el protocolo de descelularización idóneo, debería constar de 4 fases para asegurar la eficiencia del mismo (Figura 15).

En una primera fase se inicia la lisis de la membrana plasmática con el contacto directo con un agente descelularizante.

La segunda fase se caracteriza por la aplicación de nuevo de un agente descelularizante (sea el mismo o no que en el utilizado en la primera etapa) que va a permitir la solubilización de los restos celulares presentes en la matriz extracelular.

En una tercera fase, se incluye un tratamiento enzimático con el propósito de eliminar los ácidos nucleicos existentes en el tejido.

Para finalizar el proceso, se realizan lavados con soluciones isotónicas, que permitan eliminar los restos remanentes del agente descelularizante utilizado. De este modo, se evita que permanezcan residuos tóxicos que puedan limitar la recelularización del tejido acelular obtenido.

Tabla 2. Relación de tejidos descelularizados según el agente descelularizante, clasificados por especie.

ESPECIE	TEJIDO	AGENTE DESCELULARIZANTE	REFERENCIAS
Cerdo	Córnea	Fosfolipasa A <sub>2</sub> (PLA <sub>2</sub> )	140,141
	Córnea	SDS 1%	143
	Córnea	SDS 0,5%	137
	Córnea	SDS 0,1%	144
	Córnea	Nitrógeno líquido	145
	Córnea	NaCl 1,5M + Tris-EDTA (0,05%-0,02%)	145
	Córnea	Glicerol 98% + Tris-EDTA (0,05%-0,02%)	145
	Córnea	Tris (0,25%) + SDS 0,1%	145
	Córnea	NaOH 0,1M + DNase- RNase (40 U/ml)	145
	Córnea	Tris-HCl (1mM) + Triton X100 (1%) + Tripsina- EDTA (0,25%) + DNase- RNase	146,147
	Córnea	Tripsina + DNase-RNase	148
	Córnea	Triton X100	143,149,150
	Córnea	Nitrógeno gaseoso	151
	Córnea	Tripsina (2,5%) + Nitrógeno líquido + NaOH (0,1M) + DNase- RNase	152
	Córnea	Presión hidrostática ultraalta + DNase + Dextrano (3,5%)	143
	Córnea	Suero humano 100%	153,154
	Córnea	NaCl 1,5M	144
	Limbo	Fosfolipasa A <sub>2</sub> (PLA <sub>2</sub> , 200 U/ml) + 0,5% SD	142
	Conjuntiva	SDS 0,1%	155
	Conejo	Córnea	Tritón X100 + Tripsina
Córnea		NaCl + SDS + Tripsina	156
Vaca	Córnea	Tripsina 0,25%	157
	Córnea	SDS 1% + Etanol 75%	158
	Córnea	Ácido peracético (0,1%) + Etanol (4-20%)	158
	Córnea	Etanol 75% + Tripsina- EDTA	158

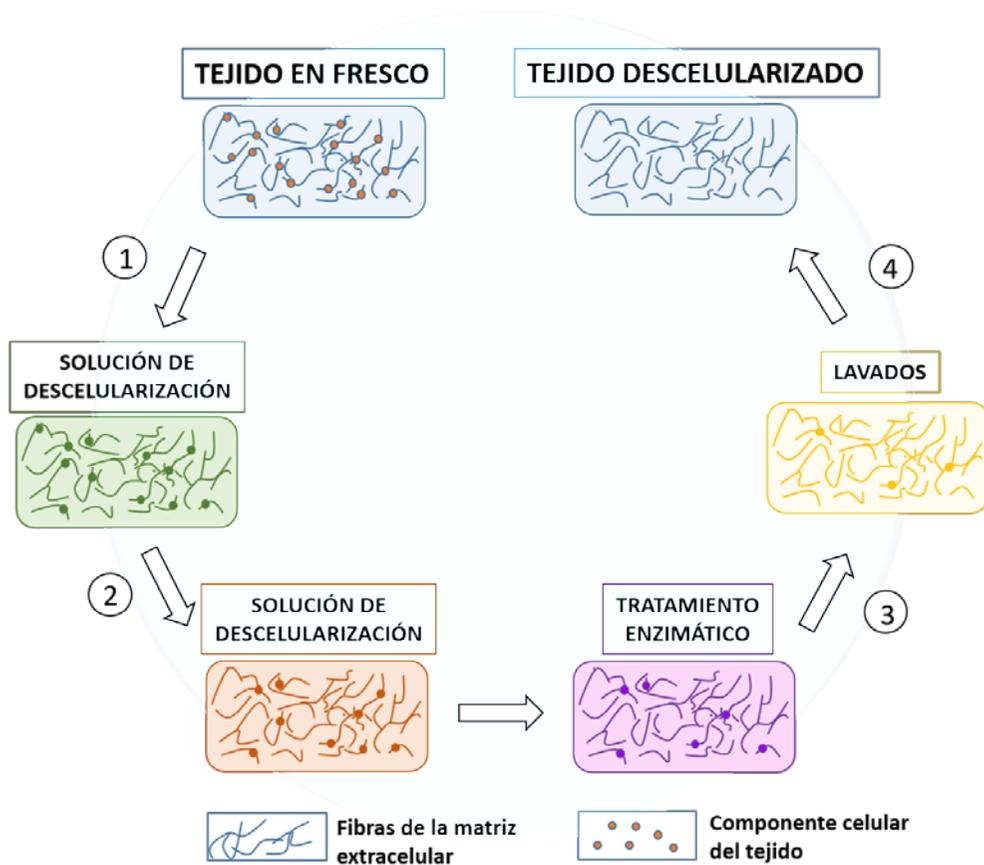
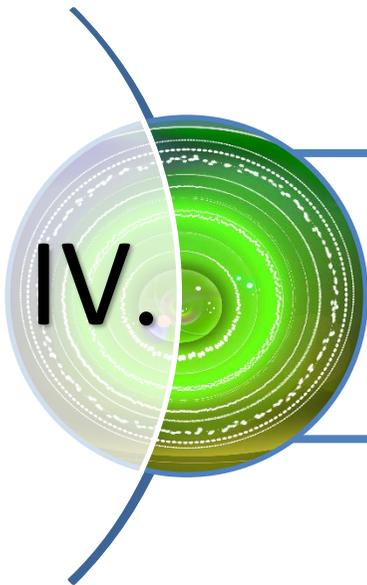


Figura 15. Fases de un protocolo de descelularización estándar. La representación gráfica refleja cómo, a medida que se avanza por las distintas fases de un protocolo de descelularización, se va eliminando el componente celular del tejido y se mantienen las fibras de la matriz extracelular.



## **JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## 4.1. JUSTIFICACIÓN

Las alteraciones de la superficie ocular son uno de los motivos más frecuentes de consulta al oftalmólogo. La interdependencia de las estructuras que componen la superficie ocular y su influencia sobre el epitelio corneal hace que sea necesaria su correcta integridad para garantizar la salud del ojo. De los tejidos que componen la superficie ocular, destaca la conjuntiva, porque de su integridad va a depender el correcto funcionamiento de la córnea.

El abanico de patologías que afectan a la superficie ocular es muy extenso y con un amplio grado de presentación. La reparación de estas patologías ha supuesto un gran desafío y ha generado una variedad sustancial de técnicas médicas y procedimientos quirúrgicos de reparación, que han tenido un éxito limitado.

Por todo ello, desde hace unos años, han surgido nuevas técnicas de reparación basadas en la ingeniería de tejidos: disciplina que persigue la construcción *in vitro* de un sustitutivo tisular para su uso en clínica humana, mediante el uso combinado de poblaciones celulares y matrices tridimensionales.

Actualmente, se están desarrollando modelos *in vitro* de conjuntiva humana, con la limitación que supone el uso de tejidos humanos como origen celular debido a su escasa disposición y a los problemas éticos derivados. Por esta razón, el cerdo es el animal más utilizado como modelo animal en estudios relacionados con la reparación de estructuras de la superficie ocular, debido a su gran similitud con el ser humano.

En este contexto, esta tesis doctoral pretende desarrollar un modelo *in vitro* de conjuntiva porcina basado en el establecimiento de un protocolo completo y optimizado para expandir células estromales y células epiteliales de la conjuntiva porcina de manera tridimensional. El desarrollo de un modelo experimental porcino permitiría demostrar la eficacia en el tratamiento de lesiones que afecten a la conjuntiva.

Por último, la expansión *in vitro* de las células epiteliales conjuntivales de origen porcino, haría posible el desarrollo de un modelo *in vitro* de inflamación mediante la inducción de estímulos inflamatorios a través de citoquinas.



## 4.2. HIPÓTESIS

Es posible desarrollar y optimizar un andamiaje tridimensional que permita el cultivo *in vitro* de los componentes celulares de la conjuntiva manteniendo su fenotipo y funcionalidad.

## 4.3. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

### **Objetivo general:**

Integración de diferentes biomateriales de origen biológico y células conjuntivales para el desarrollo de una nueva generación de andamiajes tridimensionales biomiméticos de aplicación en el campo de la medicina regenerativa a nivel ocular.

### **Objetivo 1 (O.E.1): Aislamiento y caracterización de las células de la conjuntiva porcina.**

Desarrollo y optimización de un protocolo de digestión para la obtención y expansión *in vitro* de los componentes celulares de la conjuntiva. Estudio comparativo entre diferentes zonas de aislamiento de la conjuntiva.

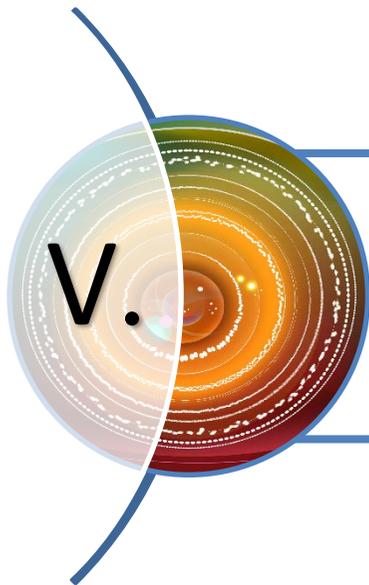
### **Objetivo 2 (O.E.2): Diseño de la primera generación de andamiajes de fibrina.**

Estandarización del hidrogel de fibrina, a partir de plasma fresco y crioprecipitado de plasma fresco; formulación de diferentes andamiajes tridimensionales y evaluación del comportamiento de las células conjuntivales en su interior.

### **Objetivo 3 (O.E.3): Descelularización de la conjuntiva. Diseño de la segunda y tercera generación de andamiajes.**

Construcción de dos modelos conjuntivales *in vitro* empleando conjuntiva descelularizada (segunda generación de andamiajes) o fibras de conjuntiva descelularizada en combinación con hidrogel de fibrina (tercera generación). Análisis del comportamiento celular en los andamiajes y estudio biomecánico de los mismos.





**CAPÍTULO 1:**  
**AISLAMIENTO Y**  
**CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS**  
**DE LA CONJUNTIVA PORCINA**



El material empleado para el desarrollo del presente estudio está detallado en el Anexo I, mientras que los protocolos empleados aparecen descritos en el Anexo II.

El primer capítulo de este trabajo está basado en la puesta a punto de técnicas de aislamiento que permitan el cultivo celular, de manera independiente, de los dos componentes celulares de la conjuntiva: células epiteliales y células estromales.

En un primer paso, se procedió a la elección de un protocolo de aislamiento que asegurase la obtención de ambas poblaciones celulares combinando técnicas de digestión enzimática y analizando el rendimiento celular y la expresión proteica (Figura 16).

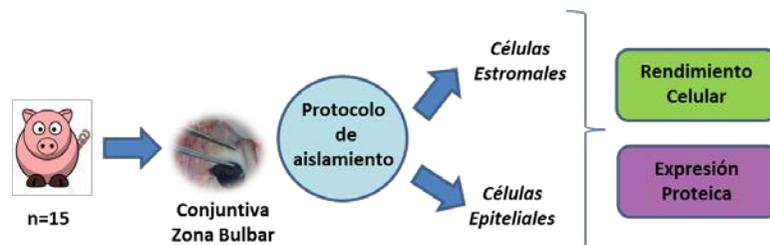


Figura 16. Protocolo de aislamiento. Obtención de los componentes celulares de la conjuntiva; análisis del rendimiento celular y la expresión proteica.

Una vez establecido el protocolo, se determinó la zona de la conjuntiva óptima para el aislamiento de las células de naturaleza conjuntival mediante el análisis del rendimiento celular, la observación de la morfología celular, la determinación de la proliferación celular y el análisis de la síntesis de mucopolisacáridos neutros (Figura 17).

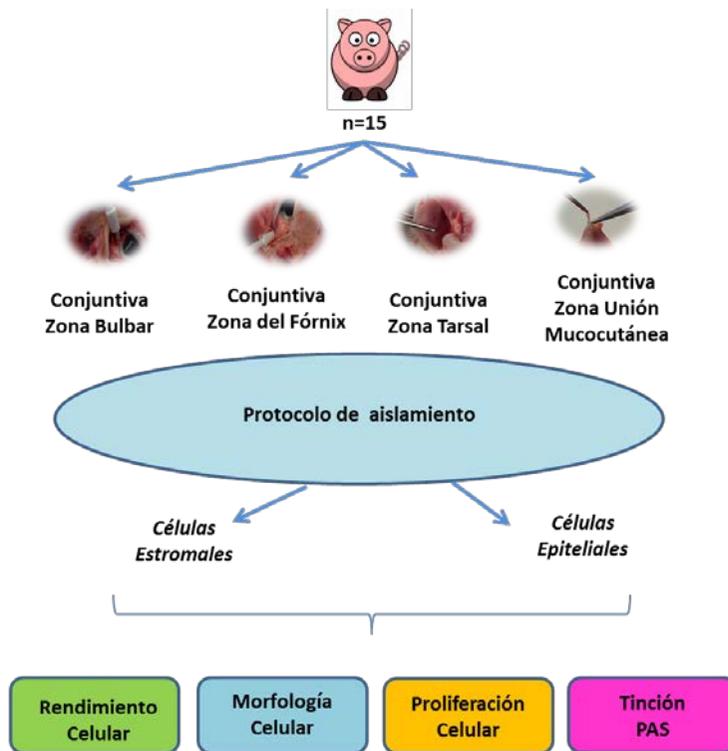


Figura 17. Zona de obtención. Aislamiento de los componentes celulares a partir de diferentes zonas de la conjuntiva. Análisis del rendimiento celular, de la morfología celular, del patrón de proliferación y la síntesis de mucopolisacáridos neutros.

## V- CAPÍTULO 1. MATERIAL Y MÉTODO

### 5.1. Obtención y procesamiento de los globos oculares

Para la realización de este estudio se procesaron 30 globos oculares con los párpados incluidos. Las muestras se obtuvieron en el Matadero García Carpintero de Pola de Gordón (León) en cerdos de raza híbrida-blanca, hembras, de 12 meses de edad y un peso aproximado de 200 kg. Los globos oculares completos se introdujeron en una solución de esterilización en suero fisiológico estéril suplementado con un cóctel de antibióticos compuesto por tobramicina (50 mg/ml), sulfametoxazol-trimetoprima (160 mg/ml), vancomicina (50 mg/ml), anfotericina B (10 mg/ml) y colistimetato de sodio (8 mg/ml). Las muestras permanecieron 4 horas en esta solución de transporte hasta su procesamiento en el laboratorio de cultivos celulares en campana de flujo laminar vertical (modelo V-100 Telstar).

El procedimiento de extracción del tejido conjuntival se realizó bajo condiciones de asepsia. Los globos oculares se recuperaron del recipiente de transporte utilizando unas pinzas estériles y se depositaron sobre una placa de petri de 90 mm de diámetro recubierta con una compresa de algodón, de manera que la superficie ocular quedó expuesta hacia arriba (Figura 18-A).

Previo a la extracción del tejido conjuntival, se llevó a cabo una inspección macroscópica del globo ocular completo, para poder detectar posibles lesiones y/o anomalías en la superficie ocular que pudieran alterar los resultados obtenidos en el estudio.

Una vez aceptado el globo ocular para el estudio, en primer lugar, se realizó una limpieza de los restos hemáticos presentes con una gasa estéril. Posteriormente, se introdujo verticalmente un bisturí sacabocados (punch) de 4 mm de diámetro en la zona bulbar de la conjuntiva con un movimiento de rotación cortando de este modo la zona seleccionada. La biopsia cortada se recuperó con ayuda de unas pinzas y una tijera estériles. Se obtuvieron tres muestras de cada ojo (Figura 18-B,C).

Cada biopsia se colocó sobre una placa de petri de 35 mm de diámetro, previamente pesada, para poder determinar su peso exacto utilizando una báscula de precisión (ABZ100C, PCE).

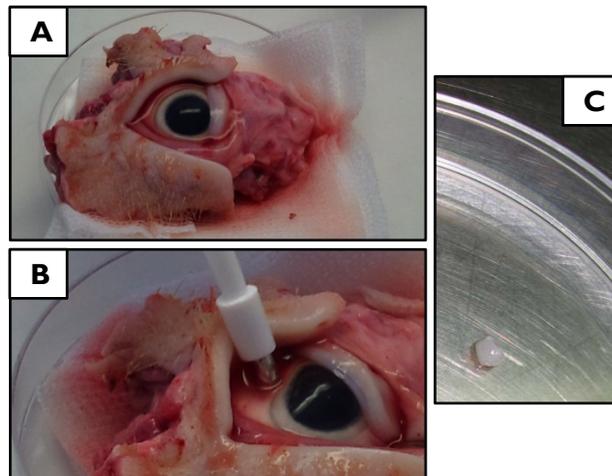


Figura 18. Procesamiento de globos oculares. (A) Globo ocular con párpado. (B) Corte de la zona bulbar de la conjuntiva con punch. (C) Aspecto de una de las biopsias extraídas.

Con el fin de evitar contaminaciones, las biopsias de conjuntiva obtenidas se sometieron de nuevo a un protocolo de esterilización en placa de poliestireno de 24 pocillos (Figura 19) basado en la incubación secuencial en diferentes soluciones como se detalla en la Tabla 3.

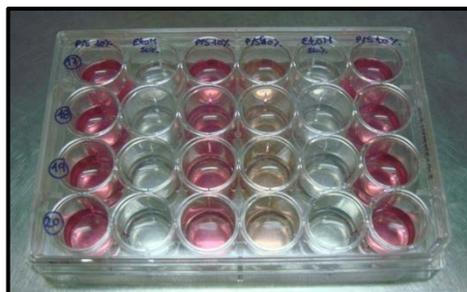


Figura 19. Proceso de esterilización en placa de 24 pocillos. El volumen de cada solución fue 1 ml, y el tiempo de acción varió en función de la solución de esterilización.

Tabla 3. Protocolo de esterilización. Composición de las soluciones de esterilización y su correspondiente tiempo de acción.

PROTOCOLO DE ESTERILIZACIÓN	
COMPOSICIÓN DE LA SOLUCIÓN	TIEMPO DE ACCIÓN
10% P/S en DMEM	5 minutos
50% Etanol en agua miliQ	30 segundos
10% P/S en DMEM	5 minutos
50% P/S en DMEM	90 minutos
10% P/S en DMEM	5 minutos
50% Etanol en agua miliQ	30 segundos
10% P/S en DMEM	5 minutos

P/S: Penicillin/Streptomycin. DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's medium*

## 5.2. Técnicas de cultivo celular

Se trabajó siempre en campana de flujo laminar vertical y bajo condiciones de asepsia utilizando material estéril evitando contaminaciones. Para el establecimiento y el desarrollo de los cultivos celulares fue necesario optimizar un protocolo de aislamiento que permitiera la obtención de los dos componentes celulares que forman parte de la conjuntiva. Utilizando técnicas de digestión, el protocolo se basó en la acción secuencial de dos enzimas: colagenasa I, cuya acción proteolítica sobre la matriz del estroma conjuntival permitió el aislamiento de las células estromales, y tripsina combinada con el ácido etilendiaminotetraácido (EDTA) con intención de aislar las células que forman parte del epitelio conjuntival.

### 5.2.1. Técnicas de digestión: protocolo de aislamiento

Para la definición del protocolo de aislamiento se necesitaron 45 biopsias de conjuntiva bulbar extraídas de 15 globos oculares completos. Se emplearon 3 biopsias de cada muestra para probar la acción de tres concentraciones de enzima colagenasa I: 1 mg/ml, 2 mg/ml y 3 mg/ml. Cada biopsia se depositó en un pocillo de una placa de poliestireno de 24 pocillos sobre la cual se añadió 1 ml de solución de colagenasa I a testar. Se mantuvieron en un incubador (Forma 311, Thermo Fisher Scientific) en condiciones de

cultivo estándar: una temperatura de 37°C en una atmósfera al 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de humedad relativa, durante 24 horas.

El volumen de la solución de digestión, se recuperó en un tubo de polipropileno de 15 ml y se centrifugó durante 10 minutos (centrífuga modelo 5804, Eppendorf) a 1.400 rpm (353 g) y temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó mediante vacío y el pellet resultante se resuspendió en un volumen conocido de medio de cultivo para células estromales/fibroblastos (MCF) previamente filtrado utilizando un filtro de vacío, cuya composición se describe en la Tabla 4 (Figura 20).

*Tabla 4. Composición del medio de cultivo de células estromales/fibroblastos (MCF).*

MEDIO DE CULTIVO CÉLULAS ESTROMALES/FIBROBLASTOS (MCF)	
COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
DMEM	Hasta completar el volumen final
Suero fetal bovino	10 %
Penicilina	100 UI/ml
Estreptomicina	100 µg/ml
L-Glutamina	2 mM

El tejido restante que permaneció sin digerir por acción de la colagenasa I, se recuperó con unas pinzas estériles y se depositó en un pocillo de una placa de poliestireno de 24 pocillos y sobre dicho tejido se añadió 1 ml de solución de tripsina al 0,25% y EDTA al 0,02% (T/E). Las muestras se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar durante 180 minutos cuando la incubación previa había sido con la solución 1 mg/ml de colagenasa I, durante 120 minutos cuando la incubación previa había sido con la solución 2 mg/ml de colagenasa I y durante 60 minutos cuando la incubación previa había sido con la solución 3 mg/ml de colagenasa I. La solución obtenida se centrifugó a 1.400 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente; el sobrenadante se aspiró y el pellet se resuspendió en un volumen conocido de medio de cultivo para células epiteliales (MCE) previamente filtrado, cuya composición se describe en la Tabla 5 (Figura 20).

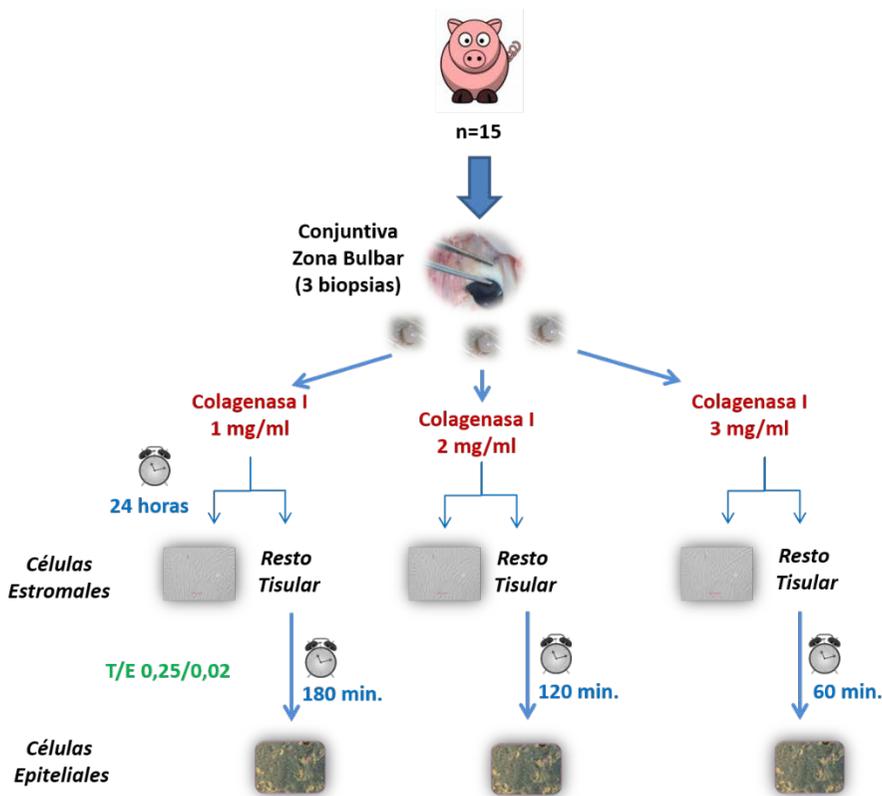


Figura 20. Diagrama del protocolo de aislamiento para la obtención de los componentes celulares de la conjuntiva. Para la obtención de las células estromales se analizó el efecto de la enzima colagenasa I a tres concentraciones diferentes: 1 mg/ml, 2 mg/ml y 3 mg/ml en DMEM durante 24 horas. Los restos tisulares no digeridos se incubaron con una solución T/E 0,25/0,02 para la obtención de las células epiteliales. En función de la concentración previa de enzima colagenasa I, el tiempo de incubación varió, siendo 180 minutos, 120 minutos y 60 minutos, para 1 mg/ml, 2 mg/ml y 3 mg/ml, respectivamente.

Tabla 5. Composición del medio de cultivo de células epiteliales (MCE).

MEDIO DE CULTIVO CÉLULAS EPITELIALES (MCE)	
COMPONENTE	CONCENTRACIÓN
DMEM/Ham's F12	1:1
Suero fetal bovino	10 %
Penicilina	100 UI/ml
Estreptomicina	100 µg/ml
L-Glutamina	2 mM
Insulina	5 µg/ml
Toxina colérica	100 ng/ml
EGF	10 ng/ml

### 5.2.2. Cuantificación celular y porcentaje de viabilidad

La cuantificación de las suspensiones celulares obtenidas después del protocolo de digestión, se realizó utilizando un hemocitómetro (cámara de Neubauer) y aplicando el método azul tripán (Figura 21-A,B).

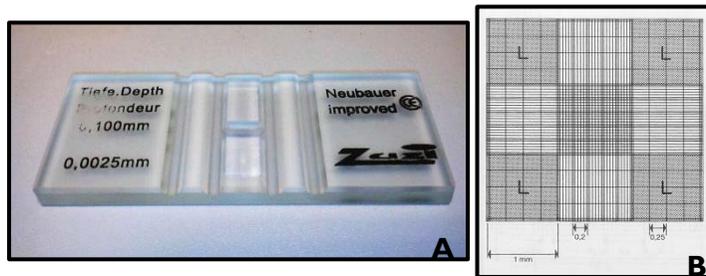


Figura 21. Cuantificación celular. (A) Cámara de Neubauer. Portaobjetos con depresión en el centro, en el fondo se ha marcado con un diamante una cuadrícula de 3x3 mm. (B) Esquema de la cuadrícula. El área sombreada "L" corresponde a  $1 \text{ mm}^2$ , el volumen comprendido entre la superficie L y el cubreobjetos  $0.1 \text{ mm}^3$ , es decir,  $0.1 \mu\text{L}$ .

De los pellets de células resuspendidos en un volumen de medio de cultivo conocido, se tomó una alícuota de  $10 \mu\text{L}$  en un microtubo eppendorf de  $0.5 \text{ ml}$ . A continuación, se añadió un volumen conocido de azul tripán y se homogeneizó bien la suspensión. Se colocó el cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer y se cargó  $10 \mu\text{L}$  en la parte superior y  $10 \mu\text{L}$  en la parte inferior.

La observación de la cámara se realizó bajo microscopio óptico invertido (Leica DMIL) a 10 aumentos. Para cada muestra se contaron los 8 campos de la cámara, obviando las células que se encontraban en los bordes internos de cada cuadrante.

Se utilizó el método Azul Tripán para la diferenciación de células vivas y muertas. Se trata de un colorante que no penetra en las células viables que, al tener su membrana intacta, se ven como refringentes y las células muertas se observan de color azul porque el colorante entra a través de su membrana dañada.

El número total de células viables existentes en la suspensión celular original fue determinado usando la siguiente formula:

$$N = n/8 \times FD \times \text{Volumen de resuspensión} \times 10^4$$

N = Número de células totales

n = Número de células contadas en toda la cámara

8 = Número de cuadrantes

FD = Factor de dilución (número de veces que la muestra es diluida en el azul tripán)

Volumen de resuspensión = Volumen total en el cual el pellet es resuspendido

$10^4$  = Factor de corrección, cálculo en ml, el volumen de muestra es 0,1  $\mu$ l

Se determinó el porcentaje de viabilidad celular utilizando la misma preparación utilizada para el recuento celular, aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad Celular} = \left[ \frac{\text{N}^\circ \text{ Células vivas}}{\text{N}^\circ \text{ células vivas} + \text{N}^\circ \text{ células muertas}} \right] \times 100$$

### 5.2.3. Análisis del rendimiento celular

A partir del recuento de las suspensiones celulares se obtuvieron los valores de rendimiento celular (células obtenidas/mg de tejido digerido) para cada uno de los tipos celulares en los cultivos primarios (OP): células estromales (n=45) y células epiteliales (n=45).

### 5.2.4. Establecimiento de cultivos primarios

Para el establecimiento de los cultivos primarios (P0), las poblaciones celulares obtenidas se sembraron en recipientes plásticos de poliestireno de 1,9 cm<sup>2</sup> a una densidad inicial de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>.

Todos los cultivos se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar. El medio de cultivo se reemplazó cada 48-72 horas hasta que las células alcanzaron el estado de preconfluencia.

### 5.2.5. Realización de subcultivos

Cuando los cultivos primarios (P0) alcanzaron un estado de preconfluencia ocupando el 80-90% de la superficie de cultivo, se procedió a la recuperación de las células para subcultivarlas.

Las células se incubaron con una solución de T/E (0,25/0,02) a 37°C durante 5-10 minutos, provocando la individualización de las células al romperse las uniones celulares de éstas con el soporte plástico y las uniones establecidas entre ellas mismas.

Posteriormente, se neutralizó la acción de la enzima mediante la adición del medio de cultivo correspondiente en proporción 1:1, se recuperó la solución y se centrifugó a 1.400 rpm (353 g) durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en el medio de cultivo específico dependiendo del tipo celular y se procedió a la cuantificación celular mediante el método azul tripán. Las células obtenidas se sembraron a una densidad celular de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> sobre superficies plásticas de poliestireno estableciendo los cultivos secundarios (P1). Cuando estas células alcanzaron el estado de preconfluencia se sometieron al mismo procedimiento de incubación con la solución T/E, estableciéndose el cultivo P2 y así sucesivamente, hasta alcanzar el pase 15 (P15).

### 5.2.6. Análisis de la expresión proteica por inmunofluorescencia

Mediante técnicas de inmunofluorescencia se determinó cualitativamente el fenotipo característico de las células estromales (n=5) y de las células epiteliales (n=5) de la conjuntiva bulbar.

Ambos tipos celulares en P1, P4 y P14 se sembraron en cámaras de cultivo de 8 pocillos a una densidad de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> y se mantuvieron en condiciones específicas de cultivo hasta que alcanzaron el estado de preconfluencia.

Posteriormente, el medio de cultivo se retiró, se realizaron dos lavados con tampón fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline, PBS*) y las células se fijaron utilizando metanol frío durante 10 minutos a -20°C. Finalmente, la solución de fijación se aspiró y se dejaron evaporar los restos persistentes a temperatura ambiente. Se garantizó la perfecta preservación de las muestras sellándolas con parafilm y se guardaron a -20°C hasta su análisis. En función del antígeno a detectar, se aplicó el protocolo de inmunofluorescencia indicado por la casa comercial.

### 5.2.6.1. Inmunofluorescencia indirecta

La técnica de inmunofluorescencia indirecta se utilizó para la detección de los antígenos intranucleares: vimentina, citoqueratina-7 (Ck 7), e-cadherina y MUC5AC. Y para el antígeno de superficie CD90 (Tabla 6).

Las muestras se descongelaron y se colocaron en una cámara húmeda donde se desarrolló todo el proceso Anexo II – Protocolo I (Figura 22).

Las muestras se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia (Leica DMI 6000B). Las imágenes se hicieron con el objetivo de 20X aumentos.

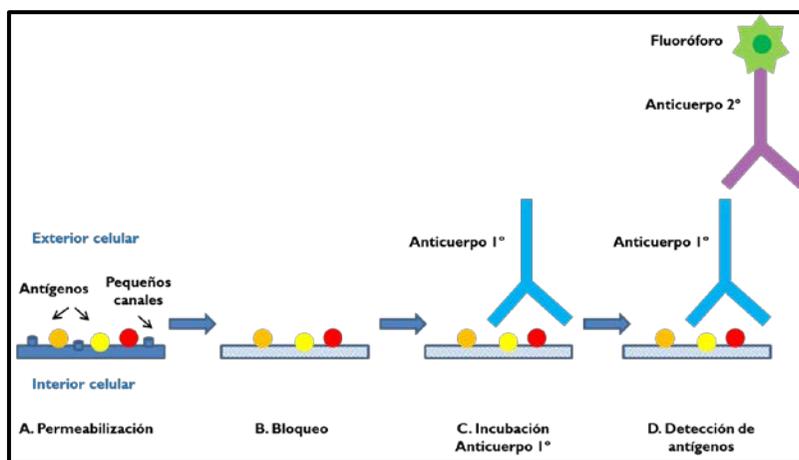


Figura 22. Técnica de inmunofluorescencia indirecta. (A) Inicialmente se realiza una permeabilización de la muestra para dejar accesible el interior celular para la unión de los anticuerpos, cuando los antígenos están en el interior. (B) Etapa de bloqueo, para impedir que los anticuerpos reaccionen con zonas no específicas. (C) Detección del antígeno al incubarlo con el anticuerpo primario. (D) Reconocimiento del anticuerpo primario por el anticuerpo secundario conjugado a un fluoróforo que emite fluorescencia a una longitud de onda determinada.

### 5.2.6.2. Inmunofluorescencia directa: lectina HPA

Las lectinas son un grupo de proteínas vegetales que presentan especificidad de reconocimiento de glicoconjugados. La lectina *Helix pomatia* (HPA) presenta especificidad por la N-acetilgalactosamina y la galactosa (Tabla 6). Las muestras se descongelaron y se colocaron en la cámara húmeda para realizar la tinción específica (Anexo II – Protocolo II) (Figura 23).

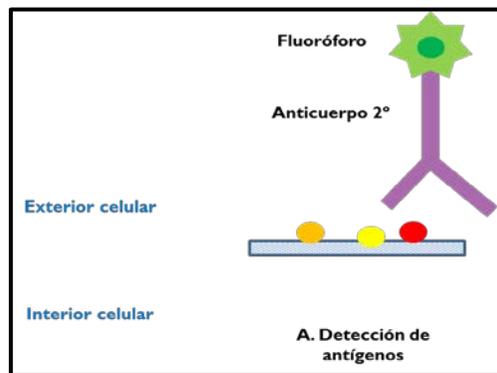


Figura 23. Técnica de inmunofluorescencia directa para la detección de carbohidratos. La lectina HPA conjugada con el fluoróforo reconoce directamente la N-acetilgalactosamina y la galactosa.

Las muestras se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia (Leica DMI 6000B). Las imágenes se hicieron con el objetivo de 20X aumentos.

Tabla 6. Marcadores específicos para células estromales, células epiteliales y células caliciformes. Composición de la solución de bloqueo, dilución de anticuerpo 1º, anticuerpo 2º y Hoescht (contraste de núcleos).

	PROTEÍNA	BLOQUEO	Ac 1º	Ac 2º	Hoescht
Marcadores de células estromales	CD90	PBS + 5% suero de burro	Dilución 1:40 PBS + 5% suero de burro	Dilución 1:200	1:1000 en PBS
	Vimentina	PBS + 5% suero de burro	Dilución 1:500 PBS + 5% suero de burro	Dilución 1:150	1:1000 en PBS
Marcadores de células epiteliales	CK7	PBS + 5% suero de burro	Dilución 1:100 PBS + 5% suero de burro	Dilución 1:300	1:1000 en PBS
	E-Cadherina	PBS 1X + 5% suero de burro	-	Dilución 1:500 PBS + 5% suero de burro	1:1000 en PBS
Marcadores de células caliciformes	Lectina	PBS 1X + 5% suero de burro	-	Dilución 1:500 PBS + 5% suero de burro	1:1000 en PBS
	MUC5AC	PBS + 5% suero de burro	Dilución 1:50 PBS + 5% suero de burro	Dilución 1:200 PBS + 5% suero de burro	1:1000 en PBS

Se realizó una valoración semicuantitativa de las muestras. Los grados de intensidad de fluorescencia se definieron como: -, no fluorescencia; (+), intensidad de fluorescencia leve; +, intensidad de fluorescencia moderada; ++, intensidad de fluorescencia fuerte.

### 5.3. Definición de la zona de obtención

Se realizó este estudio para determinar la zona óptima de obtención de células conjuntivales. Una vez establecido el protocolo de aislamiento de células estromales y células epiteliales en la zona de la conjuntiva bulbar, se aplicó ese mismo protocolo para el aislamiento de ambos tipos celulares en las otras tres zonas anatómicas de la conjuntiva: zona del fondo de saco o del fórnix, zona palpebral o tarsal y zona de la unión mucocutánea.

Se emplearon 15 globos oculares con párpado. El protocolo de obtención de los globos oculares y el procedimiento de extracción de la zona conjuntival se detalló en el apartado 5.1. De cada ojo se obtuvieron cuatro muestras, una de cada zona de estudio (Figura 24).

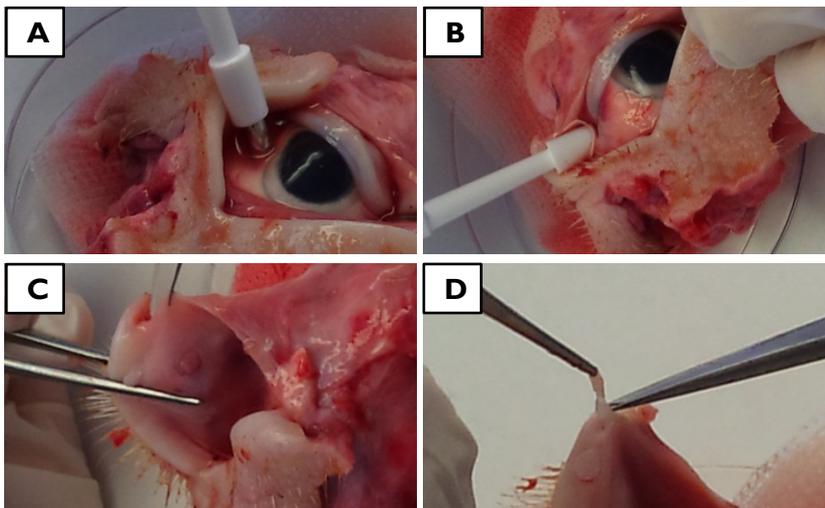


Figura 24. Zonas de obtención de la conjuntiva. (A) Zona bulbar (n=15). (B) Zona del fondo de saco o del fórnix (n=15). (C) Zona palpebral o tarsal (n=15). (D) Zona de la unión mucocutánea (n=15).

#### 5.3.1. Análisis del rendimiento celular

Para la obtención de los componentes celulares conjuntivales se utilizó el protocolo optimizado en el apartado 5.2.

El peso de las muestras fue determinado previamente a la realización del protocolo de digestión. El protocolo de digestión aplicado consistió en el uso secuencial de las dos enzimas. En primer lugar, 24 horas de digestión con la enzima colagenasa I a una

concentración de 2 mg/ml de cuya solución de digestión se obtuvieron las células estromales de cada una de las 4 zonas de obtención (n=60).

El tejido que permaneció sin digerir se recuperó y se añadió sobre él la solución T/E durante 120 minutos, periodo de incubación necesario para obtener las células epiteliales de cada una de las 4 zonas de la conjuntiva (n=60). Se determinó el rendimiento celular (células/mg de tejido) de cada tipo celular en función de la zona de obtención de la conjuntiva (Figura 25).

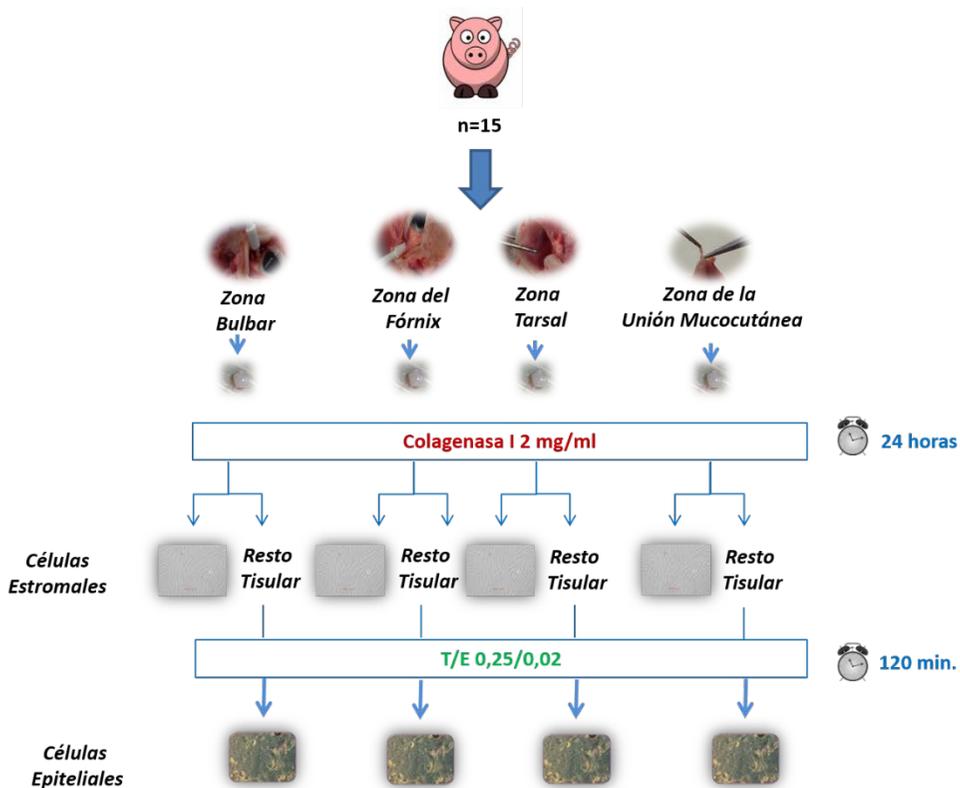


Figura 25. Diagrama del protocolo de aislamiento para la obtención de los componentes celulares de la conjuntiva. Para la obtención de las células estromales se incubaron las muestras de cada zona de la conjuntiva con una solución de la enzima colagenasa I de concentración 2 mg/ml en DMEM durante 24 horas. Los restos tisulares no digeridos se incubaron con una solución T/E 0,25/0,02 para la obtención de las células epiteliales durante 120 minutos.

### 5.3.2. Análisis de la morfología celular

El análisis de la morfología celular se realizó mediante la observación diaria de los cultivos en un microscopio óptico invertido. Se tomaron fotografías (Leica DFC 300 FX) de diferentes campos ópticos de los dos tipos celulares aislados de las cuatro zonas de obtención de la conjuntiva a P0, P1, P3 y P4.

### 5.3.3. Análisis de la proliferación celular

Se determinó la capacidad proliferativa de las células estromales (n=15) y de las células epiteliales (n=15) aisladas de las cuatro zonas de obtención a pase 2 (P2). Por cada una de las 60 muestras a analizar de naturaleza estromal y por cada una de las 60 muestras de naturaleza epitelial se sembraron 12 pocillos de una placa de poliestireno de 24 pocillos de superficie  $1,9 \text{ cm}^2/\text{pocillo}$  a una densidad inicial de  $10.000 \text{ células}/\text{cm}^2$  (Figura 26). Cada 48 horas durante 12 días, dos de los pocillos se incubaron con la solución T/E (0,25/0,02) para conseguir la individualización celular. Se realizó la cuantificación celular mediante el método Azul Tripán para determinar el patrón proliferativo de cada tipo celular en función de la zona de obtención de la conjuntiva.



Figura 26. Placa de poliestireno de 24 pocillos con células sembradas para el estudio de proliferación.

#### 5.3.4. Tinción de ácido periódico de Schiff (*periodic acid-Schiff, PAS*)

Para determinar la presencia de mucopolisacáridos neutros se realizó la tinción PAS a células epiteliales en cultivo a P0 (n=15) y P1 (n=15) de cada una de las 4 zonas de obtención de la conjuntiva.

Las células se sembraron en placa de poliestireno de 12 pocillos de 3,8 cm<sup>2</sup> de superficie/pocillo a una densidad de 10.000 células/cm<sup>2</sup>. Tras 30 días de cultivo in vitro en condiciones estándar, se retiró el medio de cultivo y se procedió a aplicar el protocolo de tinción Anexo II – Protocolo III.

Se realizó una valoración semicuantitativa de las muestras. Los grados de intensidad de tinción PAS se definieron como: -, no tinción; (+), intensidad de tinción leve; +, intensidad de tinción moderada; ++, intensidad de tinción fuerte.

#### 5.3.5. Análisis estadístico

La representación de los datos obtenidos se realizó como la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico R (R Development Core Team (2011). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Fue necesario descargar los paquetes estadísticos *car*<sup>159</sup>, *gvlma*<sup>160</sup> y *multcomp*<sup>161</sup>.

Se aplicó un modelo lineal generalizado para el desarrollo del análisis estadístico de los datos y se comprobó la distribución normal de los residuos. Sobre el modelo lineal, se realizó un análisis de varianza (*ANalysis Of VAriance*, ANOVA) factorial, para evaluar el efecto de cada factor presente, y se aplicó un ajuste *white adjust* (localizado dentro del paquete estadístico *car*). La variabilidad y heterogeneidad características de los datos obtenidos a partir de muestras biológicas pueden generar el no cumplimiento de alguna de las asunciones del modelo, por lo que el ajuste se aplicó en todos los casos para asegurar la homocedasticidad en los residuos. Una vez realizada la ANOVA, se realizó un análisis *post hoc* con el test de Tukey para todos los factores y así evaluar el grado de significación al realizar una comparación entre las clases del factor. Los valores de  $p \leq 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

---

## V- CAPÍTULO 1. RESULTADOS

La exposición de los resultados del primer capítulo permitirá la definición de un protocolo óptimo de digestión. Para ello, se analizará el rendimiento y el fenotipo de los componentes celulares aislados.

Una vez establecido el protocolo de aislamiento, se procederá a su aplicación en diferentes zonas de la conjuntiva para la obtención de células estromales y de células epiteliales. Las células obtenidas serán analizadas en términos de rendimiento, morfología, proliferación y síntesis de mucopolisacáridos neutros.

### 5.4. Técnicas de cultivo celular

Todas las muestras de la conjuntiva bulbar (n=45) se procesaron de manera satisfactoria para el aislamiento de las células estromales y de las células epiteliales. A continuación se describen los resultados obtenidos de rendimiento celular.

#### 5.4.1. Análisis del rendimiento celular: células estromales

El número de células estromales aisladas por miligramo de tejido digerido varió en función de la concentración de colagenasa tipo I que se utilizó para la digestión enzimática de la conjuntiva bulbar. Para el análisis estadístico de los valores de rendimiento se aplicó el modelo lineal generalizado y se comprobó que la distribución de residuos se ajustaba a una normal.

A continuación, se realizó un análisis de varianza (ANalysis Of VAriance, ANOVA) unifactorial, sobre el modelo lineal generalizado identificando el nivel de significación (Tabla 7) y se llevó a cabo un análisis *post hoc* con el test de Tukey para la comparación entre concentraciones.

Tabla 7. ANOVA para la concentración de colagenasa I.

	GL	Valor F	P (>F)
Concentración	2	19,088	1,268e-06 ***
Residuos	42		

GL: Grados de libertad; P: Probabilidad. \*\*\* $p \leq 0,001$ .

Una concentración de colagenasa tipo I menor de 2 mg/ml, supone un menor número de células estromales aisladas: para 1 mg/ml se obtuvieron  $800,2 \pm 87,2$  células/mg tejido; para 2 mg/ml se obtuvieron  $1659,0 \pm 152,1$  células/mg tejido y para 3 mg/ml se obtuvieron  $1543,9 \pm 104,5$  células/mg tejido.

Se detectaron diferencias significativas ( $p \leq 0,001$ ) entre los rendimientos celulares obtenidos con la concentración de colagenasa 1 mg/ml y el resto de concentraciones. Sin embargo, no existieron diferencias entre los rendimientos celulares con la concentración de colagenasa 2 mg/ml y 3 mg/ml (Figura 27).

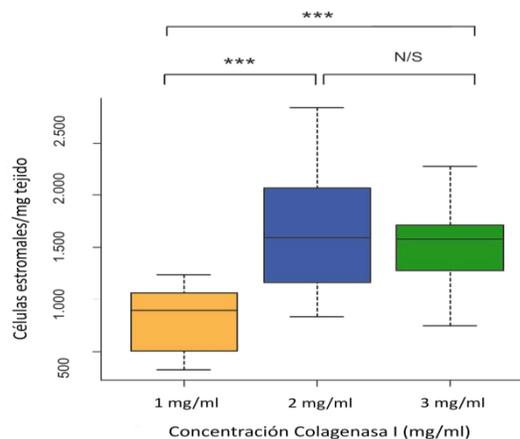


Figura 27. Representación en cajas y bigotes del rendimiento de células estromales. El número de células estromales aisladas por mg de conjuntiva bulbar digerida en función de la concentración de colagenasa I. \*\*\* $p \leq 0,001$ ; N/S: No significación;  $n=15$ .

#### 5.4.2. Análisis del rendimiento celular: células epiteliales

El número de células epiteliales aisladas por miligramo de tejido digerido varió en función del tiempo de incubación del tejido restante con la solución T/E. Los valores de rendimiento se ajustaron a una normal, al realizar un ANOVA unifactorial se identificó el nivel de significación (Tabla 8) y se llevó a cabo un análisis *post hoc* con el test de Tukey para la comparación entre los tiempos de incubación.

Tabla 8. ANOVA para el tiempo de incubación con la solución T/E.

	GL	Valor F	P (>F)
Tiempo	2	26,093	4,311e-08 ***
Residuos	42		

GL: Grados de libertad; P: Probabilidad. \*\*\* $p \leq 0,001$ .

Un tiempo de incubación menor de 120 minutos, supone un menor número de células epiteliales aisladas: tras 180 minutos de incubación con la solución T/E del tejido restante de la digestión con 1 mg/ml de colagenasa I se obtuvieron  $36445,3 \pm 3102,5$  células/mg tejido; después de 120 minutos de incubación con la solución T/E del tejido restante de la digestión con 2 mg/ml de colagenasa I se obtuvieron  $36094,9 \pm 3847,7$  células/mg tejido y tras 60 minutos de incubación con la solución T/E del tejido restante de la digestión con 3 mg/ml de colagenasa I se obtuvieron  $16166,0 \pm 1192,6$  células/mg tejido.

Observándose diferencias significativas ( $p \leq 0,001$ ) entre el tiempo de incubación 60 minutos y el resto de tiempos. Sin embargo, no existieron diferencias cuando los tiempos de incubación fueron 180 y 120 minutos (Figura 28).

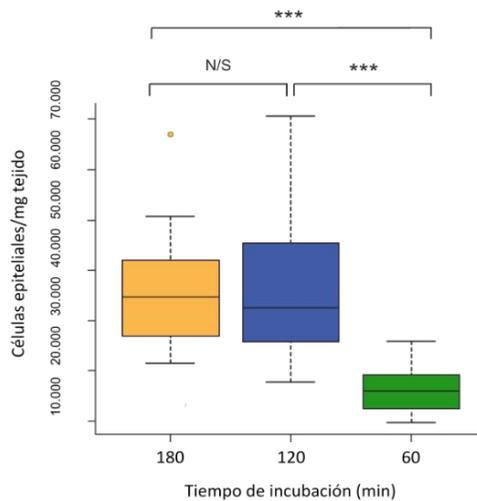


Figura 28. Representación en cajas y bigotes del rendimiento de células epiteliales. El número de células epiteliales aisladas por mg de conjuntiva bulbar digerida en función del tiempo de digestión con la solución enzimática T/E. Los círculos corresponden a valores atípicos. \*\*\* $p \leq 0,001$ ; N/S: No significación;  $n=15$ .

#### 5.4.3. Establecimiento de cultivos primarios

En todos los casos, los cultivos primarios conjuntivales (CPCs) obtenidos presentaron una morfología fusiforme con prolongaciones citoplasmáticas alargadas, en el caso de las células estromales (Figura 29) y aspecto poligonal, en el caso de las células epiteliales (Figura 30).

Las células estromales, aisladas del tejido conjuntival después de la incubación con colagenasa tipo I, se mantuvieron entre 7 y 10 días hasta que alcanzaron el estado de preconfluencia.

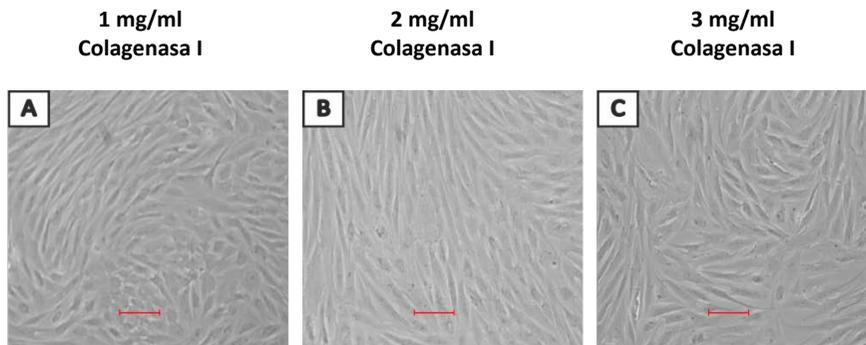


Figura 29. Morfología celular estromal en los cultivos primarios en función de la concentración de colagenasa tipo I. (A) 1 mg/ml. (B) 2 mg/ml. (C) 3 mg/ml.

Las células epiteliales, aisladas del tejido conjuntival después de la incubación con la solución de T/E, se mantuvieron hasta que alcanzaron el estado de preconfluencia, aproximadamente 14 días.

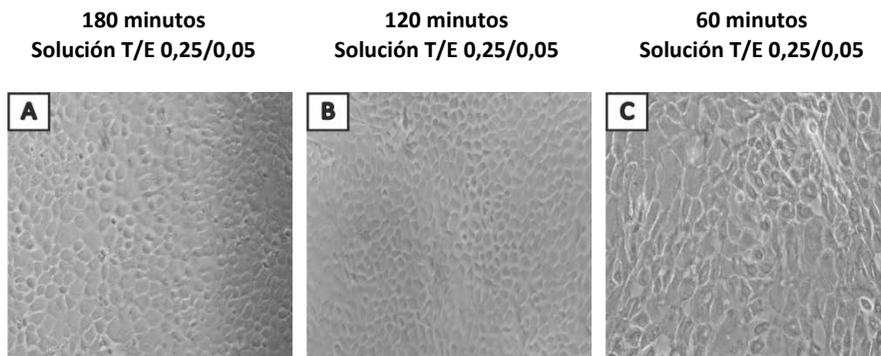


Figura 30. Morfología celular epitelial en los cultivos primarios en función del tiempo de incubación con la solución enzimática T/E 0,25/0,05. (A) 180 minutos. (B) 120 minutos. (C) 60 minutos.

Del análisis de los resultados de rendimiento celular se determinó el protocolo de aislamiento óptimo para la obtención de los componentes celulares de la conjuntiva. La concentración de colagenasa tipo I establecida fue 2 mg/ml debido a que el número de células estromales obtenidas fue similar al obtenido con la concentración de enzima 3 mg/ml, no existiendo diferencias significativas. Además, la morfología de las células obtenidas fue claramente fusiforme.

El tiempo de incubación con la solución T/E para la digestión del tejido restante y obtención de las células epiteliales fue 120 minutos, el tiempo de incubación correspondiente después de la incubación con la enzima colagenasa tipo I a concentración 2 mg/ml.

En resumen, el protocolo establecido para el aislamiento de los componentes celulares de la conjuntiva porcina consta de dos pasos:

1. Digestión enzimática de la biopsia con una solución de colagenasa tipo I a una concentración de 2 mg/ml durante 24 horas para el aislamiento de las células estromales.
2. Digestión enzimática del tejido restante con una solución T/E 0,25/0,05 durante 120 minutos para la obtención de las células epiteliales.

Una vez establecido el protocolo de aislamiento, las células obtenidas se caracterizaron fenotípicamente. Para ello, se sometieron al análisis de la expresión de proteínas específicas mediante técnicas de inmunofluorescencia.

#### 5.4.4. Análisis de la expresión proteica por inmunofluorescencia: células estromales

Las células de naturaleza estromal en P1, P4 y P14 se sometieron a estudios de expresión de los marcadores específicos: vimentina y CD90 (Figura 31).

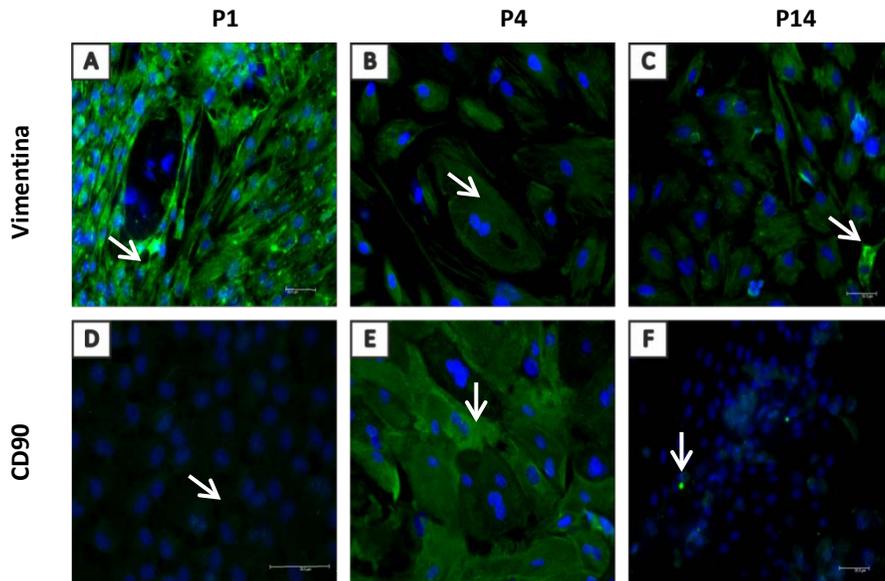


Figura 31. Expresión de marcadores de células estromales en los cultivos de la zona bulbar. (A, B, C) Expresión del marcador vimentina a P1, P4 y P14. (D, E, F) Expresión del marcador CD90 a P1, P4 y P14. La flecha blanca indica la zona positiva en cada caso. Barra de escala 50  $\mu$ m.

El análisis del marcador vimentina, mostró elevada positividad en los cultivos iniciales. A medida que avanzaba el tiempo en cultivo, las células estromales seguían siendo positivas para dicho marcador, incluso en fase 14 (P14).

La presencia del marcador CD90, específico de células mesenquimales (Tirosina 1), también muestra la naturaleza estromal de las células aisladas. En este caso, a medida que avanza el tiempo en cultivo de las células estromales aisladas aumenta la expresión de CD90. Véase células en fase 4 (P4). Se observa como en fases tardías de cultivo, la expresión del marcador disminuye.

#### 5.4.5. Análisis de la expresión proteica por inmunofluorescencia: células epiteliales

Las células de naturaleza epitelial en P1, P4 y P14 se sometieron a estudios de expresión del marcador citoqueratina-7 (Ck7) para su caracterización fenotípica (Figura 32).

Además, también se determinó la presencia de la proteína E-Cadherina en P4 (Figura 33).

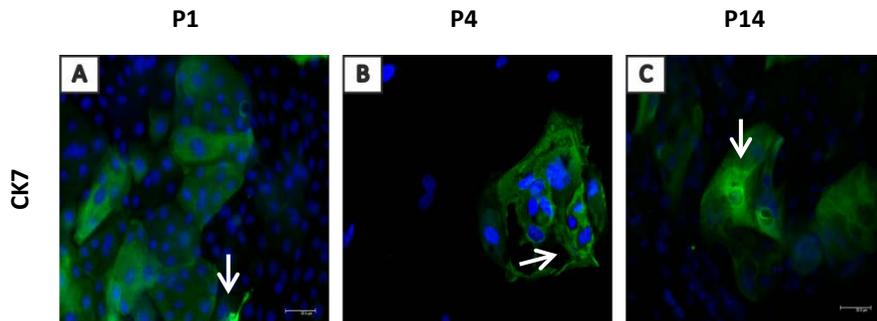


Figura 32. Expresión de marcadores de células epiteliales en los cultivos de la zona bulbar. (A, B, C) Expresión del marcador Ck7 a P1, P4 y P14. Barra de escala 50  $\mu$ m.

Se observó cómo se mantiene a lo largo del tiempo en cultivo la expresión de la citoqueratina-7 (Ck7). La presencia de este marcador específico, muestra la naturaleza epitelial de las células aisladas, incluso en fase 14.

Además, se confirmó a fase 4 la presencia de la molécula de adhesión celular E-Cadherina. Se trata de la proteína de membrana propia de las uniones adherentes de las células epiteliales.

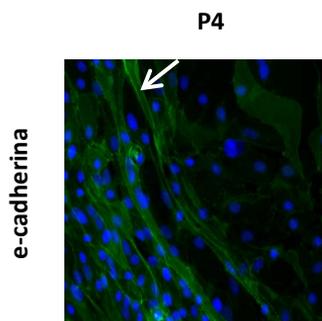


Figura 33. Expresión de la molécula de adhesión celular E-Cadherina en células epiteliales en fase 4. La flecha blanca indica la zona positiva. Barra de escala 50  $\mu$ m.

#### 5.4.6. Análisis de la expresión proteica por inmunofluorescencia: células caliciformes

Las células de naturaleza epitelial en P1, P4 y P14 se sometieron a estudios de inmunofluorescencia para detectar la presencia de células secretoras de mucinas. Los marcadores utilizados para este estudio fueron la proteína vegetal lectina y el marcador específico de células caliciformes, MUC5AC.

El análisis del marcador lectina (Figura 34), mostró elevada positividad en los cultivos iniciales. A medida que avanzaba el tiempo en cultivo, las células epiteliales aisladas seguían siendo positivas para dicho marcador mostrando la presencia de carbohidratos. La expresión disminuye en pases tardíos de cultivo.

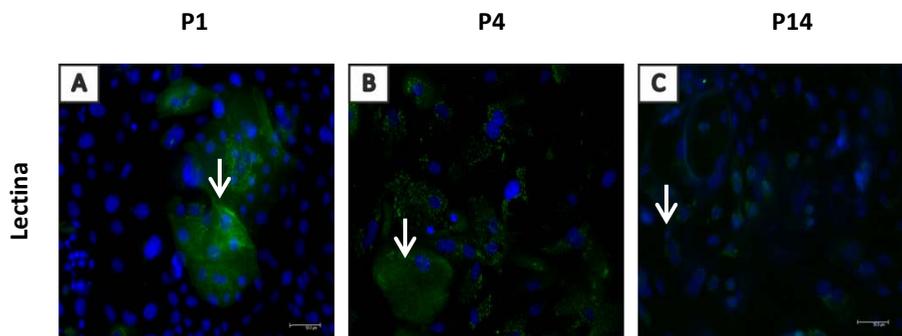


Figura 34. Expresión del marcador lectina. (A, B, C) Análisis del marcador lectina en P1, P4 y P14. La flecha blanca indica la zona positiva en cada caso. Barra de escala 50  $\mu$ m.

El marcador MUC5AC, específico de células caliciformes de la conjuntiva, presentó una ligera positividad a pases tempranos; no estando presente en los pases más avanzados en cultivo (Figura 35).

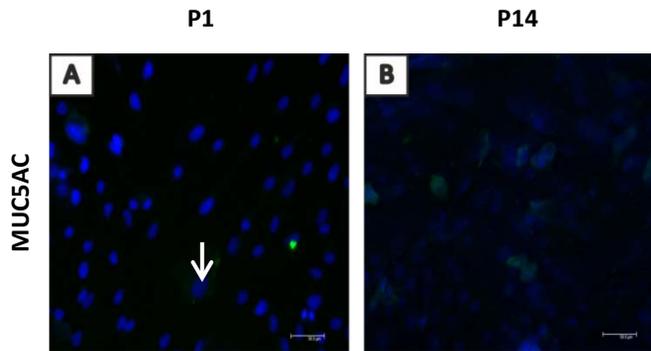


Figura 35. Expresión de marcadores de células secretoras de mucinas en células epiteliales. A. Análisis de la expresión de MUC5AC en P1. B. Análisis de la expresión de MUC5AC en P14. Barra de escala 50  $\mu$ m.

Los resultados obtenidos, tanto para células estromales como para células epiteliales se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9. Resultados de los estudios de inmunofluorescencia realizados sobre células de naturaleza estromal y epitelial en P1, P4 y P14. Los grados de intensidad de fluorescencia se definen como: -, no fluorescencia; (+), intensidad de fluorescencia leve; +, intensidad de fluorescencia moderada; ++, intensidad de fluorescencia fuerte.

Marcador	Especificidad	P1	P4	P14
Vimentina	Células estromales	++	+	+
CD90	Células mesenquimales (Tirosina-1)	(+)	++	(+)
Ck7	Epitelio secretor	++	++	++
E-Cadherina	Epitelio: uniones adherentes		++	
Lectina	Carbohidratos: N-Acetilgalactosamina/galactosa	++	+	(+)
MUC5AC	Células caliciformes	(+)		-

La caracterización inmunohistoquímica mostró que las células que habían sido obtenidas mediante el protocolo de aislamiento elegido como óptimo, presentaban positividad para marcadores específicos de células estromales, de células epiteliales y de células de naturaleza caliciforme.

A continuación, tras determinar la concentración de colagenasa tipo I óptima para el aislamiento de células estromales y, después de determinar el tiempo de incubación apropiado con la solución T/E para la obtención de células epiteliales, se procesaron 15 globos oculares con párpado. Se aplicó el protocolo anteriormente establecido en todas las zonas de la conjuntiva: bulbar, fórnix, tarsal y unión mucocutánea.

## 5.5. Definición de la zona de obtención

Se determinó la zona óptima de la conjuntiva para el aislamiento celular mediante el análisis del rendimiento celular, la morfología celular, la proliferación celular y la síntesis de mucopolisacáridos neutros.

Todas las muestras de la conjuntiva: zona bulbar (n=15), zona del fondo de saco o fórnix (n=15), zona tarsal (n=15) y zona de la unión mucocutánea (n=15) se procesaron satisfactoriamente para el aislamiento de sus componentes celulares y su posterior análisis.

### 5.5.1. Análisis del rendimiento celular: células estromales

El número de células estromales aisladas por miligramo de tejido digerido no varió en función de la zona de la conjuntiva de estudio. Se aplicó el modelo lineal generalizado para el análisis de los valores de rendimiento y se comprobó que se ajustaba a una normal. Se identificó el nivel de significación (Tabla 10) realizando un ANOVA sobre el modelo lineal generalizado.

Tabla 10. ANOVA para el rendimiento de células estromales.

	GL	Valor F	P (>F)
Zona	3	1,8937	0,1383
Residuos	56		

GL: Grados de libertad; P: Probabilidad.

En función de la zona de la conjuntiva el número de células estromales aisladas fue similar: en la zona bulbar  $399,3 \pm 57,4$  células/mg tejido; en la zona del fórnix  $479,8 \pm 50,0$  células/mg tejido; en la zona tarsal  $330,8 \pm 43,0$  células/mg tejido y en la zona de la unión mucocutánea  $451,0 \pm 40,2$  células/mg tejido. No existiendo diferencias significativas entre las zonas (Figura 36).

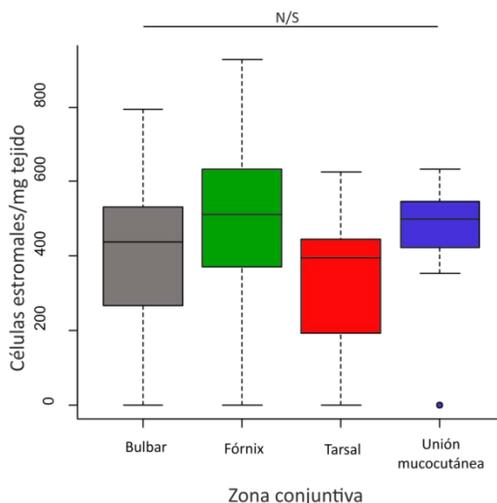


Figura 36. Representación en cajas y bigotes del rendimiento de células estromales. El número de células estromales aisladas por mg de conjuntiva digerida en función de la zona de obtención. Los círculos corresponden a valores atípicos. N/S: No significación; n=15.

### 5.5.2. Análisis del rendimiento celular: células epiteliales

El número de células epiteliales aisladas por miligramo de tejido digerido varió en función de la zona de la conjuntiva de estudio. Para el análisis de los valores de rendimiento, se aplicó el modelo lineal generalizado comprobándose que se ajustaba a una normal. Realizando un ANOVA sobre el modelo lineal se identificó el nivel de significación (Tabla 11) y se realizó la comparación entre zonas mediante un análisis *post hoc* con el test de Tukey.

Tabla 11. ANOVA para el rendimiento de células epiteliales.

	GL	Valor F	P (>F)
Zona	3	21,737	3,962e-10 ***
Residuos	56		

GL: Grados de libertad; P: Probabilidad. \*\*\*p≤0,001.

En función de la zona de la conjuntiva el número de células epiteliales aisladas fue diferente: en la zona bulbar 20.387,1±1723,4 células/mg tejido; en la zona del fórnix 50.315,8±4.673,3 células/mg tejido; en la zona tarsal 30.531,7±3.123,4 células/mg tejido y en la zona de la unión mucocutánea 13.416,2±1.677,0 células/mg tejido. Se

detectaron diferencias significativas entre la zona del fórnix ( $p \leq 0,001$ ) y el resto de zonas, y entre la zona tarsal y la zona de la unión mucocutánea ( $p \leq 0,01$ ) (Figura 37).

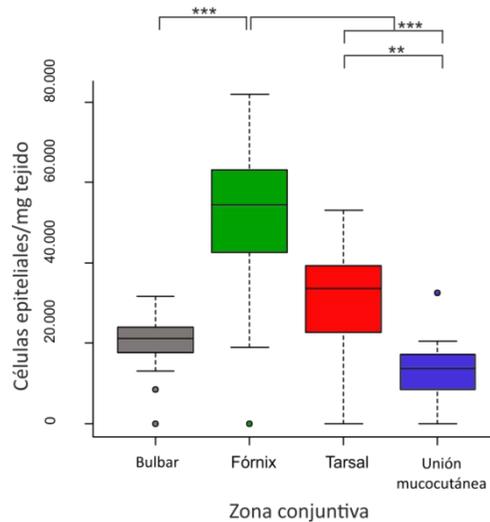


Figura 37. Representación en cajas y bigotes del rendimiento de células epiteliales. El número de células epiteliales aisladas por mg de conjuntiva digerida en función de la zona de obtención. Los círculos corresponden a valores atípicos. \*\*\* $p \leq 0,001$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; N/S: No significación;  $n=15$ .

### 5.5.3. Análisis de la morfología celular

Los cultivos primarios conjuntivales (CPCs) obtenidos, presentaron una población celular con morfología homogénea, fusiforme con prolongaciones citoplasmáticas alargadas en el caso de las células estromales (Figura 38) y poligonal para las células epiteliales productoras de mucopolisacáridos (Figura 39), y esta morfología se mantuvo en los posteriores subcultivos.

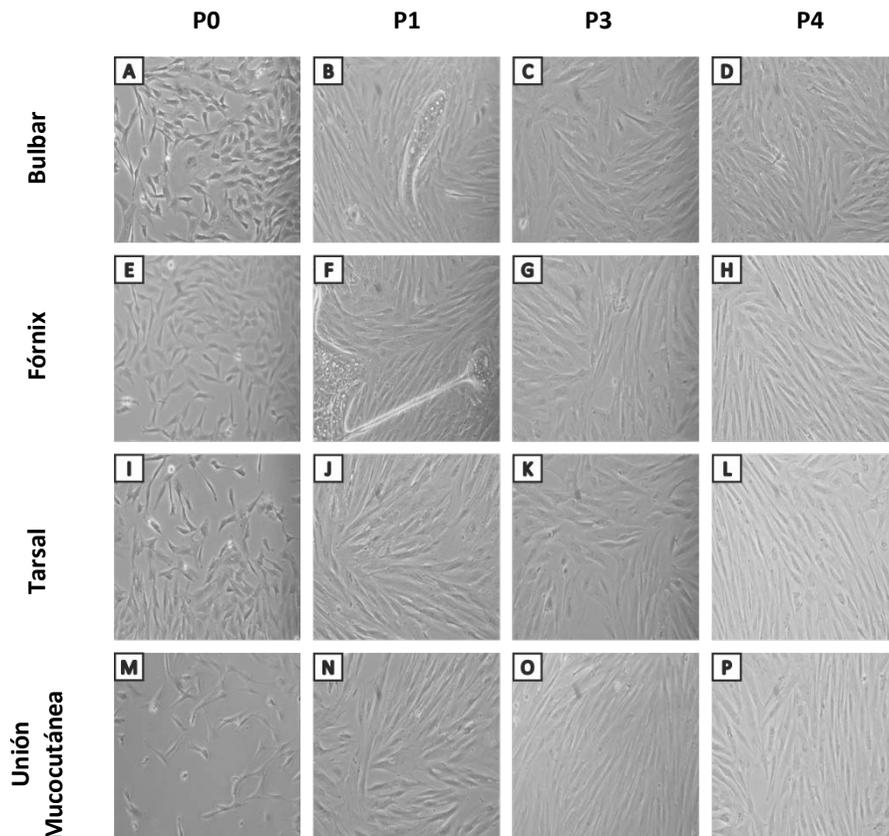


Figura 38. Morfología celular estromal en los cultivos primarios (P0), y P1, P3 y P4 en función de la zona de la conjuntiva de aislamiento. (A-D) Zona bulbar. (E-H) Zona del fórnix. (I-L) Zona tarsal. (M-P) Zona de la unión mucocutánea.

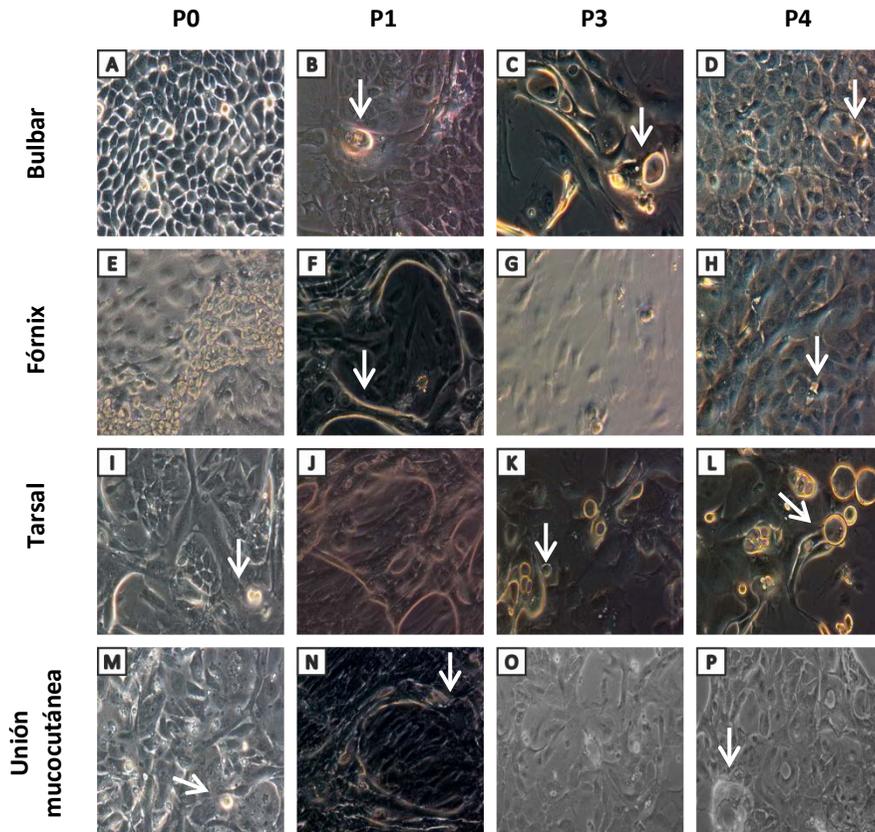


Figura 39. Morfología celular epitelial en los cultivos primarios (P0), y P1, P3 y P4 en función de la zona de la conjuntiva de aislamiento. (A-D) Zona bulbar. (E-H) Zona del fórnix. (I-L) Zona tarsal. (M-P) Zona de la unión mucocutánea. La fecha blanca indica los mucopolisacáridos secretados.

#### 5.5.4. Análisis de la proliferación celular

Se estableció el patrón proliferativo de las células estromales (n=15) y de las células epiteliales (n=15) de cada una de las 4 zonas de estudio de la conjuntiva a pase 2 (P2), mediante el recuento de células cada 2 días durante 12 días.

#### 5.5.4.1. Análisis de la proliferación: células estromales

En el caso de las células estromales (Figura 40), se observó una mayor proliferación celular en la zona bulbar de la conjuntiva existiendo diferencias significativas ( $p \leq 0,001$ ) con respecto a la zona de la unión mucocutánea y también a la zona tarsal ( $p \leq 0,01$ ).

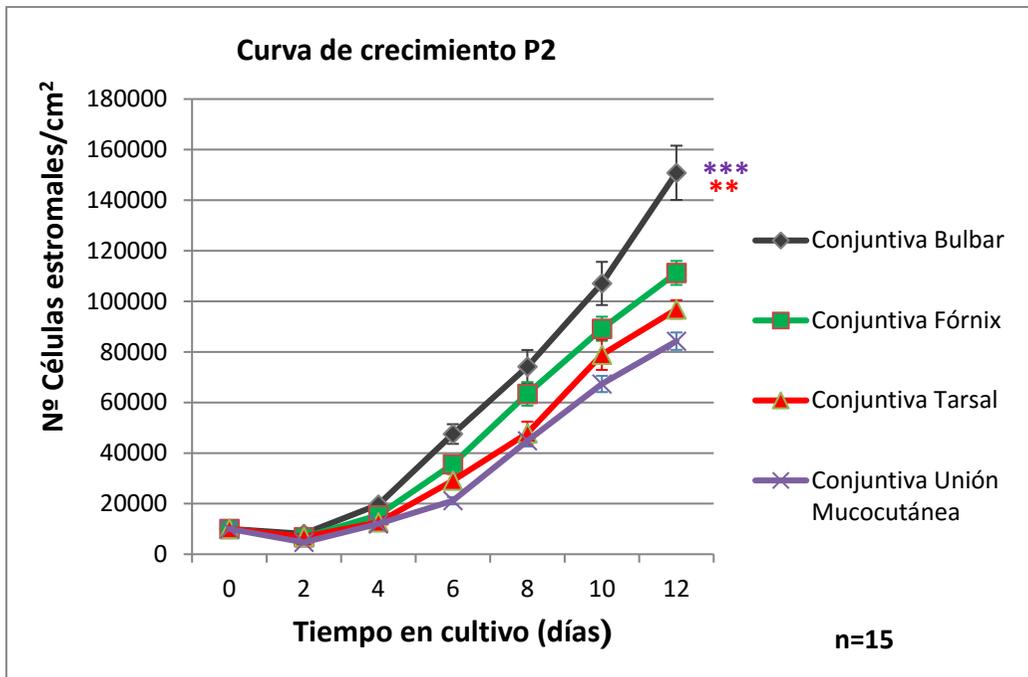


Figura 40. Curva de proliferación de células estromales a pase 2. Células aisladas de la zona bulbar ( $n=15$ ), de la zona del fórnix ( $n=15$ ), de la zona tarsal ( $n=15$ ) y de la zona de unión mucocutánea ( $n=15$ ). \*\*\* $p \leq 0,001$ ; \*\* $p \leq 0,01$ .

#### 5.5.4.2. Análisis de la proliferación: células epiteliales

El recuento de las células epiteliales (Figura 41) confirmó su menor capacidad proliferativa con respecto a las células estromales. El análisis de su patrón proliferativo puso en evidencia una menor capacidad proliferativa de las células epiteliales aisladas de la unión mucocutánea de la conjuntiva existiendo diferencias significativas ( $p \leq 0,001$ ) con respecto a las células aisladas de la zona bulbar y también de la zona del fórnix ( $p \leq 0,01$ ).

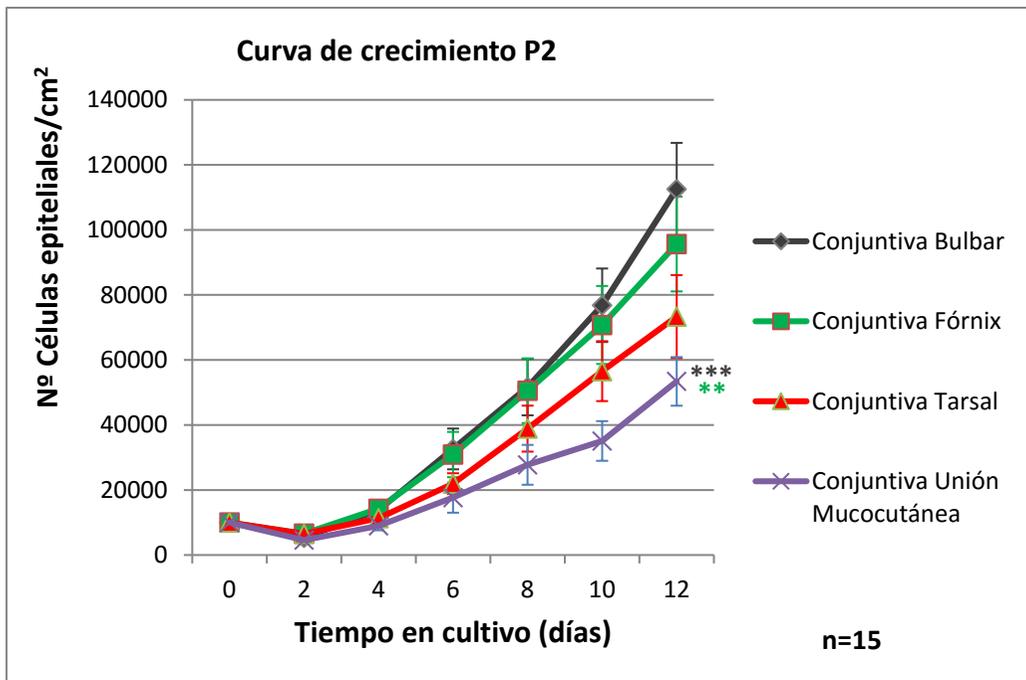


Figura 41. Curva de proliferación de células epiteliales a fase 2. Células aisladas de la zona bulbar ( $n=15$ ), de la zona del fórnix ( $n=15$ ), de la zona tarsal ( $n=15$ ) y de la zona de unión mucocutánea ( $n=15$ ). \*\*\* $p \leq 0,001$ ; \*\* $p \leq 0,01$ .

#### 5.5.5. Tinción de ácido periódico Schiff

Se realizó la tinción PAS para detectar la presencia de mucopolisacáridos neutros. Para la cuantificación del grado de tinción PAS se establecieron los parámetros detallados en la Tabla 12, considerándose como control negativo la tinción de células estromales aisladas de la conjuntiva.

Tabla 12. Parámetros de intensidad de tinción PAS.

Simbología	Grado de intensidad de PAS	Foto
-	No presenta tinción PAS	
(+)	Intensidad de tinción leve	
+	Intensidad de tinción moderada	
++	Intensidad de tinción fuerte	

Esta técnica utiliza el ácido periódico de Schiff que oxida los grupos hidroxilo (OH) de dos carbonos cercanos formando grupos aldehídos. Estos grupos aldehídos son reconocidos por el reactivo de Schiff, el cual se combina con ellos para dar un color rosa intenso.

Se analizaron los cultivos de células epiteliales (n=15) a pase 0 (P0) de cada zona de la conjuntiva (Figura 42) indicando el resultado como el porcentaje representativo de cada grado de tinción en función zona de estudio.

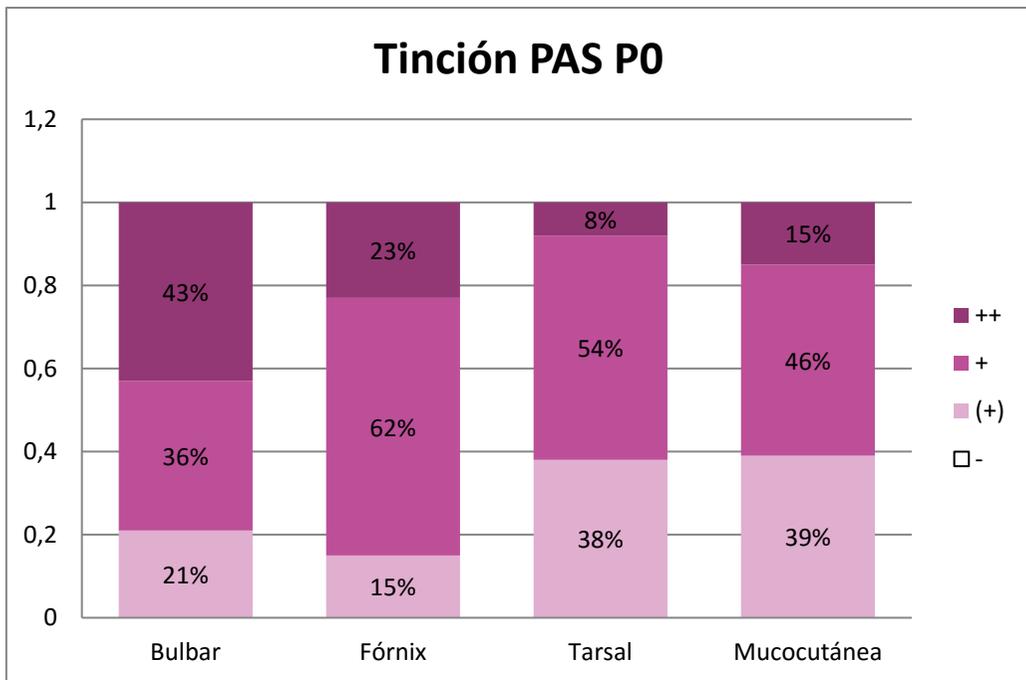


Figura 42. Representación en porcentaje de la intensidad de tinción PAS en las células epiteliales a fase 0 en función de la zona de la conjuntiva.

Mientras que todas las zonas presentaron una intensa tinción para PAS, se observó un mayor porcentaje de células epiteliales con tinción fuerte para PAS en el caso de la zona bulbar.

Se analizaron todos los cultivos de células epiteliales (n=15) a fase 1 de cada zona de la conjuntiva (Figura 43) indicando el resultado como el porcentaje representativo de cada grado de tinción en función de la zona de estudio.

Se observó cómo un mayor porcentaje de células epiteliales aisladas de la zona bulbar presentaron tinción fuerte para PAS. Y como el resto de zonas presentaron una tinción intensa para PAS.

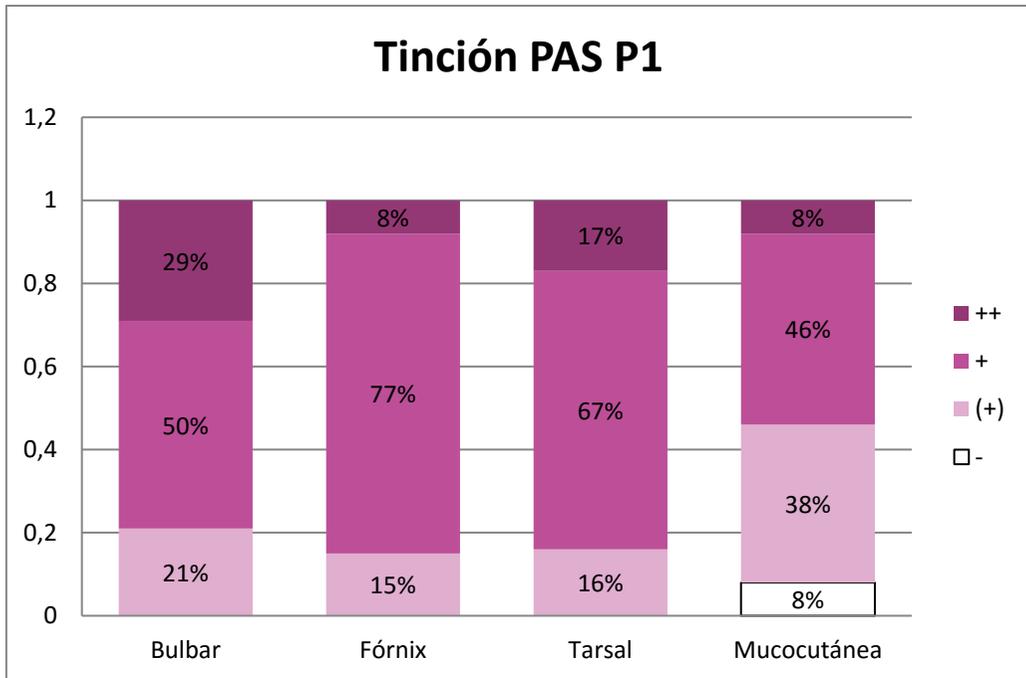


Figura 43. Representación en porcentaje de la intensidad de tinción PAS en las células epiteliales a fase 1 en función de la zona de la conjuntiva.

A medida que avanzaron los subcultivos celulares se confirmó la pérdida de síntesis de mucopolisacáridos, excepto en las células epiteliales obtenidas de la zona tarsal de la conjuntiva donde se aprecia una intensidad fuerte para PAS 17% frente al 8% en P0. Aunque en las células epiteliales aisladas de la zona bulbar también disminuyó la síntesis de mucopolisacáridos en P1, presentaron el mayor porcentaje de tinción fuerte para PAS (29%).

De la determinación de los resultados de rendimiento celular y proliferación celular, y del análisis de la morfología de las células estromales y epiteliales obtenidas de las 4 zonas de la conjuntiva, así como del grado de tinción PAS de las células epiteliales, se seleccionó la conjuntiva bulbar como la zona de obtención de células conjuntivales para los siguientes estudios.

Los resultados obtenidos en el Capítulo 1 se pueden resumir en las siguientes observaciones.

1. Es posible la obtención de los dos componentes celulares de la conjuntiva porcina utilizando un protocolo enzimático combinado:  
Colagenasa I (2 mg/ml) durante 24 horas  
Tripsina/EDTA (0,25/0,02) durante 120 minutos  
Las células aisladas mediante este protocolo presentaban un mayor rendimiento celular y positividad para marcadores específicos.
2. Dependiendo de la zona de la conjuntiva de aislamiento para la obtención de células, el rendimiento de las células epiteliales aisladas fue diferente. También presentaron patrones de proliferación diferentes tanto para células estromales como epiteliales.
3. Se ha puesto de manifiesto las propiedades secretoras de las células epiteliales aisladas, confirmándose la presencia de células PAS positivas, sobre todo en las células aisladas de la zona bulbar de la conjuntiva.
4. Las células obtenidas de la zona bulbar son las que presentan mayor capacidad proliferativa, y las que mejor mantienen las características fenotípicas a medida que transcurre el tiempo en cultivo.

## V- CAPÍTULO 1. DISCUSIÓN

En este primer capítulo se ha conseguido la optimización de un protocolo de aislamiento para la obtención de los principales componentes celulares que forman parte de la conjuntiva: células estromales y células epiteliales. Para ello se han empleado muestras oculares de origen porcino.

Aunque algunos autores han utilizado muestras de origen humano procedentes de pequeñas biopsias de pacientes sometidos a cirugía de cataratas<sup>34</sup> para el estudio de poblaciones celulares oculares, las dificultades que presenta actualmente la utilización de muestras de origen humano en investigación biomédica<sup>162</sup> limita las posibilidades de acceder a las mismas para el diseño y el desarrollo de estudios experimentales. Por ello se tiende a plantear como alternativa el empleo de modelos animales que se asemejen al modelo humano.

Aunque los primates<sup>163</sup> representan el modelo filogenéticamente más cercano al hombre, los problemas éticos y económicos asociados, limitan enormemente su uso en investigación.

Durante muchos años, se han utilizado pequeños modelos animales como la rata<sup>164</sup> o el conejo<sup>165</sup> como modelos experimentales en oftalmología, debido a las ventajas metodológicas que suponen su bajo coste y su pequeño tamaño (fácil manipulación y estabulación y posibilidad de emplear un número relativamente grande de animales en un experimento). Sin embargo, su anatomía y fisiología se alejan demasiado de las del ser humano, lo que dificulta la traslación de los resultados obtenidos en estos modelos a la clínica humana.

El cerdo representa la mejor alternativa como animal de experimentación en oftalmología debido a su anatomía y fisiología, tan similares al modelo humano. Es por eso que en los últimos años, el cerdo ha sido utilizado en investigación oftalmológica como modelo de estudio en enfermedades como la retinitis pigmentosa<sup>166</sup> o en enfermedades que afectan a la superficie ocular<sup>167,168</sup>.

A la hora de plantear un estudio con poblaciones celulares conjuntivales, la primera limitación que nos encontramos es la ausencia de técnicas de digestión estandarizadas para la obtención de los componentes celulares de la conjuntiva de manera independiente. Debido a que la mayoría de los estudios se centran en la obtención de las células epiteliales del epitelio conjuntival mediante el cultivo por explante<sup>169</sup>, bien sobre una capa alimentadora de fibroblastos 3T3 murinos<sup>170</sup>, bien sobre un soporte tisular como la membrana amniótica descelularizada<sup>171</sup>. Mediante este método se promueve únicamente el establecimiento del cultivo primario de células epiteliales.

El establecimiento de un protocolo de aislamiento celular ha sido desde hace años motivo de estudio<sup>172</sup> puesto que permitiría obtener células caliciformes de la conjuntiva que son las que generan un mayor interés, al relacionarse el síndrome de ojo seco mucodeficiente con una deficiente secreción de mucina.

Para el desarrollo de un modelo experimental de conjuntiva porcina, además de la obtención de las células epiteliales, es indispensable el aislamiento del principal componente celular de la lámina propia y para ello la única alternativa posible para conseguir el aislamiento de dos poblaciones celulares de una misma biopsia es a través de protocolos de digestión enzimática.

Para el establecimiento del protocolo de obtención fue necesaria la combinación de dos enzimas, así como definir la concentración y el tiempo de digestión de cada una. Al tratarse de muestras biológicas procedentes de matadero, previo al proceso de digestión, las muestras se sometieron a un protocolo de esterilización para evitar posibles contaminaciones.

De este modo, la digestión con colagenasa 2 mg/ml durante 24 horas, permitió el aislamiento del componente celular de la lámina propia, es decir, de las células estromales; teniendo en cuenta el rendimiento celular y la positividad para los marcadores específicos como vimentina, sobre todo en P1 y CD90 en P4. Las células estromales se mantuvieron en cultivo durante varios pases, detectándose una disminución en la expresión de los marcadores específicos en el P14.

La digestión con la enzima Tris/EDTA 0,25/0,02 del tejido restante durante 120 minutos, facilitó la obtención de las células epiteliales. La caracterización de estas células mediante técnicas inmunohistoquímicas, puso de manifiesto la positividad para marcadores específicos tales como citoqueratina 7 incluso en pase 14, así como E-Cadherina en pase 4.

Además, en las células se observó una pequeña cantidad de la mucina secretora MUC5AC mediante el ensayo de inmunofluorescencia<sup>34,35,173</sup>. Posiblemente, este marcador no sea reactivo para células caliciformes de origen porcino. En cambio, la detección de lectina reflejó la síntesis de mucopolisacáridos.

Uno de los principales problemas, cuando se establece un cultivo primario de células epiteliales, es la contaminación con células estromales<sup>174,175</sup>. En el presente estudio, las colonias de células estromales que aparecieron en los cultivos, fueron eliminadas mediante la incubación con tripsina durante un corto periodo de tiempo, sin afectar a la viabilidad de las células epiteliales. Consiguiendo de esta manera establecer cultivos puros de células epiteliales mediante tripsinización diferencial.

Además, las células epiteliales fueron cultivadas directamente sobre superficies plásticas, sin necesidad de utilizar una monocapa de fibroblastos 3T3 murinos como capa alimentadora<sup>170,176</sup>, con lo que evitamos el riesgo de retrovirus asociados en una adaptación al modelo humano<sup>177-180</sup>.

En relación a la zona de obtención de las biopsias de estudio, actualmente no se ha descrito qué localización anatómica de la conjuntiva presenta mejores características como fuente de estudio. Por esta razón, en este estudio hemos considerado necesario, realizar un estudio comparativo aplicando el protocolo de aislamiento establecido a las cuatro zonas de la conjuntiva. Se analizó el rendimiento celular, la morfología celular, la proliferación celular y la síntesis de mucopolisacáridos, para definir el mejor origen tisular.

Mediante el análisis del rendimiento celular, aunque el rendimiento de células estromales fue mayor en el fórnix no existieron diferencias significativas con respecto al resto de zonas de aislamiento. Por el contrario, el rendimiento de células epiteliales fue claramente mayor en el fórnix, existiendo diferencias significativas con respecto al resto de zonas. Por lo tanto, existe una mayor población de células epiteliales en la zona del fórnix de la conjuntiva porcina, tal y como ocurre en el fórnix humano<sup>31</sup>; poniendo de manifiesto la homología ocular entre ambas especies.

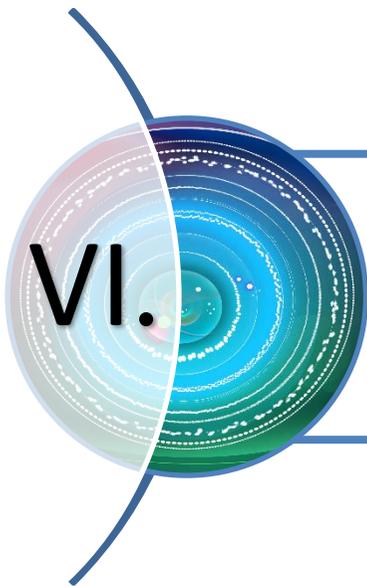
El análisis microscópico confirmó la morfología característica de cada tipo celular<sup>172,181,182</sup> en cada zona en el pase inicial, así como en el pase 1, pase 3 y pase 4. Poniéndose de manifiesto la síntesis de mucopolisacáridos en las células epiteliales.

El estudio de proliferación celular durante el pase celular 2 sirvió para determinar que las células aisladas de la zona bulbar destacaban por su elevada capacidad proliferativa, asegurándose de este modo, obtener un número celular óptimo para estudios posteriores.

Mediante la tinción PAS, específica para mucopolisacáridos neutros, se valoró la síntesis de mucinas en las células epiteliales en pase inicial y en pase 1, poniéndose de manifiesto que las células aisladas de la zona bulbar presentaban mayor capacidad de síntesis.

Por todo lo anterior, los estudios de este capítulo permiten concluir que la zona bulbar de la conjuntiva representa la mejor fuente tisular para la obtención de pequeñas biopsias que después de la aplicación del protocolo de aislamiento establecido, permitan la obtención de células estromales y células epiteliales, que servirán como componente celular de los andamiajes tridimensionales que se optimizarán en los capítulos siguientes.





**CAPÍTULO 2:**  
**DISEÑO DE LA PRIMERA**  
**GENERACIÓN DE ANDAMIAJES DE**  
**FIBRINA**



El material empleado para el desarrollo del presente estudio está detallado en el Anexo I, mientras que los protocolos empleados aparecen descritos en el Anexo II.

El segundo capítulo de este trabajo está basado en el diseño de andamiajes tridimensionales utilizando como biomaterial biológico la fibrina procedente de plasma fresco o de crioprecipitado de plasma fresco, cultivando en su interior células estromales y en su superficie células epiteliales, aisladas a partir de conjuntiva porcina.

### ETAPA 1:

Se determinó la composición del andamiaje más idóneo cultivando en su interior células estromales aisladas de la conjuntiva porcina. Se validó el diseño mediante el análisis del mantenimiento de la morfología celular en su interior, de la proliferación celular y de la correcta distribución a las 2 semanas de estudio (Figura 44).

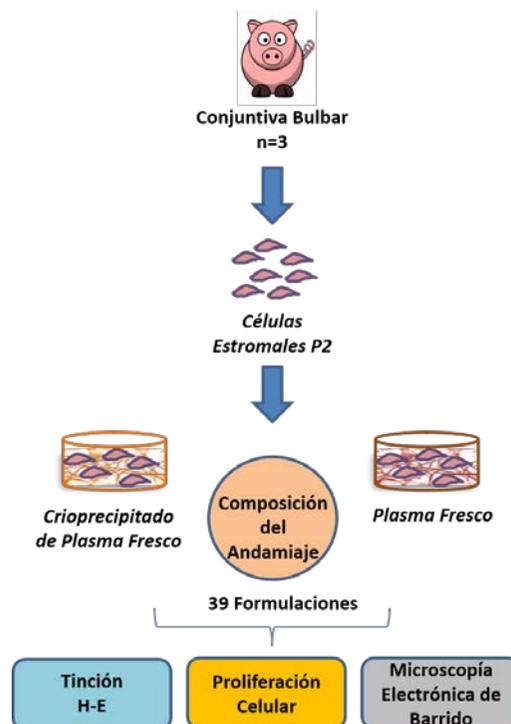


Figura 44. Estudio para la determinación de la composición del andamiaje idóneo. Análisis del mantenimiento de la morfología estromal en el interior del andamiaje, de la proliferación celular y de la distribución celular.

## ETAPA 2:

Una vez establecida la composición del andamiaje, se cultivaron en su interior células estromales aisladas de la conjuntiva porcina y mediante digestión enzimática con colagenasa I, se determinó el perfil proliferativo en su interior. También se analizaron la morfología y el fenotipo celular en el cultivo tridimensional y la distribución celular en el andamiaje a las 2 semanas de estudio. Se realizaron los mismos estudios cuando las células epiteliales aisladas de la conjuntiva porcina se cultivaron sobre la superficie del andamiaje tridimensional (Figura 45).

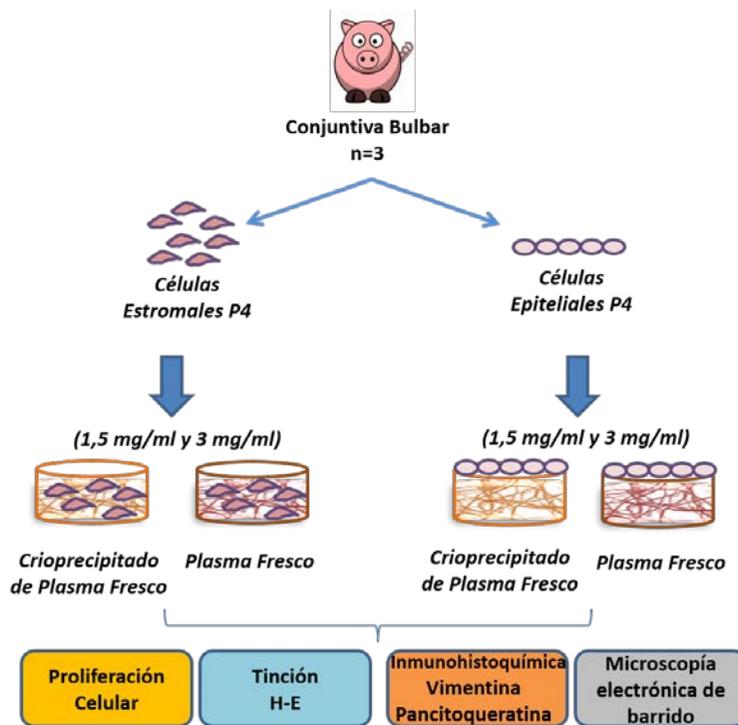


Figura 45. Cultivo de las células aisladas de la conjuntiva en los diferentes tipos de andamiajes tridimensionales. Análisis de la proliferación celular mediante digestión enzimática, determinación de la morfología celular, la caracterización fenotípica de cada tipo celular y la distribución en el andamiaje.

### ETAPA 3:

Además, en este capítulo se puso a punto una técnica para determinar la proliferación en los andamiajes a lo largo del tiempo sin tener que ser digeridos previamente. El método utilizado es el Alamar Blue basado en la actividad mitocondrial de las células viables (Figura 46).

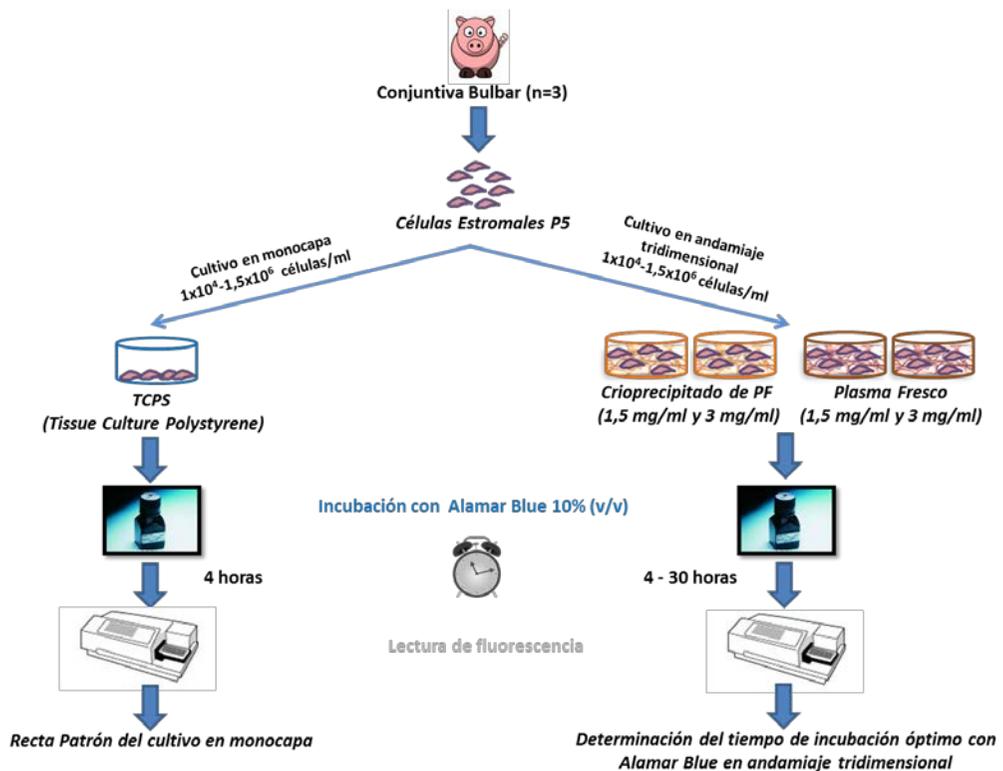


Figura 46. Determinación del patrón de proliferación en el interior del andamiaje tridimensional mediante el método Alamar Blue. Células estromales en P5 se utilizaron para el cultivo en TCPS y para el cultivo en andamiaje tridimensional a las mismas densidades celulares de siembra ( $1 \times 10^4$  –  $1,5 \times 10^6$ ). El % de reducción del AB para las células estromales cultivadas en TCPS se calculó tras 4 horas de incubación con AB. El tiempo de incubación óptimo con AB para las células estromales cultivadas en el interior del andamiaje tridimensional, se determinó comparando el % de reducción obtenido a cada tiempo de medición con el obtenido en TCPS a las 4 horas de incubación.

#### ETAPA 4:

Finalmente, se realizó el cultivo simultáneo de ambos tipos celulares utilizando como base el andamiaje tridimensional de fibrina. Se determinó la capacidad de mantenimiento de la morfología de cada tipo celular mediante técnicas histológicas a las 2 semanas de estudio. Y la caracterización a nivel de sistema del cocultivo se llevó a cabo mediante estudios de microscopía electrónica de barrido y la determinación de su composición bioquímica (Figura 47).

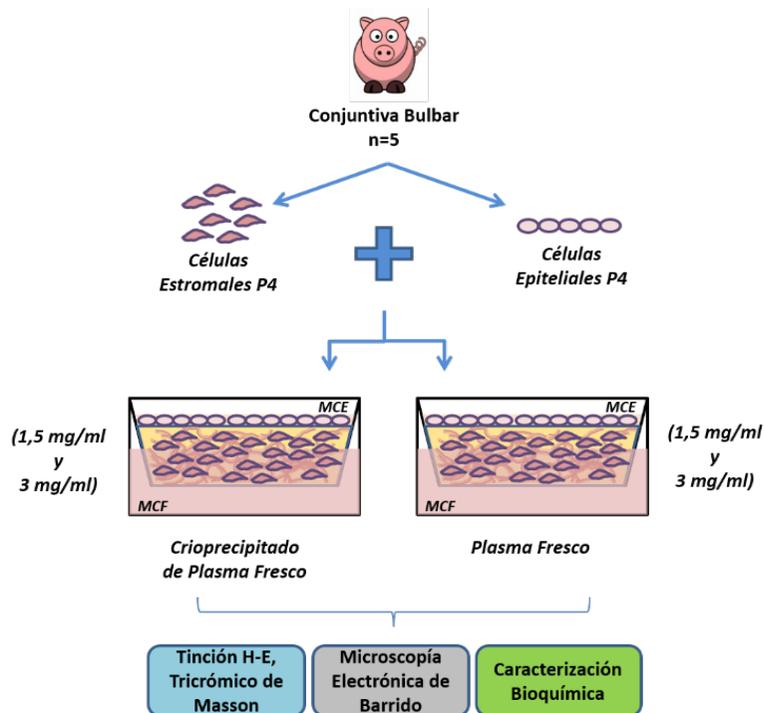


Figura 47. Cocultivo de las células estromales y las células epiteliales en los andamiajes tridimensionales. Análisis del mantenimiento de la morfología celular, determinación de la distribución celular y la composición bioquímica.

## VI- CAPÍTULO 2. MATERIAL Y MÉTODO

### 6.1. Obtención y procesamiento de muestras biológicas

Para el desarrollo de los andamiajes tridimensionales de la primera generación del hidrogel de fibrina, se obtuvieron previamente los componentes celulares y los componentes con base de fibrina como biomaterial.

#### 6.1.1. Obtención de los componentes celulares

Las células estromales y epiteliales que se utilizaron como componente celular en los andamiajes tridimensionales provenían del estudio desarrollado en el capítulo I. Se mantuvieron en cultivo hasta el correspondiente pase de estudio y, cuando alcanzaron el estado de confluencia, se tripsinizaron para conseguir la individualización celular. El recuento celular se realizó mediante la técnica azul tripán.

#### 6.1.2. Obtención del componente plasmático

Las muestras de plasma fresco congelado cuarentenado (PF) y de crioprecipitado de plasma fresco (CF) se obtuvieron del Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León (CHEMICYL) en virtud de un convenio de colaboración. Las extracciones se realizaron en bolsas de sangre de aproximadamente 450 ml de capacidad que contenían citrato sódico como solución anticoagulante. El plasma fresco es el componente sanguíneo obtenido de donante único a partir de una unidad de sangre total o mediante aféresis, después de la separación de los hematíes mediante centrifugación durante 10 minutos a 3.000 rpm. El protocolo de preparación de CF a partir de PF se detalla en el Anexo II – Protocolo IV.

En condiciones de asepsia se mezcló el contenido de todas las bolsas recepcionadas en un recipiente estéril generándose un *pool* de plasma fresco y un *pool* de crioprecipitado de plasma fresco. Las soluciones se alicuotaron en criotubos de 3 ml que se almacenaron a -80°C hasta su utilización como biomaterial en la elaboración de los andamiajes tridimensionales.

La determinación de la concentración final de fibrinógeno en el *pool* de PF y de CF se realizó utilizando un analizador automático de coagulación (STA COMPACT Max, Roche).

La base de este método es que, en presencia de un exceso de trombina, el tiempo de coagulación de la muestra diluida es inversamente proporcional a la concentración de fibrinógeno.

## ETAPA 1

### 6.2. Definición de la composición del andamiaje de fibrina estándar

#### 6.2.1. Formulación del hidrogel

Se probaron todas las combinaciones posibles, variando la concentración de fibrinógeno (1; 1,5 o 3 mg/ml) del biomaterial (CF o PF); de ácido tranexámico (4 mg/ml o 10% del volumen de biomaterial) y de cloruro cálcico (4 mg/ml o 10% del volumen de biomaterial), para determinar la formulación más idónea de andamiaje.

El proceso utilizado para la elaboración de los andamiajes se representa en la Figura 48. Sobre el biomaterial, se añadió el medio de cultivo específico y las células estromales en P2. El ácido tranexámico ( $C_8H_{15}NO_2$ ) se utilizó como inhibidor de la fibrinólisis y el cloruro cálcico ( $CaCl_2$ ) para favorecer la polimerización del andamiaje de fibrina.

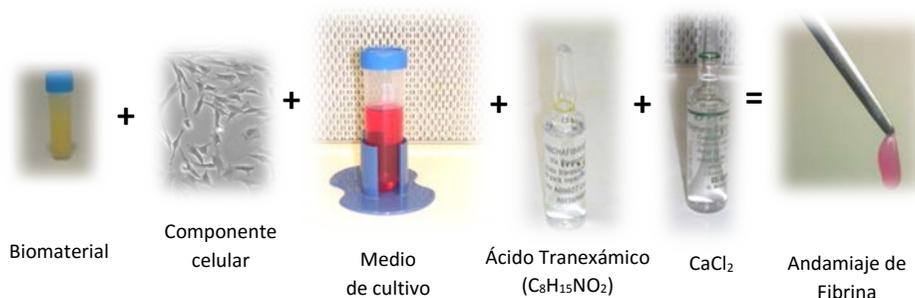


Figura 48. Proceso de elaboración de andamiajes de fibrina. El volumen de cada matriz fue 100  $\mu$ l y la densidad celular 10.000 células/ml.

Las diferentes combinaciones de andamiajes de crioprecipitado de plasma fresco se detallan en la Tabla 13. Las combinaciones de andamiajes de plasma fresco ensayadas se explican en la Tabla 14.

Se homogeneizó la formulación resultante por pipeteo y se depositaron 100 µl en cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos. Se mantuvieron a 37°C durante 2 horas, se comprobó su correcta polimerización y se añadieron 100 µl de MCF cubriendo toda la superficie del andamiaje.

Tabla 13. Andamiajes tridimensionales con base de CF. ( $V_c$ =Volumen de CF)

BIOMATERIAL	CONCENTRACIÓN DE FIBRINÓGENO	ÁCIDO TRANEXÁMICO	CaCl <sub>2</sub>	DENOMINACIÓN	CÓDIGO
Crioprecipitado o (21 tipos de andamiajes)	1 mg/ml	CON (10% $V_c$ )	CON (10% $V_c$ )	COMPLETO (10% $V_c$ )	CF1-I
		CON (10% $V_c$ )	SIN	SOLO AT (10% $V_c$ )	CF1-II
		SIN	CON (10% $V_c$ )	SOLO CaCl <sub>2</sub> (10% $V_c$ )	CF1-III
		SIN	SIN	NADA	CF1-IV
		CON (4 mg/ml)	CON (4 mg/ml)	COMPLETO (4 mg/ml)	CF1-V
		CON (4 mg/ml)	SIN	SOLO AT (4 mg/ml)	CF1-VI
		SIN	CON (4 mg/ml)	SOLO CaCl <sub>2</sub> (4 mg/ml)	CF1-VII
	1,5 mg/ml	CON (10% $V_c$ )	CON (10% $V_c$ )	COMPLETO (10% $V_c$ )	CF1,5-I
		CON (10% $V_c$ )	SIN	SOLO AT (10% $V_c$ )	CF1,5-II
		SIN	CON (10% $V_c$ )	SOLO CaCl <sub>2</sub> (10% $V_c$ )	CF1,5-III
		SIN	SIN	NADA	CF1,5-IV
		CON (4 mg/ml)	CON (4 mg/ml)	COMPLETO (4 mg/ml)	CF1,5-V
		CON (4 mg/ml)	SIN	SOLO AT (4 mg/ml)	CF1,5-VI
		SIN	CON (4 mg/ml)	SOLO CaCl <sub>2</sub> (4 mg/ml)	CF1,5-VII
	3 mg/ml	CON (10% $V_c$ )	CON (10% $V_c$ )	COMPLETO (10% $V_c$ )	CF3-I
		CON (10% $V_c$ )	SIN	SOLO AT (10% $V_c$ )	CF3-II
		SIN	CON (10% $V_c$ )	SOLO CaCl <sub>2</sub> (10% $V_c$ )	CF3-III
		SIN	SIN	NADA	CF3-IV
		CON (4 mg/ml)	CON (4 mg/ml)	COMPLETO (4 mg/ml)	CF3-V
		CON (4 mg/ml)	SIN	SOLO AT (4 mg/ml)	CF3-VI
		SIN	CON (4 mg/ml)	SOLO CaCl <sub>2</sub> (4 mg/ml)	CF3-VII

Tabla 14. Andamiajes tridimensionales con base de PF. ( $V_p$ =Volumen de PF)

\*En el caso de plasma fresco 1,5 mg/ml de fibrinógeno, la condición volumen de ácido tranéxico y de  $CaCl_2$  equivalente al 10% del volumen de biomaterial usado coincide con la condición ácido tranéxico (4 mg/ml) y  $CaCl_2$  (4 mg/ml).

BIOMATERIAL	CONCENTRACIÓN DE FIBRINÓGENO	ÁCIDO TRANEXÁMICO	$CaCl_2$	DENOMINACIÓN	CÓDIGO
Plasma fresco (18 tipos de andamiajes)	1 mg/ml	CON (10% $V_p$ )	CON (10% $V_p$ )	COMPLETO (10% $V_p$ )	PF1-I
		CON (10% $V_p$ )	SIN	SOLO AT (10% $V_p$ )	PF1-II
		SIN	CON (10% $V_p$ )	SOLO $CaCl_2$ (10% $V_p$ )	PF1-III
		SIN	SIN	NADA	PF1-IV
		CON (4 mg/ml)	CON (4 mg/ml)	COMPLETO (4 mg/ml)	PF1-V
		CON (4 mg/ml)	SIN	SOLO AT (4 mg/ml)	PF1-VI
		SIN	CON (4mg/ml)	SOLO $CaCl_2$ (4 mg/ml)	PF1-VII
	1,5 mg/ml*	CON (10% $V_p$ )	CON (10% $V_p$ )	COMPLETO (10% $V_p$ )	PF1,5-I
		CON (10% $V_p$ )	SIN	SOLO AT (10% $V_p$ )	PF1,5-II
		SIN	CON (10% $V_p$ )	SOLO $CaCl_2$ (10% $V_p$ )	PF1,5-III
		SIN	SIN	NADA	PF1,5-IV
	3 mg/ml	CON (10% $V_p$ )	CON (10% $V_p$ )	COMPLETO (10% $V_p$ )	PF3-I
		CON (10% $V_p$ )	SIN	SOLO AT (10% $V_p$ )	PF3-II
		SIN	CON (10% $V_p$ )	SOLO $CaCl_2$ (10% $V_p$ )	PF3-III
		SIN	SIN	NADA	PF3-IV
		CON (4 mg/ml)	CON (4 mg/ml)	COMPLETO (4 mg/ml)	PF3-V
		CON (4 mg/ml)	SIN	SOLO AT (4 mg/ml)	PF3-VI
		SIN	CON (4 mg/ml)	SOLO $CaCl_2$ (4 mg/ml)	PF3-VII

Para cada estudio (n=3) se elaboraron 4 réplicas de cada uno de los 39 tipos de andamiaje, lo que se correspondió con 252 andamiajes elaborados a base de CF y 216 andamiajes elaborados con PF, haciendo un total de 468 andamiajes objeto de estudio.

Los andamiajes se mantuvieron en condiciones de cultivo durante 2 semanas. De las 4 réplicas, una se utilizó para el análisis de la morfología celular mediante técnicas histológicas; dos réplicas se utilizaron para el estudio de proliferación celular mediante el método azul tripán y otra réplica se utilizó para el análisis de la distribución celular mediante microscopia electrónica de barrido.

### 6.2.2. Análisis de la morfología celular

Se observó la morfología celular mediante seguimiento diario con el microscopio invertido (Leica DMI).

Tras 2 semanas de cultivo, los 21 tipos de andamiaje de CF y los 18 tipos de andamiaje de PF, de cada estudio (n=3) se analizaron mediante técnicas histológicas. Los 117 andamiajes se extrajeron de los pocillos de plástico con ayuda de una pinza estéril. Las muestras se colocaron en cassettes de histología, previamente rotulados con la identificación correspondiente, y se fijaron en paraformaldehído al 4% durante un periodo mínimo de 72 horas previo al proceso de inclusión en parafina.

Se utilizó un procesador automático de tejidos (Shandon-Excelsior™, Thermo Scientific), en el que las muestras se deshidrataron a través de una serie de concentraciones crecientes de alcohol (alcohol de 70°, alcohol de 90°, alcohol de 96°, alcohol absoluto) y finalmente xileno, durante 1 hora cada uno a temperatura ambiente, hasta su inmersión final en parafina (3 ciclos de 1 hora a 61°C) (Figura 49-A).

A continuación, se recuperaron las muestras del procesador y se embebieron en parafina líquida (Figura 49-B), en moldes metálicos específicos, en el inclusor (Leica EG1150M, Leica Microsystems). Posteriormente, se enfriaron los bloques en una placa refrigerada (Microm CP60, Mikron Instruments, Inc.), y se realizaron secciones de 5 µm de grosor en un microtomo de rotación monitorizado (Leica RM2.255, Leica Microsystems) (Figura 49-C).

Los cortes obtenidos se introdujeron en un baño termostático de flotación (Termofin, Selecta) a 37°C, recuperándose en un portaobjetos previamente rotulado (Figura 49-D).

Las secciones obtenidas se tiñeron (Figura 49-E) con un protocolo estándar de hematoxilina-eosina (H-E) (Anexo II – Protocolo V), y posteriormente se visualizaron con un microscopio óptico directo de campo claro (BX61, Olympus). Las fotografías se

realizaron con una cámara anclada al microscopio (EC3, Leica) y se procesaron con un software específico (LAS V3.0, Leica).



Figura 49. Instalaciones del laboratorio de anatomía patológica. (A) Procesador automático de tejidos. (B) Inclusor de parafina. (C) Microtomo de rotación monitorizado. (D) Baño termostático de flotación. (E) Campana de extracción de gases en la que se realizaron las tinciones.

Los andamiajes se evaluaron a través de un ensayo ciego según el grado de celularidad (alto, medio o bajo) y según el estado de la matriz tridimensional (estructurada, medianamente estructurada o desestructurada), Tabla 15.

*Tabla 15. Valoración de la estructura obtenida según la formulación del andamiaje. Se puntuó de menor (+) a mayor (+++) en base al criterio descrito. La puntuación más elevada para el grado de celularidad se correspondió con la mayor visualización de células en el andamiaje. Para el estado de la matriz tridimensional se asignó la mayor puntuación a los andamiajes mejor estructurados y sin retracción.*

EVALUACIÓN DE LOS ANDAMIAJES TRIDIMENSIONALES			
	ALTO	MEDIO	BAJO
GRADO DE CELULARIDAD	Elevada presencia de núcleos (+++)	Presencia de núcleos intermedia (++)	Escasa presencia o ausencia de núcleos (+)
ESTADO DE LA MATRIZ	ESTRUCTURADA Matriz muy conservada (+++)	MEDIANAMENTE ESTRUCTURADA Matriz poco conservada (++)	DESESTRUCTURADA Matriz completamente deteriorada (+)

### 6.2.3. Análisis de la proliferación celular

Para determinar el patrón proliferativo de las células estromales en el interior de los andamiajes tridimensionales a las 2 semanas, un total de 234 andamiajes de cada caso experimental (n=3), se recuperaron del pocillo con ayuda de una pinza estéril. Se depositaron en su correspondiente microtubo de 0,5 ml de volumen, que contenía 300 µl de la solución colagenasa I a concentración 2 mg/ml. La digestión se prolongó durante 12 horas en condiciones de incubación estándar de cultivo. Se centrifugó la solución de digestión (Centrífuga 5417R, Eppendorf), durante 10 minutos a 1.400 rpm (353 g) y el pellet obtenido se resuspendió en un volumen conocido de MCF y se determinó el número de células por mililitro mediante la técnica azul tripán. Se realizó el recuento de 234 muestras.

### 6.2.4. Análisis de la distribución celular

Se utilizó la técnica de microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscope, SEM) para la visualización de la distribución celular en el interior del andamiaje en función de la composición.

Tras 2 semanas de cultivo, los 21 tipos de andamiaje de CF y los 18 tipos de andamiaje de PF, de cada estudio (n=3) se analizaron mediante SEM. Los 117 andamiajes se

recuperaron del pocillo con ayuda de una pinza estéril y se sumergieron en PBS para un primer lavado. Después del lavado, las muestras extraídas se fijaron químicamente en una solución de glutaraldehído al 2,5% durante 48 horas, en oscuridad y a 4°C. La visualización de las muestras, en el microscopio electrónico de barrido (JEOL 6.100), requirió una preparación previa de deshidratación, desecación y recubrimiento (Anexo II – Protocolo VI). Para la toma de fotografías se utilizó el programa JSM 5.000 (Figura 50).

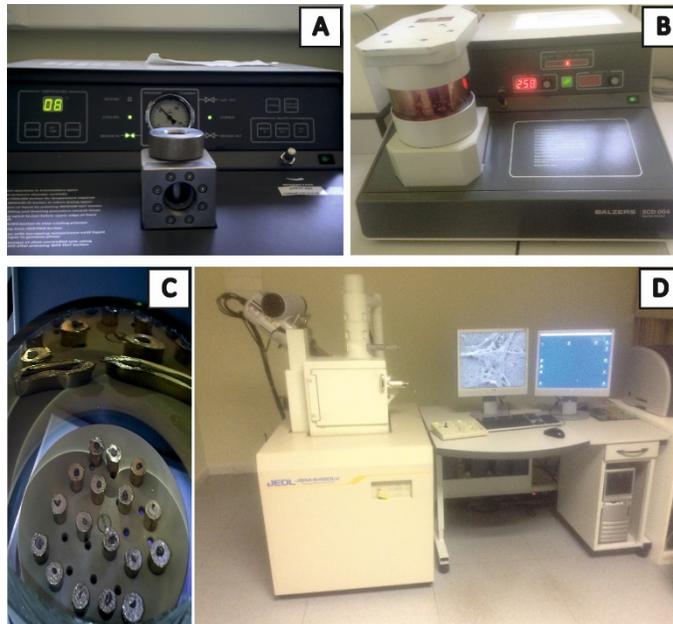


Figura 50. Microscopía electrónica de barrido. (A) Desecación de las muestras. (B) Recubrimiento de oro de las muestras. (C) Aspecto de las muestras recubiertas, listas para visualizar al microscopio. (D) Microscopio de barrido.

### 6.2.5. Selección del andamiaje idóneo

De los resultados anteriores: proliferación celular, análisis histológico y SEM, se determinó cual era la composición del andamiaje ideal por poseer una matriz mejor conservada y un mayor número de células distribuidas homogéneamente. Las formulaciones seleccionadas para los estudios posteriores fueron:

1. CF1,5-V: Andamiaje de fibrina con base de crioprecipitado de 1,5 mg/ml.
2. CF3-V: Andamiaje de fibrina con base de crioprecipitado de 3 mg/ml.
3. PF1,5-I: Andamiaje de fibrina con base de plasma de 1,5 mg/ml.
4. PF3-V: Andamiaje de fibrina con base de plasma de 3 mg/ml.

Se cultivaron en su interior células estromales y en su superficie células epiteliales realizando estudios de proliferación celular, de morfología celular, de caracterización fenotípica y de distribución celular.

## **ETAPA 2**

---

### **6.3. Células de la conjuntiva en la primera generación del hidrogel de fibrina**

#### **6.3.1. Andamiaje de fibrina que contiene células estromales**

Los andamiajes se elaboraron según la formulación establecida en el apartado anterior y siguiendo el mismo protocolo para la polimerización. Se cultivaron en placas de cultivo de 24 pocillos, el volumen final fue 1 ml, y la densidad celular de siembra 10.000 células estromales P4/ml. Se analizó el comportamiento de las células estromales en P4 en el interior de los andamiajes.

Para cada estudio (n=3) se elaboraron 9 réplicas de cada uno de los 4 tipos de andamiaje, lo que se correspondió con 54 andamiajes elaborados a base de CF y 54 andamiajes elaborados con PF, haciendo un total de 108 andamiajes objeto de estudio.

Los andamiajes se mantuvieron en condiciones de cultivo durante 2 semanas. De las 9 réplicas, una se utilizó para el análisis de la morfología celular mediante técnicas histológicas y para el análisis fenotípico mediante técnicas inmunohistoquímicas; siete réplicas se utilizaron para el estudio de proliferación celular y una réplica se utilizó para el análisis de la distribución celular mediante microscopia electrónica de barrido. La composición específica de cada andamiaje se detalla en la Tabla 16 y el resumen de los estudios realizados en la Tabla 17.

Tabla 16. Composición de los andamiajes de fibrina que contienen células estromales. Volumen específico de cada componente en función del tipo de andamiaje.

	Biomaterial	MF	Densidad celular	Ácido Tranexámico	CaCl <sub>2</sub>
<b>Andamiaje de fibrina con base de PF de 1,5 mg/ml de fibrinógeno</b>	400 µl	520 µl	10.000 cél/ml	40 µl	40 µl
<b>Andamiaje de fibrina con base de PF de 3 mg/ml de fibrinógeno</b>	800 µl	120 µl	10.000 cél/ml	40 µl	40 µl
<b>Andamiaje de fibrina con base de CF de 1,5 mg/ml de fibrinógeno</b>	330 µl	590 µl	10.000 cél/ml	40 µl	40 µl
<b>Andamiaje de fibrina con base de CF de 3 mg/ml de fibrinógeno</b>	660 µl	260 µl	10.000 cél/ml	40 µl	40 µl

Tabla 17. Resumen de los estudios realizados en los andamiajes que contienen células estromales.

	DÍA 0	DÍA 2	DÍA 4	DÍA 6	DÍA 8	DÍA 10	DÍA 12	DÍA 14
<b>CF1,5-V</b>	Elaboración de los andamiajes	Proliferación Celular	Morfología Celular Caracterización Fenotípica Proliferación Celular Distribución Celular					
<b>CF3-V</b>	Elaboración de los andamiajes	Proliferación Celular	Morfología Celular Caracterización Fenotípica Proliferación Celular Distribución Celular					
<b>PF1,5-I</b>	Elaboración de los andamiajes	Proliferación Celular	Morfología Celular Caracterización Fenotípica Proliferación Celular Distribución Celular					
<b>PF3-V</b>	Elaboración de los andamiajes	Proliferación Celular	Morfología Celular Caracterización Fenotípica Proliferación Celular Distribución Celular					

### 6.3.1.1. Caracterización del andamiaje de fibrina que contiene células estromales

Se observó la morfología celular mediante seguimiento diario con el microscopio invertido (Leica DMI).

Tras 2 semanas de cultivo, un andamiaje de cada uno de los 4 tipos (n=3), en total 12 muestras fueron recuperadas y colocadas en cassettes de histología, previamente rotulados. El análisis histológico se realizó como se ha descrito previamente en el apartado 6.2.2. Además de la tinción H-E, se realizó la tinción inmunohistoquímica para la detección de vimentina, descrita en el Anexo II – Protocolo VII, con objeto de comprobar el mantenimiento del fenotipo estromal de las células en el interior de los andamiajes.

La determinación del patrón proliferativo de las células estromales en el interior de los andamiajes tridimensionales se realizó digiriendo una réplica de cada uno de los 4 tipos de andamiaje (n=3) cada 2 días durante 14 días. Se recuperaron 84 muestras que se depositaron en su correspondiente tubo de polipropileno de 15 ml de volumen, que contenía 1 ml de la solución colagenasa I a concentración 2 mg/ml. Se determinó el número de células por mililitro mediante la técnica azul tripán.

Se utilizó la técnica SEM para la visualización de la distribución de las células estromales en el interior de los andamiajes como se ha descrito en el apartado 6.2.5. Se analizaron 12 muestras.

### 6.3.2. Andamiaje de fibrina que contiene células epiteliales

Los andamiajes se elaboraron según la formulación establecida previamente pero sin contener células en su interior, debido a que las células epiteliales crecen en la superficie. Se probaron 4 tipos de andamiajes diferentes según su composición. El volumen final de cada andamiaje fue 1ml, y se cultivaron en placas de cultivo de 24 pocillos. Cuando los andamiajes polimerizaron, se sembraron en su superficie células epiteliales en P4. La densidad celular de siembra fue 25.000 células/ml. Se elaboraron 9 réplicas de cada tipo para poder realizar los estudios de caracterización (n=3). La composición específica de cada andamiaje se detalla en la Tabla 18.

Tabla 18. Composición de los andamiajes de fibrina que contienen células epiteliales. Volumen específico de cada componente en función del tipo de andamiaje.

	Biomaterial	MCE	Densidad celular	Ácido Tranexámico	CaCl <sub>2</sub>
<b>Andamiaje de fibrina con base de PF de 1,5 mg/ml de fibrinógeno</b>	400 µl	520 µl	25.000 cél/ml	40 µl	40 µl
<b>Andamiaje de fibrina con base de PF de 3 mg/ml de fibrinógeno</b>	800 µl	120 µl	25.000 cél/ml	40 µl	40 µl
<b>Andamiaje de fibrina con base de CF de 1,5 mg/ml de fibrinógeno</b>	330 µl	590 µl	25.000 cél/ml	40 µl	40 µl
<b>Andamiaje de fibrina con base de CF de 3 mg/ml de fibrinógeno</b>	660 µl	260 µl	25.000 cél/ml	40 µl	40 µl

#### 6.3.2.1. Caracterización del andamiaje de fibrina que contiene células epiteliales

Mediante seguimiento diario con el microscopio invertido (Leica DMI) se observó la morfología celular.

Tras 2 semanas de cultivo, los 12 andamiajes se recuperaron y se colocaron en cassettes de histología, previamente rotulados. El análisis histológico se realizó como se ha descrito previamente. Además de la tinción H-E, se realizó la tinción inmunohistoquímica pancitoqueratina, descrita en el Anexo II – Protocolo VIII, para comprobar el mantenimiento del fenotipo epitelial en la superficie de los andamiajes.

La determinación del patrón proliferativo de las células epiteliales en la superficie de los andamiajes tridimensionales se realizó digiriendo una réplica de cada uno de los 4 tipos de andamiaje por estudio cada 2 días durante 14 días. Se recuperaron 84 muestras que se depositaron en su correspondiente tubo de propileno de 15 ml de volumen, que contenía 1 ml de la solución colagenasa I a concentración 2 mg/ml. Se determinó el número de células por mililitro mediante la técnica azul tripán.

Se utilizó la técnica SEM descrita anteriormente para la visualización de la distribución de las células epiteliales en la superficie de los andamiajes. Se analizaron 12 muestras.

---

## ETAPA 3

---

### 6.4. Análisis de la proliferación celular en andamiajes tridimensionales de fibrina mediante el método Alamar Blue (AB)

El patrón de proliferación celular es el principal parámetro a analizar cuando se ensaya un nuevo biomaterial. Mediante el método Alamar Blue (AB) se determinó cuantitativamente la actividad metabólica de las células.

El AB es un indicador de viabilidad celular basado en el poder reductor que caracteriza a las células viables al ser metabólicamente activas.

El método AB está descrito para células en suspensión y células adheridas en superficies plásticas (TCPS, tissue-culture polystyrene), siendo el tiempo de incubación recomendado 4 horas. Sin embargo, al emplear un biomaterial tridimensional es necesario determinar el tiempo de incubación óptimo con el reactivo puesto que el colorante tarda en penetrar en la estructura.

Para determinar el tiempo óptimo de incubación con AB para células estromales en P5 cultivadas en el interior de los 4 tipos de andamiajes tridimensionales, se realizó un estudio comparativo (n=3) con células estromales en P5 cultivadas en TCPS para las mismas densidades celulares de siembra:  $1 \times 10^4$ ,  $2,5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $7,5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $2,5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $7,5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1,5 \times 10^6$  células/ml.

A día 0 se sembraron las células en TCPS y se elaboraron los andamiajes tridimensionales conteniendo en su interior las densidades celulares anteriormente descritas. A día 1, se retiró el medio de cultivo de las de las células estromales en TCPS y se reemplazó por MCF que contenía 10% de AB (v/v). Sobre los andamiajes tridimensionales, un total de 168 muestras, se añadió MCF fresco suplementado con 10% de AB (v/v).

Se incubaron en condiciones de cultivo estándar durante 4 horas, pasado este tiempo se recuperaron 100  $\mu$ l de cada solución, y se depositaron en una placa de cultivo de 96 pocillos específica para medición fluorimétrica. La fluorescencia se midió en fluorímetro (Synergy HT, Bio-TEK), con una sensibilidad de 45 fmol, una longitud de onda de excitación de 560 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm. El análisis de los datos se realizó con el programa KC4 v3.3. Para los andamiajes tridimensionales el tiempo de incubación con el AB se prolongó hasta las 30 horas, realizando mediciones cada 2 horas. Cada vez que se recogió una alícuota de cada solución de incubación, se añadió una cantidad idéntica para evitar la concentración de la señal.

Se recogieron los datos de fluorescencia y se calculó el porcentaje de AB reducido aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Reducción AB} = [(F_{\text{Estudio}} - F_{\text{Blanco}}) / (F_{100\%} - F_{\text{Blanco}})] \times 100$$

$F_{\text{Estudio}}$  = Fluorescencia 590 nm del medio de cultivo de las células de estudio (Monocapa o Andamiaje tridimensional)

$F_{\text{Blanco}}$  = Fluorescencia 590 nm del medio de cultivo sin células (TCPS o Andamiaje tridimensional)

$F_{100\%}$  = Fluorescencia 590 nm del AB 100% Reducido (Autoclavado durante 15 minutos)

#### ETAPA 4

### 6.5. Cocultivo en la primera generación de hidrogel de fibrina

Se cultivaron simultáneamente los dos componentes celulares de la conjuntiva en los 4 tipos de andamiajes tridimensionales mediante la técnica de cultivo en *insert*.

A día 0, se construyó el andamiaje con base de fibrina tal y como se ha indicado previamente, siendo la densidad de células estromales P5 en el interior de cada tipo de andamiaje de 10.000 células/ml. La formulación de volumen de 1 ml se depositó en un *insert* específico para placa de cultivo de 24 pocillos. Los andamiajes se dejaron estabilizar en condiciones de cultivo estándar durante toda la noche. Al día siguiente, se sembraron sobre la superficie del andamiaje células epiteliales P5 a una densidad de 25.000 células/ml utilizando MCE. Y se añadió también el MCF para alimentar a las células estromales del interior de la matriz (Figura 51). Se realizaron 5 estudios y el número de réplicas para cada uno de los 4 tipos de andamiaje fue 5 para poder realizar la caracterización a nivel de sistema: una réplica para los estudios de histología, otra réplica para el estudio de SEM y tres réplicas para la cuantificación proteica. Además, se elaboraron 3 réplicas de cada uno de los 4 tipos de andamiajes por estudio (n=5) que no contenían células en su composición, para actuar como control en la caracterización bioquímica.

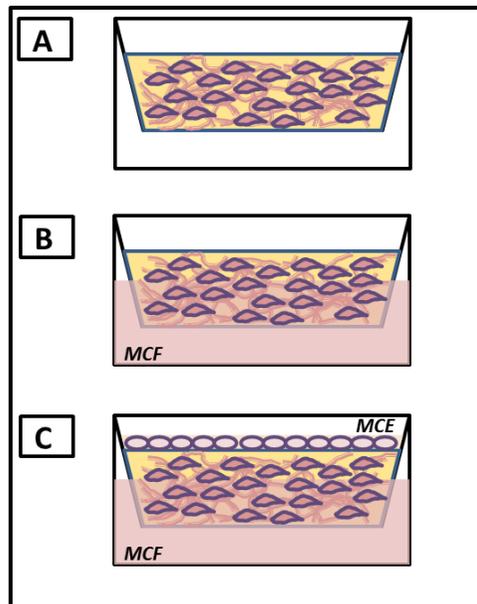


Figura 51. Cocultivo de los componentes celulares de la conjuntiva. (A) A día 0, las células estromales P5 se cultivaron en el interior del andamiaje de fibrina que se depositó en el inserto. (B) Al día siguiente se añadió MCF para alimentar a las células estromales. (C) Se sembraron las células epiteliales P5 sobre el andamiaje de fibrina utilizando MCE.

Los andamiajes se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar durante dos semanas. El medio de cultivo específico para cada tipo celular se reemplazó cada dos días.

#### 6.5.1. Estudios de histología

Tras 2 semanas de cultivo, los 20 andamiajes se recuperaron y se colocaron en cassettes de histología, previamente rotulados. El análisis histológico se realizó como se ha descrito previamente. Además de la tinción H-E, se realizó la tinción Tricrómico de Masson, descrita en el Anexo II-Protocolo IX, para la visualización de las fibras de colágeno.

### 6.5.2. Análisis de la distribución celular

Se utilizó la técnica SEM para la visualización de la codistribución de las células estromales y las células epiteliales en los 4 tipos de andamiaje de fibrina. Se analizaron 20 muestras.

### 6.5.3. Caracterización bioquímica

Se utilizaron 60 andamiajes de fibrina en los cuales se habían cultivado simultáneamente células estromales y células epiteliales. Además, se realizó la caracterización bioquímica de 60 andamiajes de fibrina control, los cuales no tenían células en su composición.

En primer lugar, se determinó el peso seco de los andamiajes. Se colocaron sobre fragmentos de papel de aluminio de 4 x 4 cm previamente rotulados y pesados en una báscula de precisión (ABZ100C, PCE). A continuación, las muestras se incubaron (1.500E, Shel Lab) durante una hora a 60°C para desecarse. Después, se pesaron y se consideró el peso de la muestra como la diferencia entre el pesaje final y peso previo del fragmento de papel de aluminio.

Se utilizaron kits colorimétricos comerciales específicos para cada componente extracelular: colágeno, elastina y glucosaminoglicanos (GAG). Para la detección de colágeno se utilizó el kit Sircol (Anexo II – Protocolo X), para la detección de la elastina se utilizó el kit Fastin (Anexo II – Protocolo XI) y para la detección de GAG se utilizó el kit Blyscan (Anexo II – Protocolo XII).

Se midió la colorimetría obtenida por absorbancia, en el lector de placas (Multiskan EX, Labsystems), con los filtros recomendados por el fabricante. Se restó el blanco a la medida de absorbancia.

## 6.6. Análisis estadístico

Se realizó el mismo análisis estadístico de los datos que en el capítulo I (apartado 5.3.5.) Se aplicó un modelo lineal generalizado y se comprobó la distribución normal de los residuos.

## **VI- CAPÍTULO 2. RESULTADOS**

### **6.7. Obtención y procesamiento de muestras biológicas**

#### **6.7.1. Obtención del componente plasmático**

El volumen final de Plasma Fresco (PF) alicuotado fue 2100 ml. Se alicuotaron 700 criotubos estériles de 3 ml, almacenados posteriormente a -80°C. El contenido de uno de los criotubos se utilizó para la determinación de la concentración de fibrinógeno. La concentración final de fibrinógeno en el PF fue 3,8 mg/ml.

La unificación de las bolsas de Crioprecipitado de Plasma Fresco se correspondió con 2010 ml de volumen final. Se alicuotaron 670 tubos estériles de 3 ml, almacenados a -80°C. La determinación de la concentración final de fibrinógeno en el CF fue 4,5 mg/ml.

### **ETAPA I**

---

### **6.8. Definición de la composición del hidrogel estándar**

Para la determinación de la composición del andamiaje más idóneo se analizaron 39 formulaciones diferentes. A continuación, se describen los resultados obtenidos por cada tipo de técnica aplicada.

#### **6.8.1. Análisis de la morfología celular**

Mediante la técnica de tinción H-E, por la acción del colorante básico hematoxilina, se determinó la presencia de componente celular teñido de morado intenso; y la matriz extracelular teñida de rosa al contrastar con el colorante ácido eosina. Se analizaron 63 andamiajes de CF y 54 andamiajes de PF.

En la Figura 52 (A-G) se muestran los resultados obtenidos para los andamiajes de composición CF de concentración de fibrinógeno 1 mg/ml con la tinción H-E. Se observó una elevada presencia de componente celular y la matriz ampliamente estructurada.

Los resultados obtenidos para los andamiajes de composición CF de concentración de fibrinógeno 1,5 mg/ml con la tinción H-E se representan en la Figura 53 (A-G), Se observó una elevada presencia de componente celular y la matriz ampliamente estructurada.

En la Figura 54 (A-G) se representan los resultados obtenidos para los andamiajes de composición CF de concentración de fibrinógeno 3 mg/ml con la tinción H-E. Se muestra una menor presencia de componente celular y la matriz menos estructurada.

En la Figura 55 (A-G) se muestran los resultados obtenidos para los andamiajes de composición PF de concentración de fibrinógeno 1 mg/ml con la tinción H-E. Se observó una elevada presencia de componente celular y la matriz ampliamente estructurada.

Los resultados obtenidos para los andamiajes de composición PF de concentración de fibrinógeno 1,5 mg/ml con la tinción H-E, se representan en la Figura 56 (A-G). Destaca una elevada presencia de componente celular y la matriz ampliamente estructurada.

En la Figura 57 (A-G) se representan los resultados obtenidos para los andamiajes de composición PF de concentración de fibrinógeno 3 mg/ml con la tinción H-E. Se observó una menor presencia de componente celular y la matriz moderadamente estructurada.

### 6.8.2. Análisis de la distribución celular

Mediante la técnica microscopía electrónica de barrido, se determinó la presencia de componente celular distribuido en la matriz extracelular de cada tipo de andamiaje. Se analizaron 63 andamiajes de CF y 54 andamiajes de PF.

En la Figura 52 (H-N) se muestran los resultados obtenidos para los andamiajes de composición CF de concentración de fibrinógeno 1 mg/ml mediante SEM. Se observó una elevada presencia de componente celular en una matriz ampliamente estructurada.

Los resultados obtenidos para los andamiajes de concentración de fibrinógeno 1,5 mg/ml de composición CF mediante SEM se muestran en la Figura 53 (H-N). Destaca una elevada presencia de componente celular distribuido en una matriz ampliamente estructurada.

En la Figura 54 (H-N) se representan los resultados obtenidos para los andamiajes de composición CF de concentración de fibrinógeno 3 mg/ml mediante SEM. Se observó una menor presencia de componente celular y la matriz moderadamente estructurada.

Los resultados obtenidos para los andamiajes de composición PF de concentración de fibrinógeno 1 mg/ml mediante SEM se muestran en la Figura 55 (H-N). Se observó una elevada presencia de componente celular distribuido en una matriz ampliamente estructurada.

En la Figura 56 (H-N) se representan los resultados obtenidos para los andamiajes de composición PF de concentración de fibrinógeno 1,5 mg/ml mediante SEM. Se muestra una elevada presencia de componente celular en una matriz ampliamente estructurada.

Los resultados obtenidos para los andamiajes de composición PF de concentración de fibrinógeno 3 mg/ml mediante SEM se muestran en la Figura 57 (H-N). Se observó una menor presencia de componente celular en una matriz parcialmente estructurada.

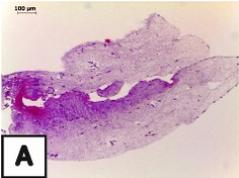
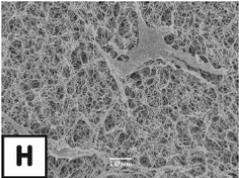
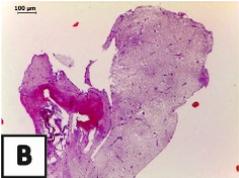
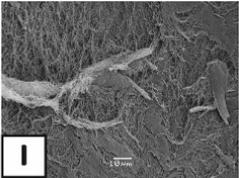
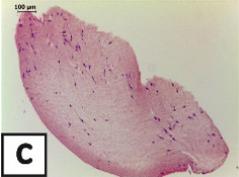
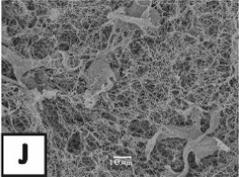
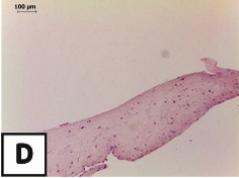
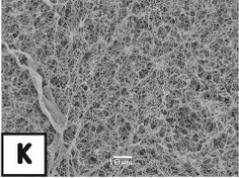
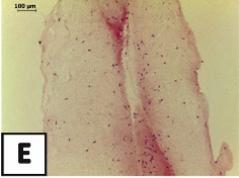
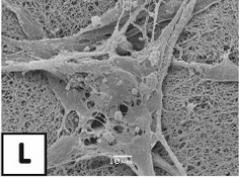
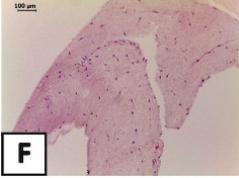
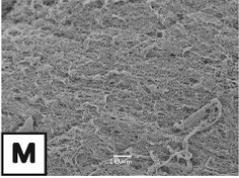
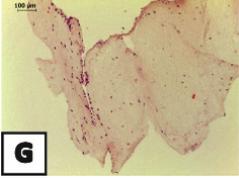
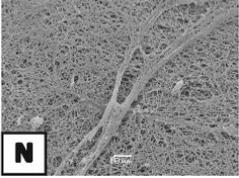
	Tinción H-E	SEM	Grado de Celularidad	Estado de la matriz
CF1-I			++	++
CF1-II			++	++
CF1-III			++	++
CF1-IV			++	+++
CF1-V			+++	+++
CF1-VI			++	++
CF1-VII			++	++

Figura 52. Análisis del grado de celularidad y el estado de la matriz de composición crioprecipitado 1 mg/ml. (A-G) Tinción H-E. (H-N) Microscopía electrónica de barrido.

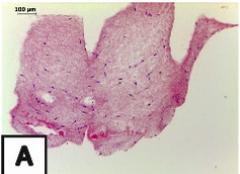
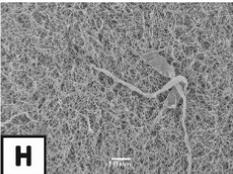
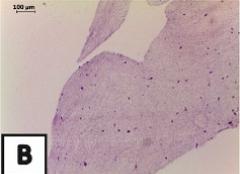
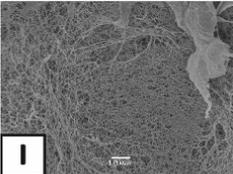
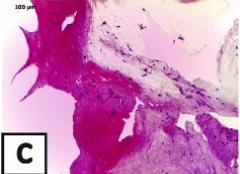
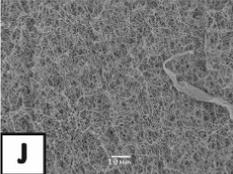
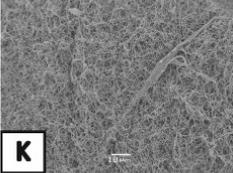
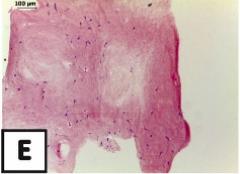
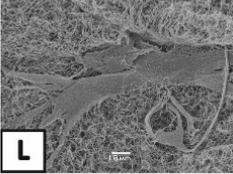
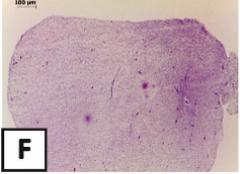
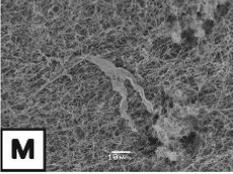
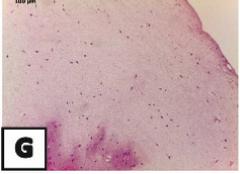
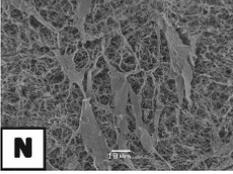
	Tinción H-E	SEM	Grado de Celularidad	Estado de la matriz
CF1,5-I			++	+
CF1,5-II			++	+
CF1,5-III			++	+
CF1,5-IV			++	+
CF1,5-V			+++	+++
CF1,5-VI			++	++
CF1,5-VII			++	++

Figura 53. Análisis del grado de celularidad y el estado de la matriz de composición crioprecipitado 1,5 mg/ml. (A-G) Tinción H-E. (H-N) Microscopía electrónica de barrido.

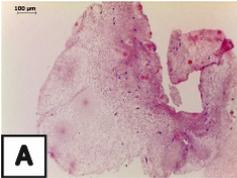
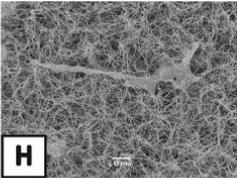
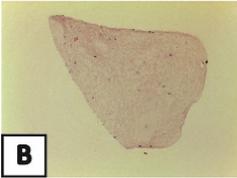
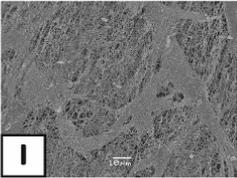
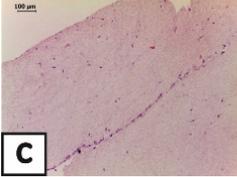
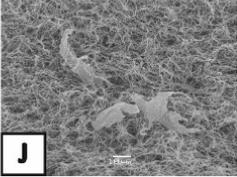
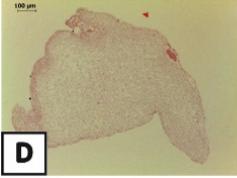
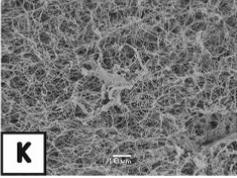
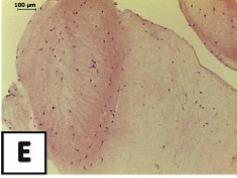
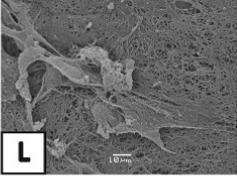
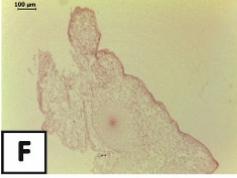
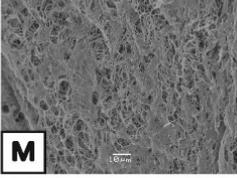
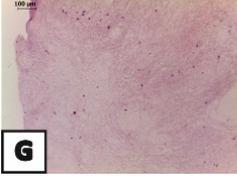
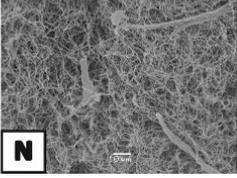
	Tinción H-E	SEM	Grado de Celularidad	Estado de la matriz
CF3-I			++	++
CF3-II			+	++
CF3-III			+	+
CF3-IV			+	+
CF3-V			+++	+++
CF3-VI			+	++
CF3-VII			+	++

Figura 54. Análisis del grado de celularidad y el estado de la matriz de composición crioprecipitado 3 mg/ml. (A-G) Tinción H-E. (H-N) Microscopía electrónica de barrido.

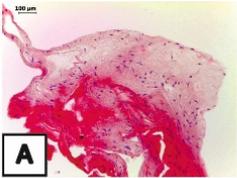
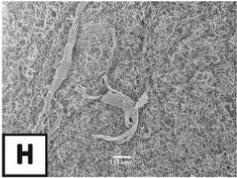
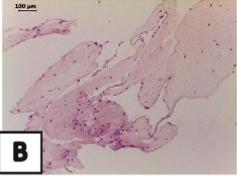
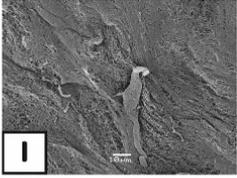
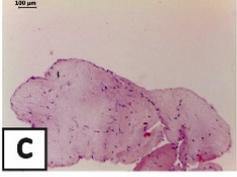
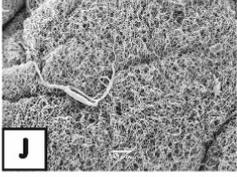
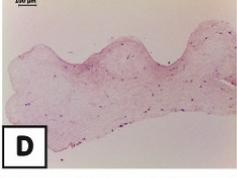
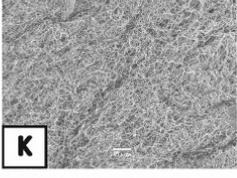
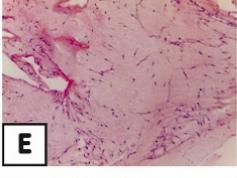
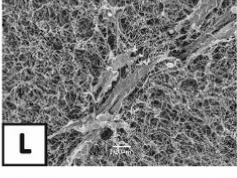
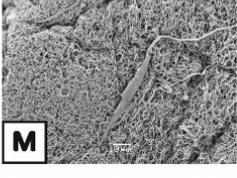
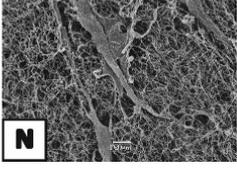
	Tinción H-E	SEM	Grado de Celularidad	Estado de la matriz
PF1-I			++	++
PF1-II			+	+
PF1-III			+	+
PF1-IV			+	+
PF1-V			+++	++
PF1-VI			+	++
PF1-VII			++	+

Figura 55. Análisis del grado de celularidad y el estado de la matriz de composición plasma fresco 1 mg/ml. (A-G) Tinción H-E. (H-N) Microscopía electrónica de barrido.

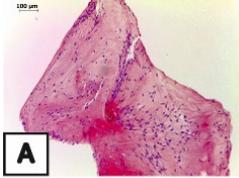
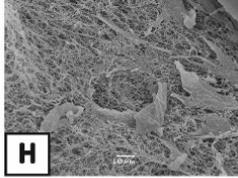
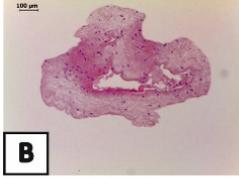
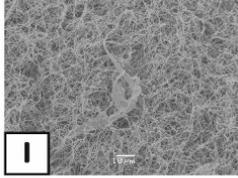
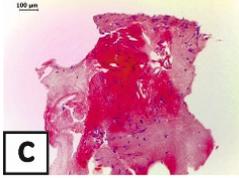
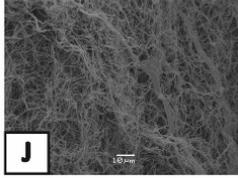
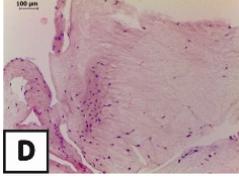
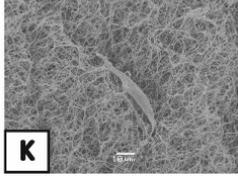
	Tinción H-E	SEM	Grado de Celularidad	Estado de la matriz
PF1,5-I			+++	+++
PF1,5-II			+	++
PF1,5-III			++	++
PF1,5-IV			+	+

Figura 56. Análisis del grado de celularidad y el estado de la matriz de composición plasma fresco 1,5 mg/ml. (A-G) Tinción H-E. (H-N) Microscopía electrónica de barrido.

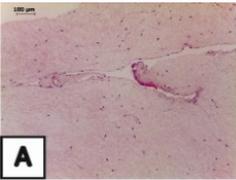
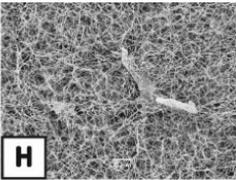
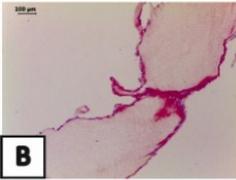
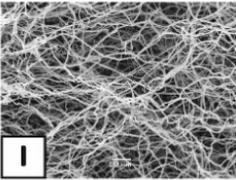
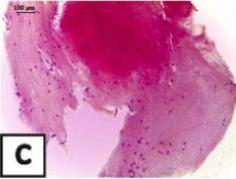
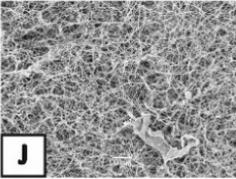
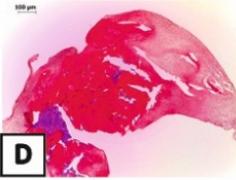
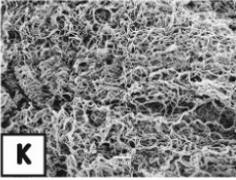
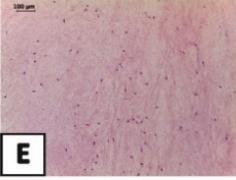
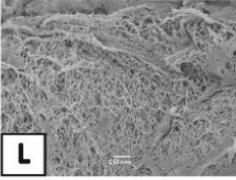
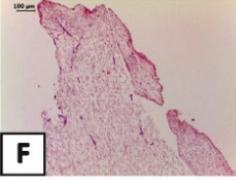
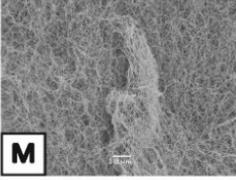
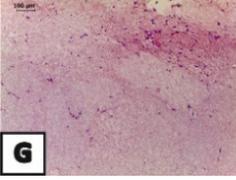
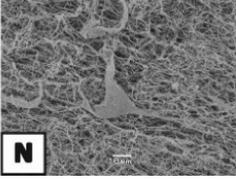
	Tinción H-E	SEM	Grado de Celularidad	Estado de la matriz
PF3-I			++	++
PF3-II			+	+
PF3-III			+	+
PF3-IV			+	+
PF3-V			+++	+++
PF3-VI			+	++
PF3-VII			+	++

Figura 57. Análisis del grado de celularidad y el estado de la matriz de composición plasma fresco 3 mg/ml. (A-G) Tinción H-E. (H-N) Microscopía electrónica de barrido.

### 6.8.3. Análisis de la proliferación celular

La determinación del número de células estromales/ml en función de la composición del andamiaje se realizó mediante digestión enzimática con una solución de colagenasa 2 mg/ml durante 24 horas. Se analizaron un total de 234 muestras: 126 pertenecientes a andamiajes de crioprecipitado de plasma fresco y 108 de andamiajes que contenían plasma fresco como biomaterial.

A continuación, se representan los resultados obtenidos en función de la concentración del fibrinógeno del biomaterial. En la Figura 58, se observa como en los andamiajes de crioprecipitado de plasma fresco de 1 mg/ml de fibrinógeno, el número de células estromales/ml es significativamente mayor ( $p < 0,001$ ) cuando el andamiaje se compone de 4 mg/ml de ácido tranexámico y de  $\text{CaCl}_2$ .

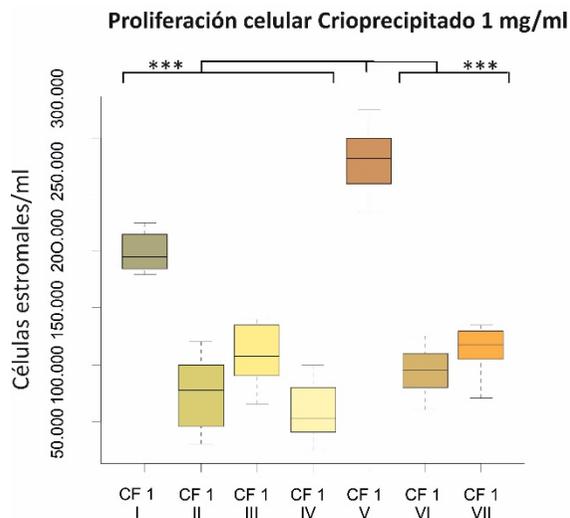


Figura 58. Proliferación celular de los andamiajes de crioprecipitado de 1mg/ml de fibrinógeno.

En la Figura 59 se representa el número de células estromales/ml en los andamiajes de crioprecipitado de plasma fresco de 1,5 mg/ml de fibrinógeno. Se determinó que el número de células estromales/ml es significativamente mayor ( $p < 0,001$ ) cuando el andamiaje se compone de 4 mg/ml de ácido tranexámico y de  $\text{CaCl}_2$ .

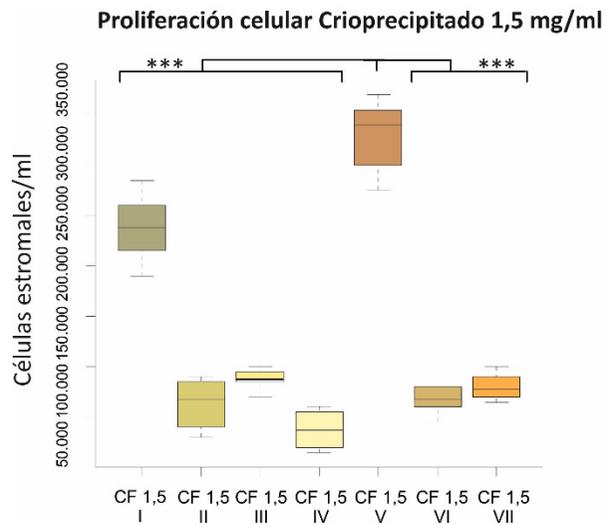


Figura 59. Proliferación celular de los andamiajes de crioprecipitado de 1,5 mg/ml de fibrinógeno.

En los andamiajes de crioprecipitado de plasma fresco de 3 mg/ml de fibrinógeno (Figura 60), el número de células estromales/ml también es significativamente mayor ( $p < 0,001$ ) cuando el andamiaje se compone de 4 mg/ml de ácido tranexámico y de  $\text{CaCl}_2$ .

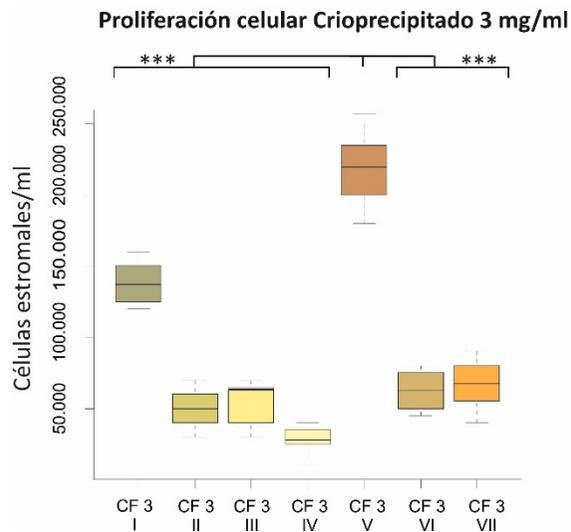


Figura 60. Proliferación celular de los andamiajes de crioprecipitado de 3 mg/ml de fibrinógeno.

En la Figura 61 se representa el número de células estromales/ml en los andamiajes de plasma fresco de 1 mg/ml de fibrinógeno. Se determinó que el número de células estromales/ml es significativamente mayor ( $p < 0,001$ ) cuando el andamiaje está compuesto de 4 mg/ml de ácido tranexámico y de  $\text{CaCl}_2$ .

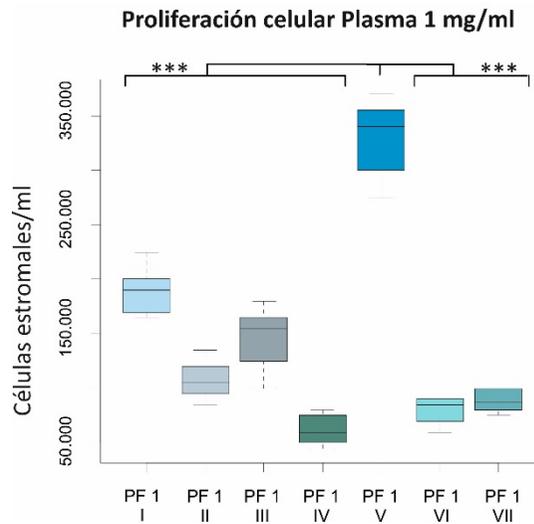


Figura 61. Proliferación celular de los andamiajes de plasma fresco de 1 mg/ml de fibrinógeno.

En los andamiajes de plasma fresco de 1,5 mg/ml de fibrinógeno (Figura 62), el número de células estromales/ml también es significativamente mayor ( $p < 0,001$ ) cuando el andamiaje se compone de 4 mg/ml de ácido tranexámico y de  $\text{CaCl}_2$ .

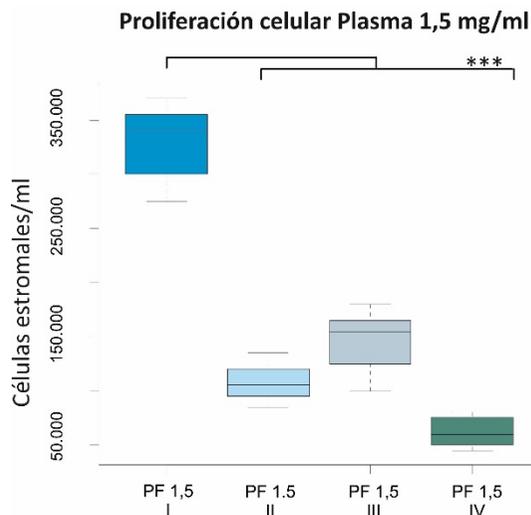


Figura 62. Proliferación celular de los andamiajes de plasma fresco de 1,5 mg/ml de fibrinógeno.

En Figura 63, se observa como en los andamiajes de plasma fresco de 3 mg/ml de fibrinógeno, el número de células estromales/ml es significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) cuando el andamiaje se compone de 4 mg/ml de ácido tranexámico y de  $\text{CaCl}_2$ .

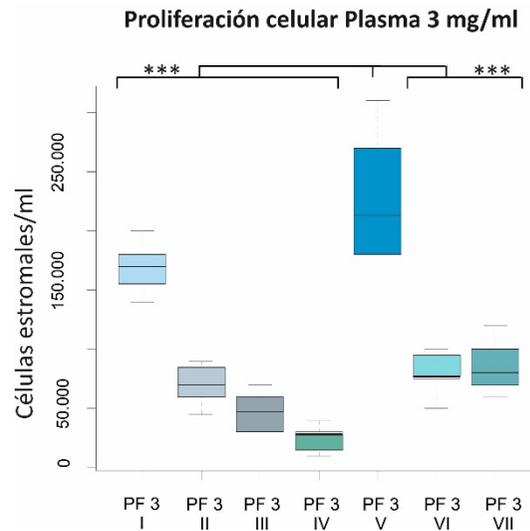


Figura 63. Proliferación celular de los andamiajes de plasma fresco de 3 mg/ml de fibrinógeno.

Del análisis de los resultados anteriores se determinó la composición idónea de los andamiajes de fibrina. Estableciéndose el andamiaje de composición completa (4 mg/ml ácido tranexámico y 4 mg/ml  $\text{CaCl}_2$ ) como objeto de estudio, utilizando como biomateriales plasma fresco y crioprecipitado de plasma fresco, a una concentración baja de fibrinógeno de 1,5 mg/ml y a una concentración alta de fibrinógeno, 3 mg/ml.

Teniendo en cuenta la composición establecida, se cultivaron, por separado, los dos componentes celulares de la conjuntiva en los andamiajes de fibrina de primera generación: células estromales y células epiteliales.

## ETAPA II

### 6.9. Células estromales de la conjuntiva en la primera generación de andamiaje de fibrina

#### 6.9.1. Estudio de proliferación celular

El análisis de la proliferación celular de las células estromales en el interior de los andamiajes de fibrina de primera generación se representa en la Figura 64. El recuento de células estromales mediante digestión enzimática puso de manifiesto una mayor capacidad proliferativa cuanto menor era la concentración de fibrinógeno en el andamiaje, observándose diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los andamiajes de plasma fresco de composición 1,5 mg/ml y 3 mg/ml. También se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los andamiajes de plasma fresco y de crioprecipitado de plasma fresco para una misma concentración de fibrinógeno. En los andamiajes de crioprecipitado de plasma fresco de composición 3 mg/ml se detectó la menor capacidad proliferativa de las células estromales ( $p \leq 0,01$ ). Se analizaron un total de 84 andamiajes.

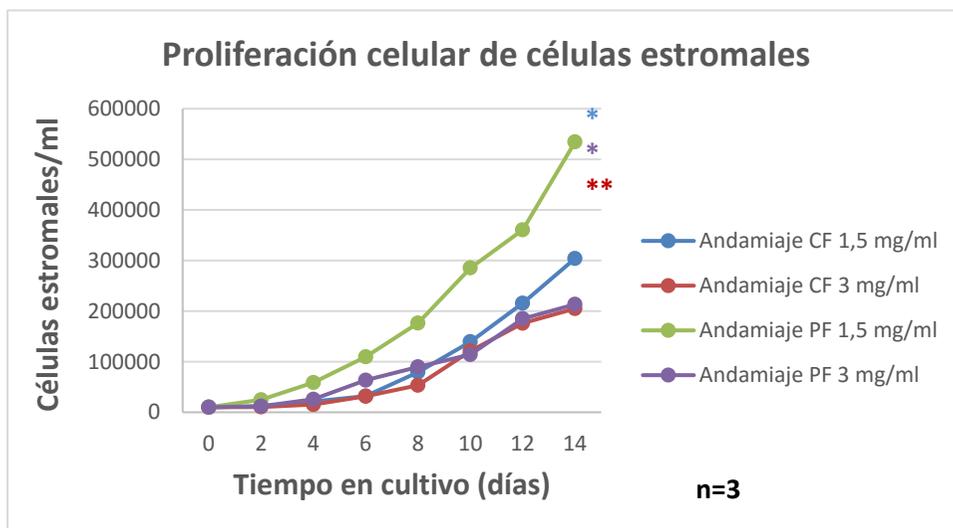


Figura 64. Proliferación celular de las células estromales en el interior de los andamiajes de fibrina de primera generación. Andamiaje de fibrina con base de CF de 1,5 mg/ml de fibrinógeno ( $n=3$ ). Andamiaje de fibrina con base de CF de 3 mg/ml de fibrinógeno ( $n=3$ ). Andamiaje de fibrina con base de PF de 1,5 mg/ml de fibrinógeno ( $n=3$ ). Andamiaje de fibrina con base de PF de 3 mg/ml de fibrinógeno ( $n=3$ ). \*\* $p \leq 0,01$ ; \* $p \leq 0,05$ .

### 6.9.2. Análisis de la morfología celular

El análisis histológico de los andamiajes de fibrina de primera generación mediante tinción H-E a las dos semanas de cultivo, permitió comprobar que las células estromales eran capaces de mantener su morfología fusiforme en el interior de los andamiajes independientemente del tipo de biomaterial y de la concentración de fibrinógeno (Figura 65). Se analizaron un total de 12 muestras.

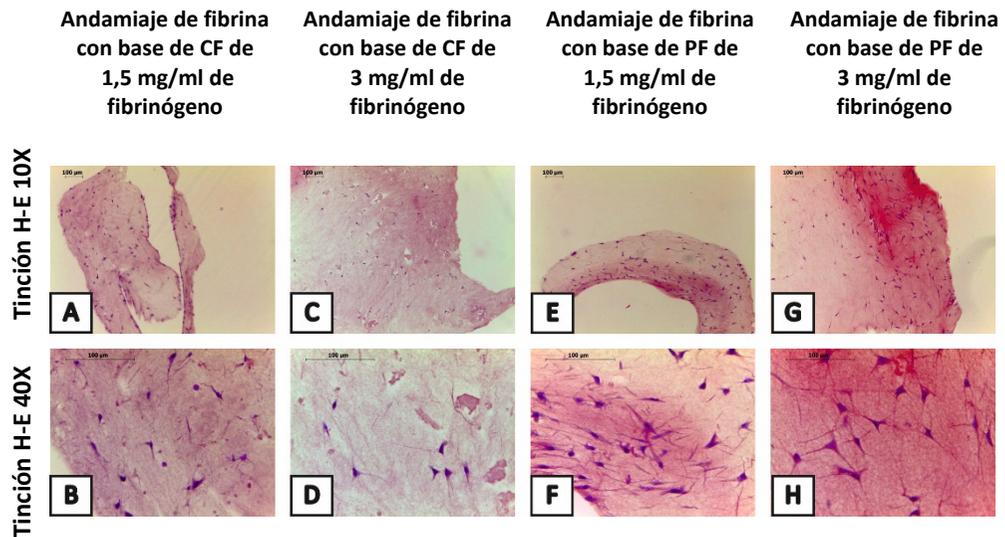


Figura 65. Análisis de la morfología celular mediante tinción H-E en andamiajes de fibrina de primera generación que contienen células estromales. (A,B) Crioprecipitado de plasma fresco 1,5 mg/ml. (C,D) Crioprecipitado de plasma fresco 3 mg/ml. (E,F) Plasma fresco 1,5 mg/ml. (G,H) Plasma fresco 3 mg/ml. (A,C,E,G) 10X. (B,D,F,H) 40X.

### 6.9.3. Análisis de la distribución celular

La técnica microscopía electrónica de barrido permitió observar la integración de las células estromales en el interior de los andamiajes de fibrina de primera generación así como su morfología. El andamiaje se distingue como una estructura tridimensional fibrilar (Figura 66), en el que las células estromales son capaces de integrarse. Se analizaron 12 muestras.

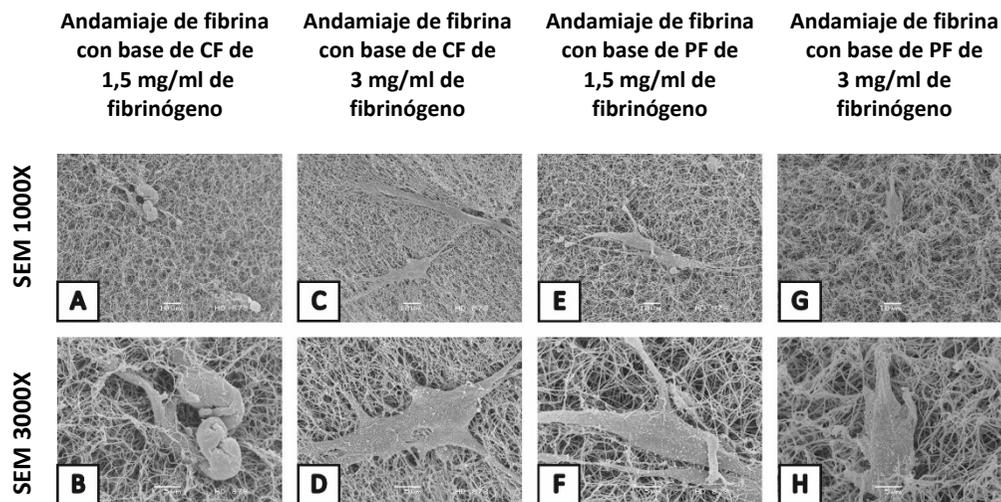


Figura 66. Análisis de la distribución celular mediante microscopía electrónica de barrido en andamiajes de primera generación que contienen células estromales. (A) Crioprecipitado de plasma fresco 1,5 mg/ml. (B) Crioprecipitado de plasma fresco 3 mg/ml. (C) Plasma fresco 1,5 mg/ml. (D) Plasma fresco 3 mg/ml. (A,C,E,G) 1000X. (B,D,F,H) 3000X.

#### 6.9.4. Inmunohistoquímica

El análisis inmunohistoquímico mediante el marcador vimentina permitió detectar la presencia de células estromales en el interior de los andamiajes de fibrina de primera generación (Figura 67). Se confirmó la presencia de este marcador específico de células estromales, tanto que en los andamiajes de fibrina con base de crioprecipitado de plasma fresco como en los andamiajes de fibrina con base de plasma fresco. Se analizaron un total de 12 muestras.

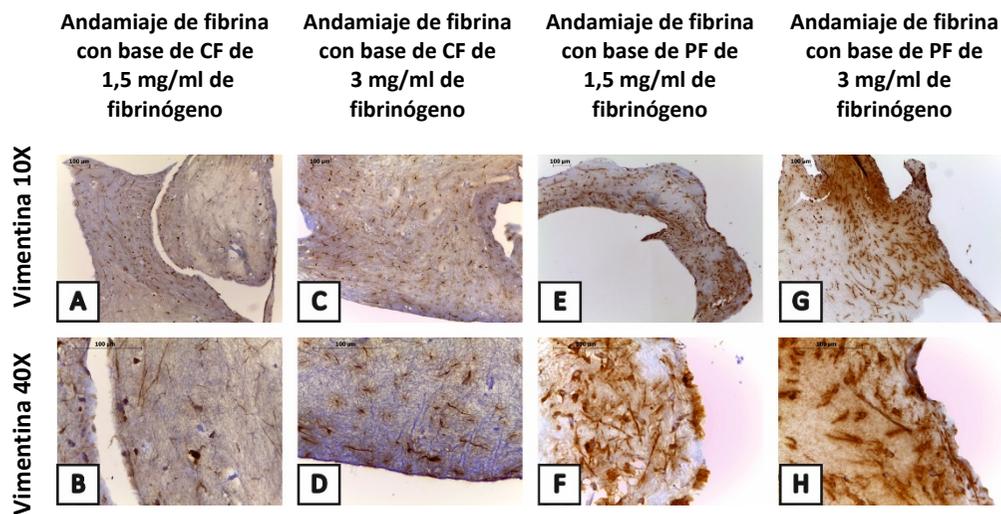


Figura 67. Análisis fenotípico mediante tinción inmunohistoquímica de vimentina de andamiajes de fibrina de primera generación que contienen células estromales. (A,B) Crioprecipitado de plasma fresco 1,5 mg/ml. (C,D) Crioprecipitado de plasma fresco 3 mg/ml. (E,F) Plasma fresco 1,5 mg/ml. (G,H) Plasma fresco 3 mg/ml. (A,C,E,G) 10X. (B,D,F,H) 40X.

## 6.10. Células epiteliales de la conjuntiva en la primera generación de hidrogel de fibrina

### 6.10.1. Estudio de proliferación celular

El análisis de la proliferación celular de las células epiteliales en la superficie de los andamiajes de fibrina de primera generación se representa en la Figura 68. El recuento de células epiteliales mediante digestión enzimática determinó que no hubo diferencias significativas entre los andamiajes de plasma fresco y de crioprecipitado de plasma fresco independientemente de cual fuese la concentración de fibrinógeno. Se analizaron un total de 84 andamiajes.

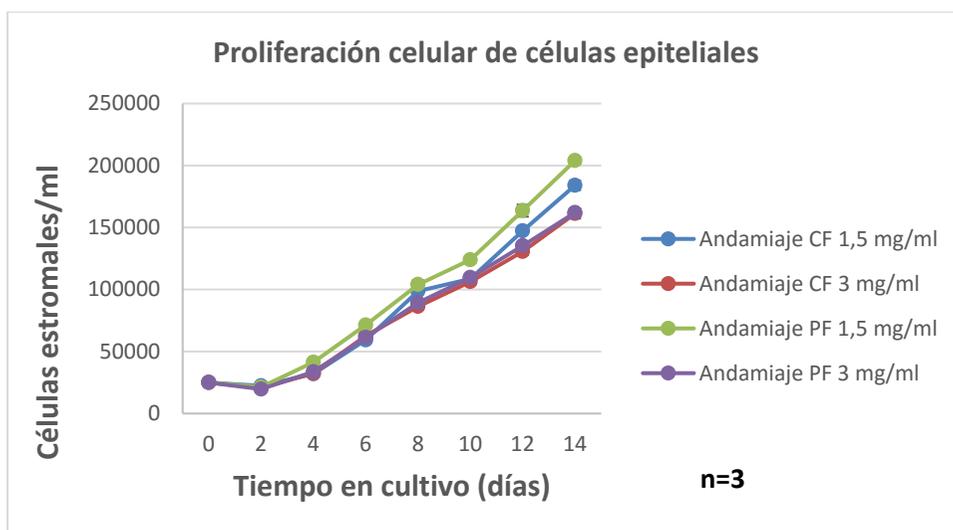


Figura 68. Proliferación celular de las células epiteliales en la superficie de los andamiajes de fibrina de primera generación. Andamiaje de fibrina con base de CF de 1,5 mg/ml de fibrinógeno (n=3). Andamiaje de fibrina con base de CF de 3 mg/ml de fibrinógeno (n=3). Andamiaje de fibrina con base de PF de 1,5 mg/ml de fibrinógeno (n=3). Andamiaje de fibrina con base de PF de 3 mg/ml de fibrinógeno (n=3).

### 6.10.2. Análisis de la morfología celular

El análisis histológico de los andamiajes de fibrina de primera generación mediante tinción H-E a las dos semanas de cultivo, determinó que las células epiteliales eran capaces de establecer un epitelio estratificado sobre la superficie de los andamiajes independientemente del tipo de biomaterial y de la concentración de fibrinógeno (Figura 69). Se analizaron un total de 12 muestras.

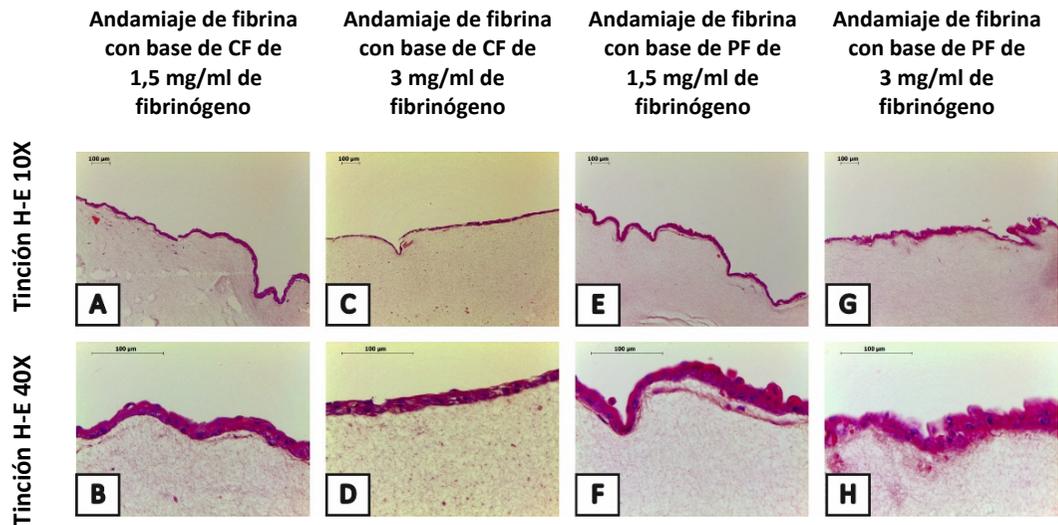


Figura 69. Análisis de la morfología celular mediante tinción H-E de células epiteliales sobre andamiajes de fibrina de primera generación. (A,B) Crioprecipitado de plasma fresco 1,5 mg/ml. (C,D) Crioprecipitado de plasma fresco 3 mg/ml. (E,F) Plasma fresco 1,5 mg/ml. (G,H) Plasma fresco 3 mg/ml. (A,C,E,G) 10X. (B,D,F,H) 40X.

### 6.10.3. Análisis de la distribución celular

Mediante la técnica microscopía electrónica de barrido se observó el establecimiento de las células epiteliales sobre la superficie de los andamiajes de fibrina de primera generación (Figura 70). El andamiaje se distingue como una estructura tridimensional fibrilar, que actúa como soporte sobre el que se establecen las células epiteliales distinguiéndose su característica morfología poligonal. Se analizaron un total 12 muestras.

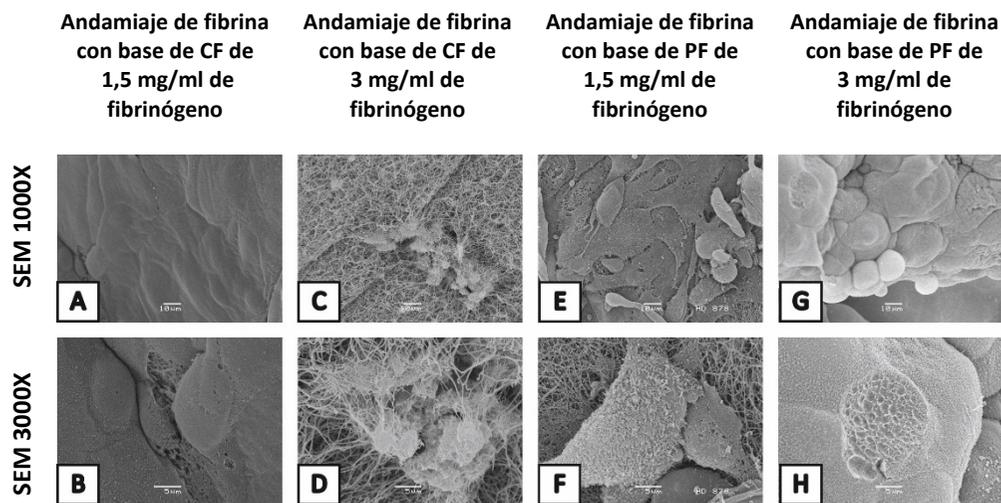


Figura 70. Análisis de la distribución celular mediante microscopía electrónica de barrido de células epiteliales sobre andamiajes de fibrina de primera generación. (A) Crioprecipitado de plasma fresco 1,5 mg/ml. (B) Crioprecipitado de plasma fresco 3 mg/ml. (C) Plasma fresco 1,5 mg/ml. (D) Plasma fresco 3 mg/ml. (A,C,E,G) 1000X. (B,D,F,H) 3000X.

#### 6.10.4. Inmunohistoquímica

El análisis inmunohistoquímico mediante el marcador pancitoqueratina permitió detectar la presencia de células epiteliales en la superficie de los andamiajes de fibrina de primera generación (Figura 71). Tanto que en los andamiajes de fibrina con base de crioprecipitado de plasma fresco como en los andamiajes de fibrina con base de plasma fresco se confirmó la presencia de este marcador específico de células epiteliales. Se analizaron un total de 12 muestras.

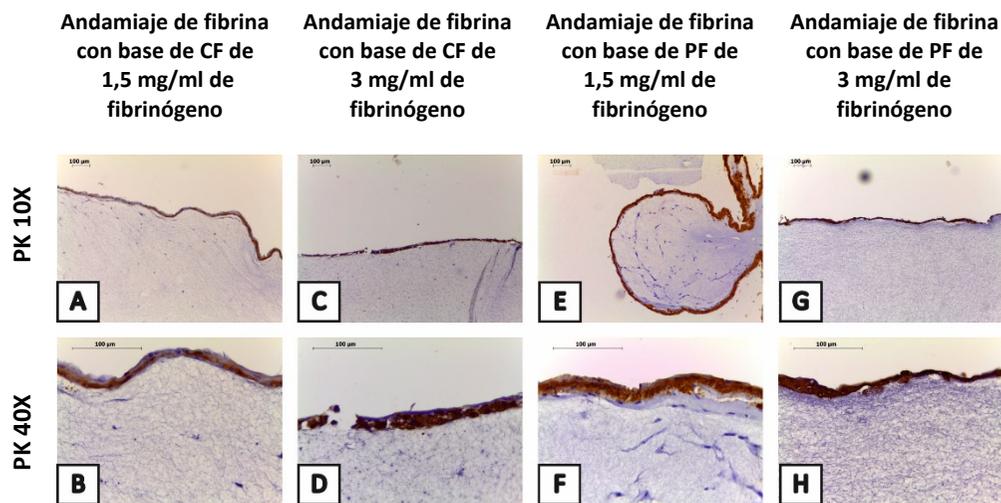


Figura 71. Análisis fenotípico mediante tinción inmunohistoquímica de pancitoqueratina de células epiteliales sobre andamiajes de fibrina de primera generación. (A,B) Crioprecipitado de plasma fresco 1,5 mg/ml. (C,D) Crioprecipitado de plasma fresco 3 mg/ml. (E,F) Plasma fresco 1,5 mg/ml. (G,H) Plasma fresco 3 mg/ml. (A,C,E,G) 10X. (B,D,F,H) 40X.

Después del análisis de los resultados obtenidos, se mantienen como biomateriales el plasma fresco y el crioprecipitado de plasma fresco a una baja y una alta concentración de fibrinógeno. Se utilizan varias opciones al tratarse de un estudio a nivel experimental que persigue la translación a clínica humana, para poder testar de este modo materiales de diferencias consistencias para elegir el mejor en función de su aplicación en quirófano.

### ETAPA III

#### 6.11. Análisis de la proliferación celular en andamiajes tridimensionales de fibrina mediante el método Alamar Blue (AB)

La señal de fluorescencia obtenida a partir de las células estromales sembradas en los andamiajes tridimensionales alcanzó la recta estándar a diferentes periodos de incubación con Alamar Blue. El periodo de incubación para los andamiajes de fibrina con base de crioprecipitado de 1,5 mg/ml de fibrinógeno (Figura 72) y para los andamiajes de fibrina con base de plasma de 1,5 mg/ml de fibrinógeno (Figura 74) fue de 26 horas, mientras que para los andamiajes de fibrina con base de crioprecipitado de 3 mg/ml de fibrinógeno (Figura 73) y para los andamiajes de fibrina con base de plasma de 3 mg/ml de fibrinógeno (Figura 75) se requirió de 30 horas de incubación. La recta estándar de cada tipo de andamio a base de fibrina se comparó con la recta estándar obtenida a partir de las células estromales conjuntivales cultivadas en monocapa. Cada imagen muestra el aspecto presentado por el medio de cultivo de cada densidad celular, el medio de cultivo contiene Alamar Blue reducido debido a la actividad metabólica del componente celular.

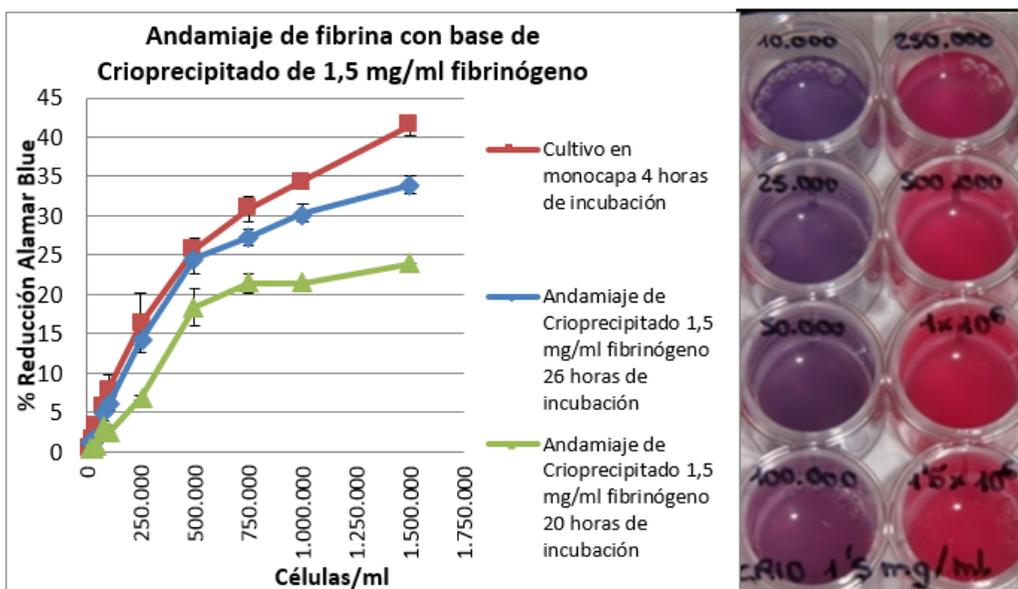


Figura 72. Porcentaje de reducción del Alamar Blue en el andamiaje de fibrina con base de crioprecipitado de 1,5 mg/ml de fibrinógeno.

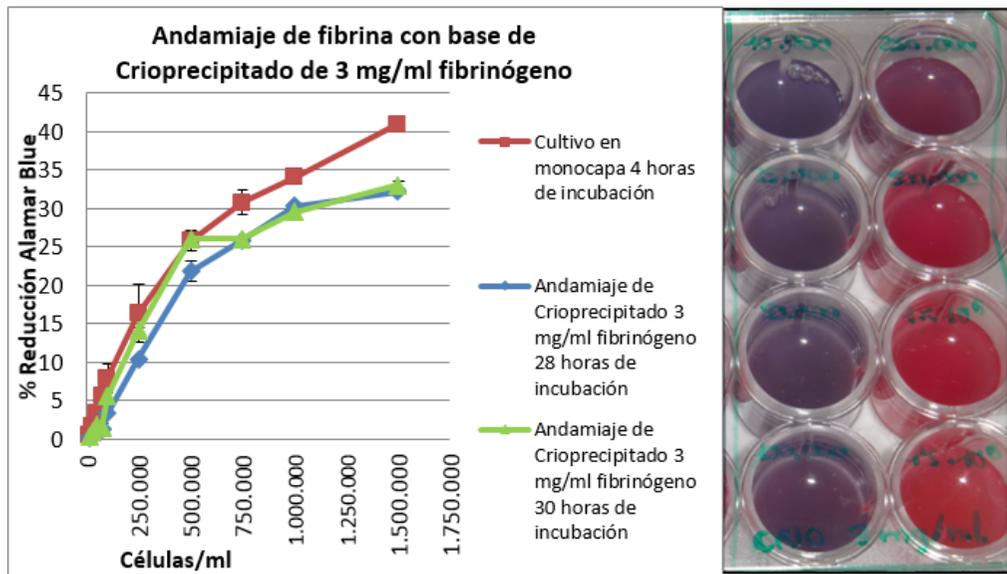


Figura 73. Porcentaje de reducción del Alamar Blue en el andamiaje de fibrina con base de crioprecipitado de 3 mg/ml de fibrinógeno.

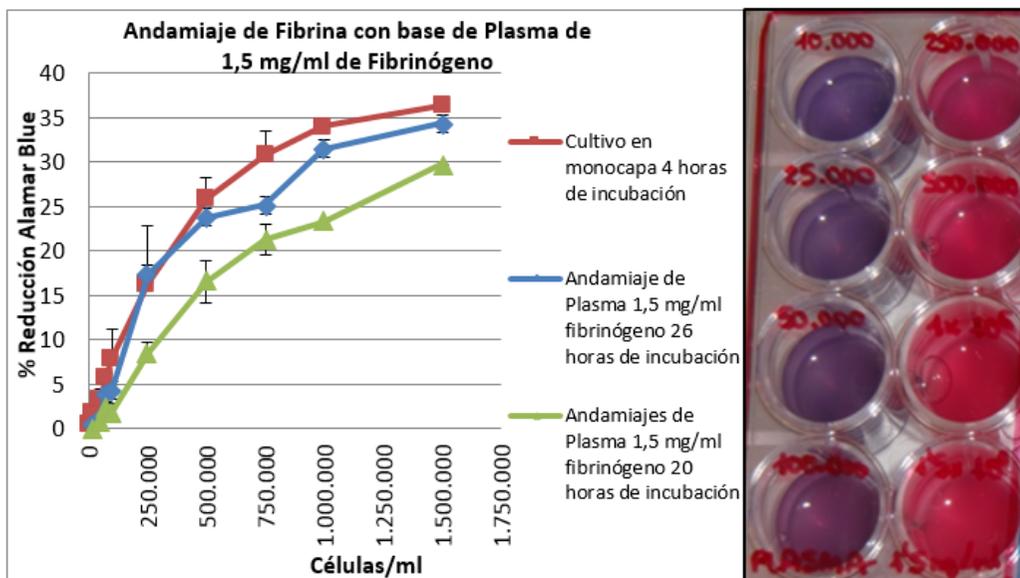


Figura 74. Porcentaje de reducción del Alamar Blue en el andamiaje de fibrina con base de plasma fresco de 1,5 mg/ml de fibrinógeno.

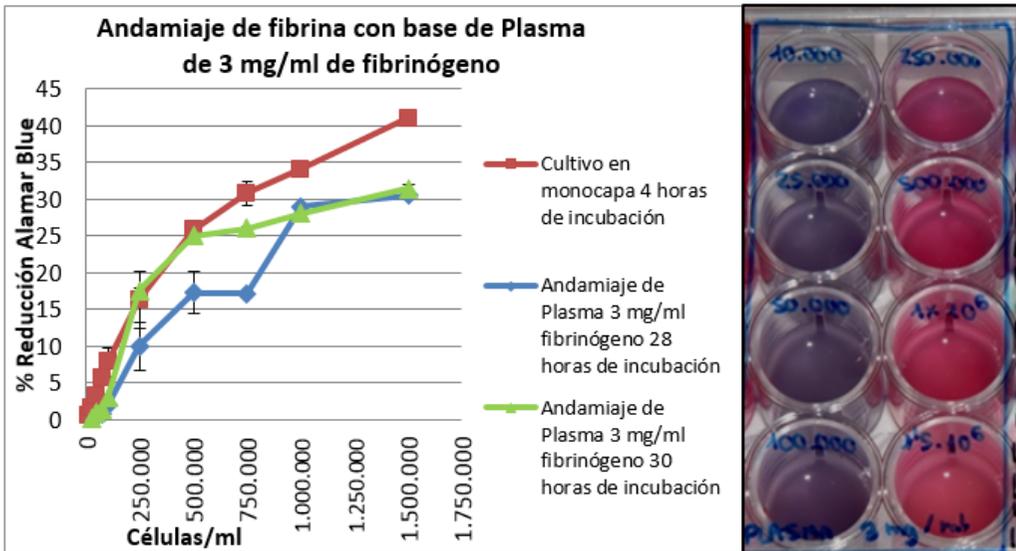


Figura 75. Porcentaje de reducción del Alamar Blue en el andamiaje de fibrina con base de plasma fresco de 3 mg/ml de fibrinógeno.

## ETAPA IV

### 6.12. Cocultivo en la primera generación de hidrogel de fibrina

#### 6.12.1. Estudios de histología

En el estudio cocultivo, el análisis histológico de los andamiajes de fibrina de primera generación mediante tinción H-E a las dos semanas de cultivo, determinó que las células epiteliales eran capaces de establecer un epitelio estratificado sobre la superficie de los andamiajes y las células estromales de distribuirse en el interior del andamio. Las células epiteliales se caracterizaron por poseer una morfología poligonal en la superficie del andamio y las células estromales una morfología fusiforme en el interior del andamio independientemente del tipo de biomaterial y de la concentración de fibrinógeno (Figura 76). Se analizaron un total de 12 muestras.

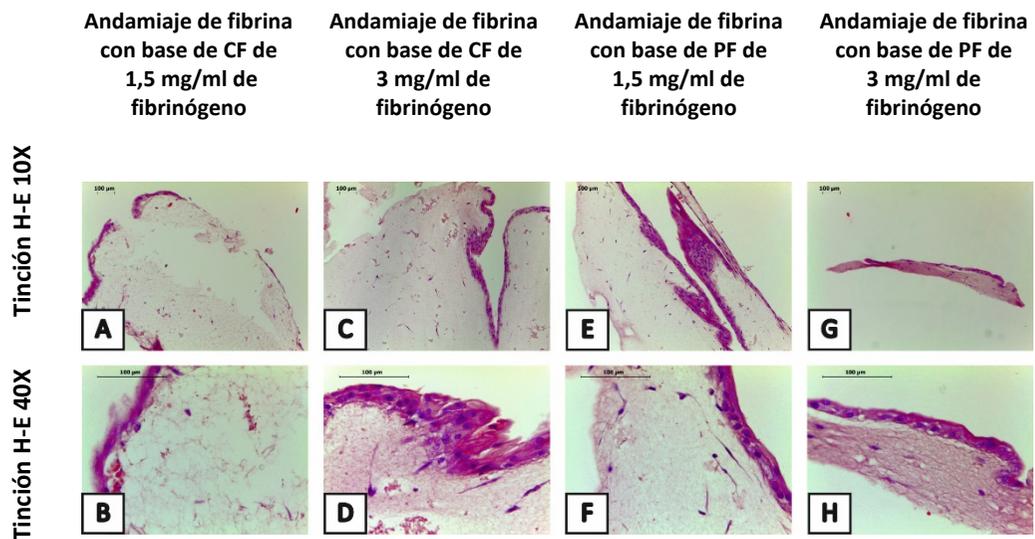


Figura 76. Análisis de la morfología celular mediante tinción H-E de los andamiajes de primera generación que contienen células estromales en el interior y células epiteliales en la superficie. (A,B) Crioprecipitado de plasma fresco 1,5 mg/ml. (C,D) Crioprecipitado de plasma fresco 3 mg/ml. (E,F) Plasma fresco 1,5 mg/ml. (G,H) Plasma fresco 3 mg/ml. (A,C,E,G) 10X. (B,D,F,H) 40X.

Se utilizó la tinción Tricrómico de Masson para detectar la presencia de fibras colágenas, que se tiñeron de color azul al contrastar con el colorante ácido. La tinción Tricrómico de Masson, específica para el análisis de colágeno no fue efectiva en este tipo de andamiajes (Figura 77). Por la acción del colorante básico hematoxilina, se determinó la presencia de componente celular teñido de morado intenso.

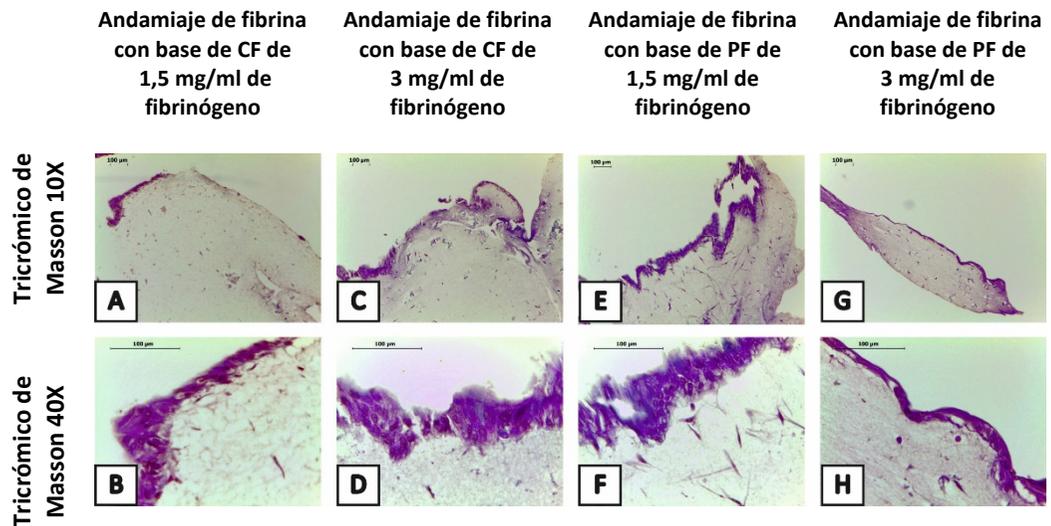


Figura 77. Análisis de colágeno mediante tinción Tricrómico de Masson de los andamiajes de primera generación que contienen células estromales en el interior y células epiteliales en la superficie. (A,B) Crioprecipitado de plasma fresco 1,5 mg/ml. (C,D) Crioprecipitado de plasma fresco 3 mg/ml. (E,F) Plasma fresco 1,5 mg/ml. (G,H) Plasma fresco 3 mg/ml. (A,C,E,G) 10X. (B,D,F,H) 40X.

#### 6.12.2. Análisis de la distribución celular

La utilización de la técnica de microscopía electrónica de barrido permitió visualizar las células estromales en el interior y las células epiteliales en la superficie de los andamiajes de fibrina de primera generación a las dos semanas de estudio.

Mediante microscopía electrónica de barrido se detectó la integración de las células estromales en el interior de los andamiajes de fibrina de primera generación con crioprecipitado de plasma fresco en su composición (Figura 78-A,B,C,D) y también con plasma fresco (Figura 78-E,F,G,H). También se observó la morfología de las células epiteliales en la superficie.

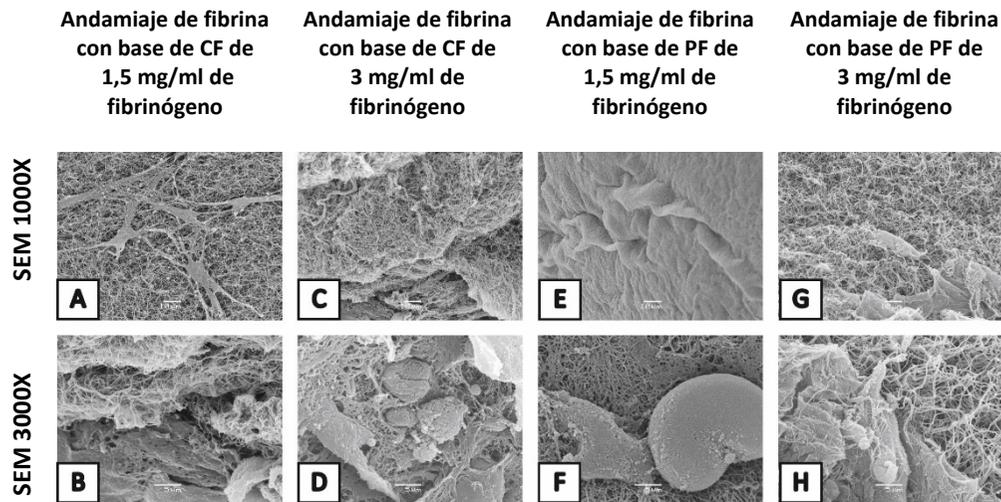


Figura 78. Análisis de la distribución celular mediante la técnica microscopía electrónica de barrido de los andamiajes de primera generación que contienen células estromales en el interior y células epiteliales en la superficie. (A) Crioprecipitado de plasma fresco 1,5 mg/ml. (B) Crioprecipitado de plasma fresco 3 mg/ml. (C) Plasma fresco 1,5 mg/ml. (D) Plasma fresco 3 mg/ml. (A,C,E,G) 1000X. (B,D,F,H) 3000X.

### 6.12.3. Caracterización bioquímica

Se realizó la cuantificación de las principales proteínas constituyentes de la matriz extracelular: colágeno, elastina y GAG, en todos los tipos de andamiaje de la primera generación de andamiaje de fibrina. La comparación se realizó entre el Estudio Control (andamiaje sin células) y el Estudio Cocultivo (andamiaje con células).

#### 6.12.3.1. Detección de colágeno

Se detectó la presencia de colágeno utilizando el kit comercial Sircol, obteniéndose una reacción colorimétrica de tonalidad rojiza (Figura 79). Se analizaron los valores de absorbancia y se aplicó un análisis estadístico en base al modelo lineal generalizado (Figura 80).



Figura 79. Resultado colorimétrico obtenido al analizar la concentración de colágeno en los andamiajes de fibrina de la primera generación mediante el kit Sircol.

En el análisis ANOVA no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los factores analizados (Tabla 19).

Tabla 19. ANOVA de los factores Estudio, Biomaterial y Concentración en el análisis global de los datos.

	GL	Valor F	P (>F)
Estudio	1	1,7859	0,1898
Biomaterial	1	2,6715	0,1109
Concentración	1	1,4155	0,2419
Residuos	36		

GL: Grados de libertad; P: Probabilidad.

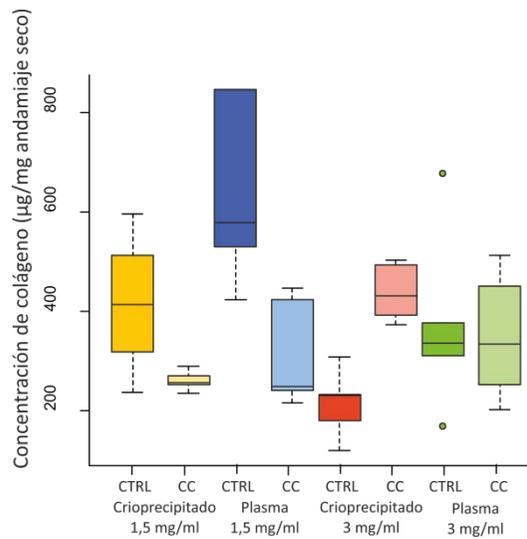


Figura 80. Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno en función del tipo de Estudio, Biomaterial y Concentración de fibrinógeno. Los resultados del análisis muestran que no existe un patrón claro en la distribución de la concentración de colágeno en función del tipo de Estudio, Biomaterial y Concentración de fibrinógeno, como había indicado previamente la ANOVA al no detectarse diferencias significativas. Los círculos se corresponden con valores atípicos. CTRL (Control), CC (Cocultivo). )n=5.

A continuación, se detallan los resultados obtenidos para cada factor analizado (estudio, biomaterial y concentración de fibrinógeno).

ESTUDIO. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre Control y Cocultivo (Figura 81). Esto indicó que el contenido de colágeno por miligramo (mg) de andamiaje analizado no disminuyó al cultivar células en el interior y en la superficie del andamiaje.

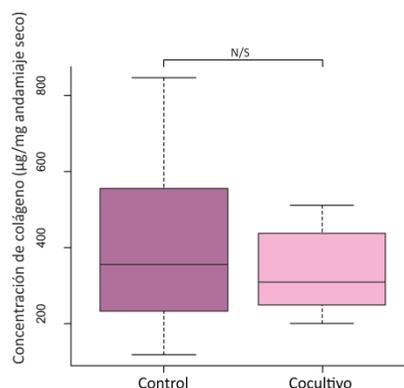


Figura 81. Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno en función del tipo de Estudio. N/S: No significación; n=5.

BIOMATERIAL. Según se muestra en la Figura 82, no existieron diferencias en función del biomaterial utilizado para la elaboración del andamiaje. El contenido de colágeno fue similar en los andamiajes que llevaban en su composición el Biomaterial Crioprecipitado y Plasma.

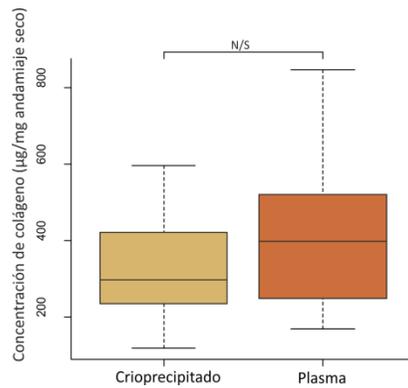


Figura 82. Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno en función del tipo de Biomaterial. N/S: No significación; n=5.

CONCENTRACIÓN. Este factor, según se muestra en la Figura 83, no tuvo influencia sobre el valor de la concentración de colágeno. El contenido fue similar en los andamiajes de Concentración de fibrinógeno 1,5 mg/ml y 3 mg/ml.

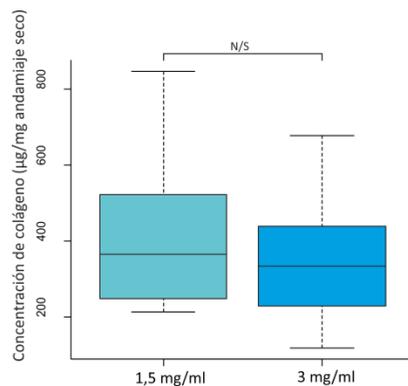


Figura 83. Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno en función de la Concentración de fibrinógeno. N/S: No significación; n=5.

Una vez realizado el análisis general de los datos, se procedió a un análisis individualizado en función de los diferentes factores a analizar: Estudio, Biomaterial y Concentración de fibrinógeno.

#### ANÁLISIS INDIVIDUALIZADO EN FUNCIÓN DEL ESTUDIO

En este apartado se realizó un análisis estadístico separando los datos en función del Estudio: Control y Cocultivo.

CONTROL. Para el conjunto de datos seleccionados en este Estudio, después de realizar el ANOVA sobre el modelo lineal generalizado de dos factores, se observaron diferencias significativas para ambos factores: Biomaterial ( $p \leq 0,05$ ) y Concentración ( $p \leq 0,01$ ).

La concentración de colágeno fue mayor en el Biomaterial Plasma respecto al Biomaterial Crioprecipitado (Figura 84-A). En cuanto a la Concentración de fibrinógeno se observó una relación inversamente proporcional, a menor concentración de fibrinógeno (1,5 ml/mg) en el andamiaje, la concentración de colágeno era significativamente mayor (Figura 84-B).

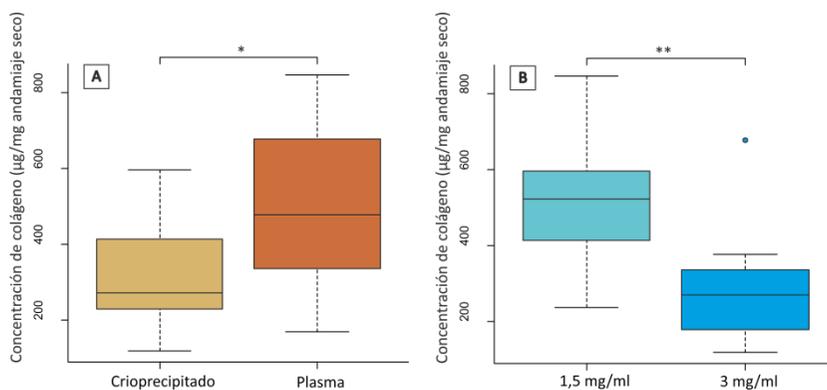


Figura 84. Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno en el Estudio Control según el Biomaterial y la Concentración de fibrinógeno. Concentración de colágeno según en Biomaterial (A) y la Concentración de fibrinógeno en su interior (B). Los círculos se corresponden con valores atípicos. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ;  $n=5$ .

COCULTIVO. Se seleccionaron solamente los datos referentes a este Estudio y se realizó una ANOVA sobre el modelo lineal generalizado con los dos factores que pudieron afectar en la concentración de colágeno: Biomaterial y Concentración.

No se detectaron diferencias significativas para el factor Biomaterial (Figura 85-A). Por el contrario, si se detectaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) para el factor Concentración, siendo el contenido en colágeno mayor cuanto mayor era la Concentración de fibrinógeno al contrario de lo que sucedía en los andamiajes sin células (Figura 85-B).

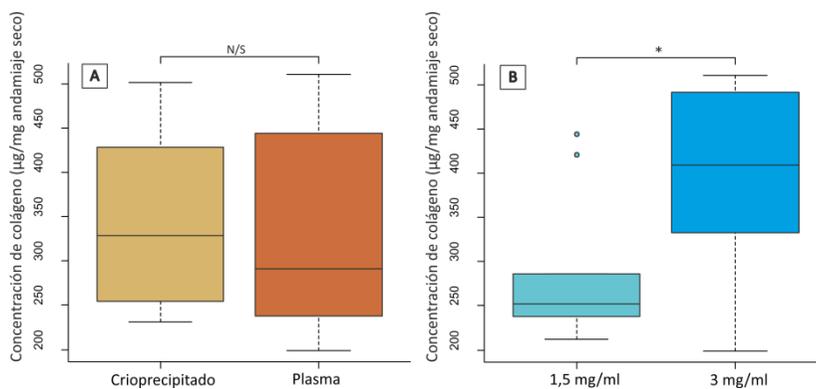


Figura 85. Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno en el Estudio Cocultivo según el Biomaterial y la Concentración. (A) Concentración de colágeno dependiendo del Biomaterial empleado. (B) Concentración de colágeno para las diferentes Concentraciones de fibrinógeno. Los círculos se corresponden con valores atípicos. \* $p \leq 0,05$ ; N/S: No significación;  $n=5$ .

## ANÁLISIS INDIVIDUALIZADO EN FUNCIÓN DEL BIOMATERIAL

Se realizó un análisis estadístico separando los datos en función del Biomaterial: Crioprecipitado y Plasma. Analizando en cada grupo la influencia del factor Estudio y Concentración sobre el contenido de colágeno en los andamiajes. Los resultados de las dos ANOVA, solo mostraron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) para el factor Estudio en el Biomaterial Plasma (Figura 86-B). En este caso, el cultivo de células en el andamiaje, contribuyó a la pérdida de colágeno en su estructura. Por el contrario, cuando el biomaterial utilizado fue Crioprecipitado, no afectó al contenido de colágeno en el andamiaje (Figura 86-A). Tampoco afectó a la concentración de colágeno la Concentración de fibrinógeno del biomaterial.

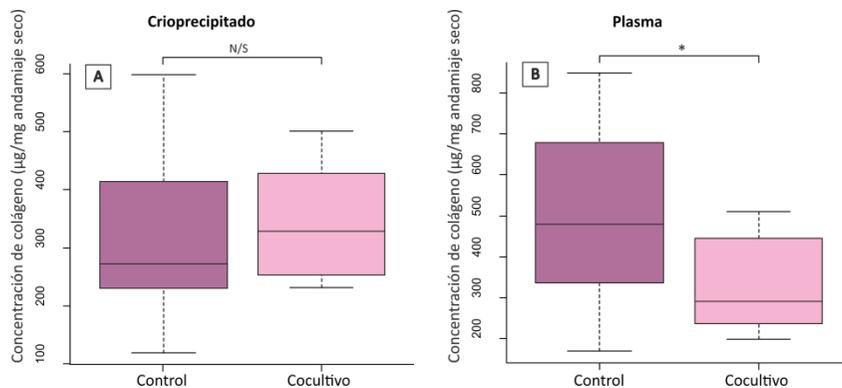


Figura 86. Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno en el Biomaterial Crioprecipitado y Plasma según el Estudio. (A) Concentración de colágeno en el Biomaterial Crioprecipitado dependiendo del Estudio. (B) Concentración de colágeno en el Biomaterial Plasma dependiendo del Estudio. \* $p \leq 0,05$ ; N/S: No significación;  $n=5$ . Nótese la diferencia de escala.

## ANÁLISIS INDIVIDUALIZADO EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN

En este apartado se realizó un análisis estadístico separando los datos en función de la Concentración de fibrinógeno: 1,5 mg/ml y 3 mg/ml.

Para el conjunto de datos seleccionados de la concentración 1,5 mg/ml, después de realizar la ANOVA sobre el modelo lineal generalizado de dos factores, se observaron diferencias significativas para ambos factores: Estudio ( $p \leq 0,01$ ) y Biomaterial ( $p \leq 0,05$ ).

Tras realizar el test de Tukey de comparación entre grupos, se detectaron diferencias significativas en el factor Estudio, siendo la concentración de colágeno mayor en el Estudio Control (Figura 87-A). Pero no hubo diferencias significativas para el factor Biomaterial.

Se seleccionaron los datos referentes a la concentración de fibrinógeno 3 mg/ml y se realizó una ANOVA sobre el modelo lineal generalizado con los dos factores que pudieron afectar a la concentración de colágeno: Estudio (Figura 87-B) y Concentración. No se detectaron diferencias significativas para ninguno de los dos factores.

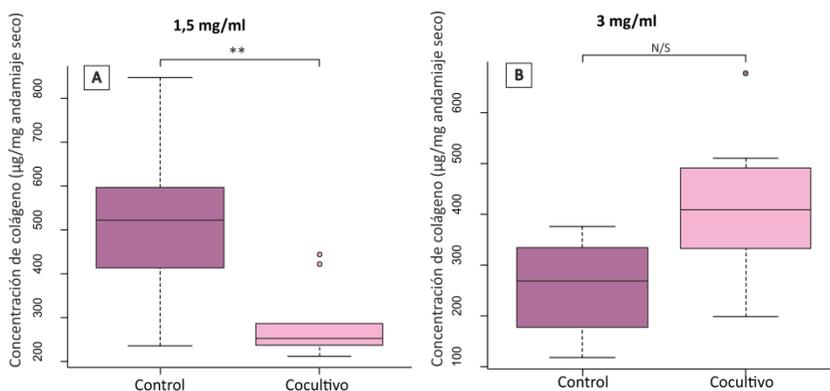


Figura 87. Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno a la Concentración de fibrinógeno 1,5 mg/ml y 3 mg/ml según el Estudio. (A) Concentración de colágeno dependiendo del Estudio a la Concentración de fibrinógeno 1,5 mg/ml. (B) Concentración de colágeno dependiendo del Estudio a la Concentración de fibrinógeno 3 mg/ml. Los círculos se corresponden con valores atípicos. \*\* $p \leq 0,01$ ; N/S: No significación;  $n=5$ . Nótese la diferencia de escala.

### 6.12.3.2. Detección de elastina

La presencia de elastina se detectó utilizando el kit comercial Fastin, obteniéndose una reacción colorimétrica de tonalidad amarilla (Figura 88). Se analizaron los valores de absorbancia aplicando un análisis estadístico en base al modelo lineal generalizado (Figura 89).



Figura 88. Resultado colorimétrico obtenido al analizar la concentración de elastina en los andamiajes de fibrina de la primera generación mediante el kit Fastin.

En el análisis ANOVA se detectaron diferencias significativas para el factor Estudio ( $p \leq 0,001$ ), pero no para los factores Biomaterial y Concentración (Tabla 20). El test de Tukey mostró diferencias significativas ( $p \leq 0,001$ ) entre Control y Cocultivo.

Tabla 20. ANOVA de los factores Estudio, Biomaterial y Concentración en el análisis global de los datos.

	GL	Valor F	P (>F)
Estudio	1	28,6078	5,159e-06 ***
Biomaterial	1	0,1314	0,7191
Concentración	1	2,3270	0,1359
Residuos	36		

GL: Grados de libertad; P: Probabilidad. \*\*\* $p \leq 0,001$ .

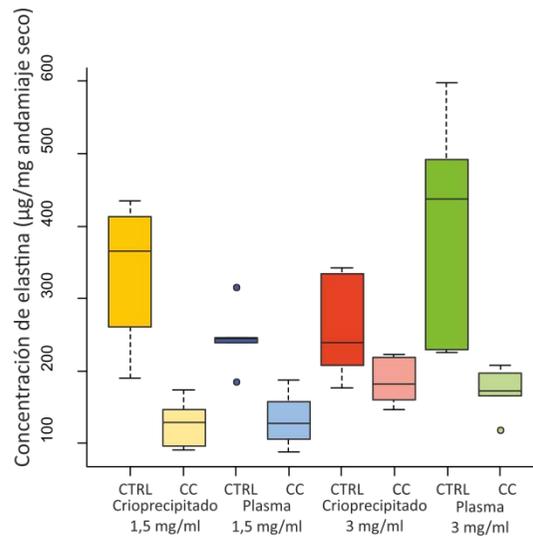


Figura 89. Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina en función del tipo de Estudio, Biomaterial y Concentración de fibrinógeno. Los resultados del análisis muestran un patrón claro en la distribución de la concentración de elastina en función del tipo de Estudio, como había indicado previamente la ANOVA al detectarse diferencias significativas. La concentración de elastina fue significativamente mayor cuando no se cultivaban células en el andamio, Estudio Control. No se detectaron diferencias significativas para el factor Biomaterial y el factor Concentración de fibrinógeno. Los círculos se corresponden con valores atípicos. CTRL (Control), CC (Cocultivo). n=5.

A continuación, se detallan los resultados obtenidos por factor de análisis (estudio, biomaterial y concentración de fibrinógeno).

ESTUDIO. Los resultados mostraron diferencias muy significativas ( $p \leq 0,001$ ) entre Control y Cocultivo (Figura 90). Esto indicó que el contenido de elastina por miligramo (mg) de muestra analizada disminuyó al cultivar células en el andamio.

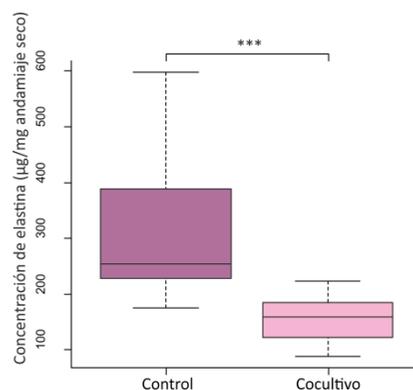


Figura 90. Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina en función del tipo de Estudio. El contenido de elastina fue claramente mayor en los andamiajes Control. \*\*\* $p \leq 0,001$ ; n=5.

BIOMATERIAL. Según se muestra en la Figura 91, no existieron diferencias en función del Biomaterial utilizado para la elaboración del andamiaje. El contenido de elastina fue similar en los andamiajes de composición Crioprecipitado y en los de composición Plasma.

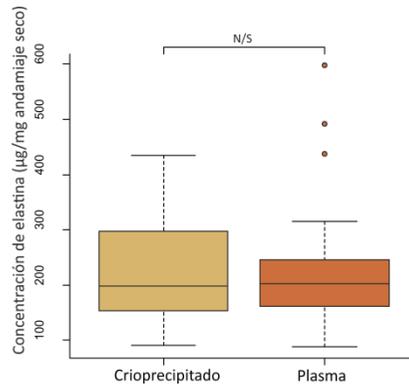


Figura 91. Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina en función del tipo de Biomaterial. Los círculos se corresponden con valores atípicos. N/S: No significación; n=5.

CONCENTRACIÓN. Este factor, según se muestra en la Figura 92, no tuvo influencia sobre el valor de la concentración de elastina. El contenido de elastina fue similar en los andamiajes de concentración de fibrinógeno 1,5 mg/ml y 3 mg/ml.

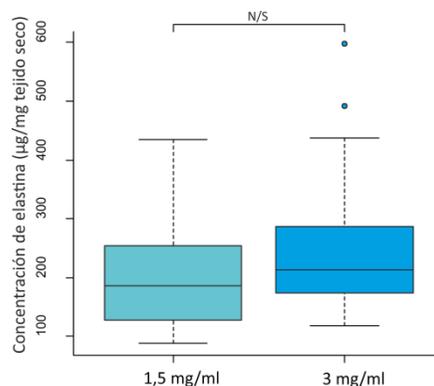


Figura 92. Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina en función de la Concentración de fibrinógeno. Los círculos se corresponden con valores atípicos. N/S: No significación; n=5.

Una vez realizado el análisis general de los datos, se realizó un análisis individualizado en función de los diferentes factores a analizar: Estudio, Biomaterial y Concentración de fibrinógeno.

## ANÁLISIS INDIVIDUALIZADO EN FUNCIÓN DEL ESTUDIO

Se realizó un análisis estadístico separando los datos en función del Estudio: Control y Cocultivo. Analizando en cada grupo la influencia del factor Biomaterial y Concentración sobre el contenido de elastina en los andamiajes. En el Estudio Control, el resultado de la ANOVA no mostro diferencias significativas para ambos factores.

Para el conjunto de datos seleccionados en el Estudio Cocultivo, después de realizar la ANOVA sobre el modelo lineal generalizado de dos factores no se detectaron diferencias significativas para el factor Biomaterial (Figura 93-A), pero si existieron diferencias ( $p \leq 0,01$ ) para el factor Concentración de fibrinógeno (Figura 93-B). La concentración de elastina fue mayor cuanto mayor fue la concentración de fibrinógeno, 3 mg/ml.

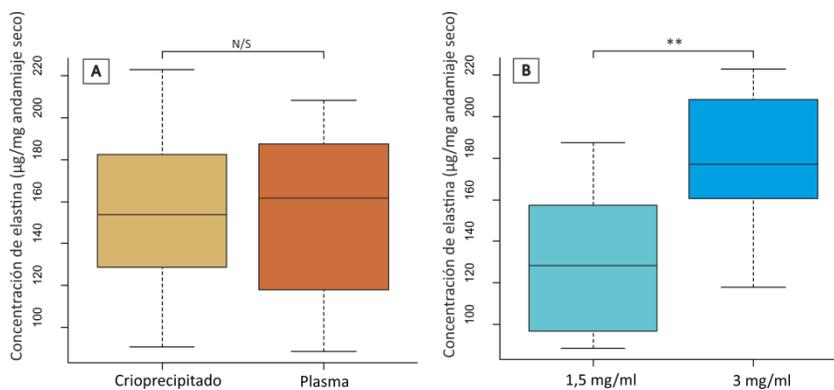


Figura 93. Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina en el Estudio Cocultivo según el Biomaterial y la Concentración. (A) Concentración de elastina dependiendo del Biomaterial empleado. (B) Concentración de elastina para las diferentes Concentraciones de fibrinógeno. \*\* $p \leq 0,01$ ; N/S: No significación;  $n=5$ .

## ANÁLISIS INDIVIDUALIZADO EN FUNCIÓN DEL BIOMATERIAL

En este apartado se realizó un análisis estadístico separando los datos en función del Biomaterial: Crioprecipitado y Plasma.

En el análisis realizado sólo con los datos de Crioprecipitado se consideraron dos factores: Estudio y Concentración. Los resultados de la ANOVA mostraron la existencia de diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) para el factor Estudio. Tras realizar el test de Tukey de comparación entre grupos, se pudieron evidenciar diferencias significativas ( $p \leq 0,001$ ) entre el Estudio Control y el Estudio Cocultivo (Figura 94-A). La concentración de elastina fue mayor en los andamiajes que no contenían células en su composición.

Cuando se seleccionaron solamente los datos referentes al Biomaterial Plasma y se realizó la ANOVA sobre el modelo lineal generalizado con los dos factores que pudieron afectar en la concentración de elastina, se evidenció la existencia de diferencias significativas para ambos: Estudio ( $p \leq 0,01$ ) y Concentración ( $p \leq 0,05$ ). Se realizó la comparación entre grupos dentro de cada factor mediante el test de Tukey y sólo se detectaron diferencias entre el Estudio Control y Cocultivo ( $p \leq 0,01$ ). El contenido de elastina fue mayor en los andamiajes del Estudio Control (Figura 94-B). Se confirmó que en este caso, la concentración de fibrinógeno no influyó en la concentración de elastina.

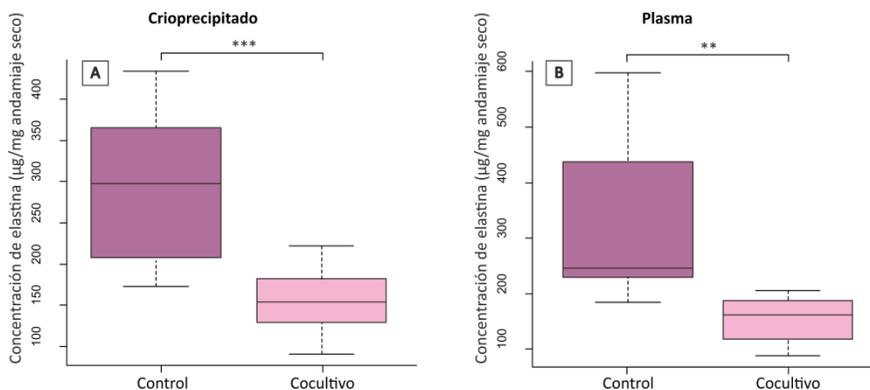


Figura 94. Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina en el Biomaterial Crioprecipitado y Plasma según el Estudio. (A) Concentración de elastina en el Biomaterial Crioprecipitado según el Estudio. (B) Concentración de elastina en el biomaterial Plasma según el estudio. \*\*\* $p \leq 0,001$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; N/S: No significación;  $n=5$ . Nótese la diferencia de escala.

### ANÁLISIS INDIVIDUALIZADO EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN

En este apartado se realizó un análisis estadístico separando los datos en función de la Concentración de fibrinógeno: 1,5 mg/ml y 3 mg/ml.

Para los datos seleccionados de la concentración 1,5 mg/ml, después de realizar la ANOVA sobre el modelo lineal generalizado de dos factores, se observaron diferencias muy significativas para el factor Estudio ( $p \leq 0,001$ ). Se comprobó nuevamente que la presencia de células en el andamiaje contribuye a la pérdida de elastina (Figura 95-A). No hubo diferencias entre los datos al analizar el factor Biomaterial.

Para la concentración de fibrinógeno 3 mg/ml, se realizó una ANOVA sobre el modelo lineal generalizado con los dos factores que pudieron afectar a la concentración de elastina. Para el factor Estudio se detectaron diferencias significativas al hacer el test de Tukey entre sus grupos ( $p \leq 0,01$ ), siendo mayor la concentración de elastina cuando no había células en el andamiaje (Figura 95-B). Por el contrario, el análisis del factor Biomaterial nos mostró que los diferentes orígenes de la fibrina no influyeron en la concentración de elastina.

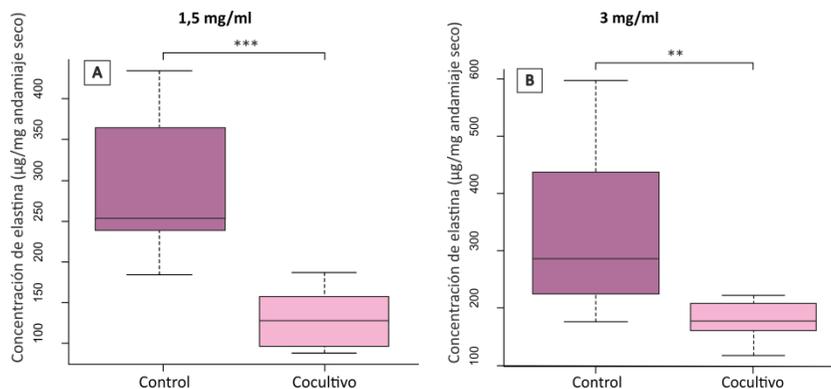


Figura 95. Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina a la Concentración de Fibrinógeno 1,5 mg/ml y 3 mg/ml en función del estudio Estudio. (A) Concentración de elastina a la concentración de fibrinógeno 1,5 mg/ml según el Estudio. (B) Concentración de elastina a la concentración de fibrinógeno 3 mg/ml según el Estudio.. \*\*\* $p \leq 0,001$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; N/S: No significación;  $n=5$ . Nótese la diferencia der escala.

### 6.12.3.3. Detección de GAG

La presencia de GAG se detectó utilizando el kit comercial Blyscan, obteniéndose una reacción colorimétrica de tonalidad azulada (Figura 96). Se analizaron los valores de absorbancia aplicando un análisis estadístico en base al modelo lineal generalizado.



Figura 96. Resultado colorimétrico obtenido al analizar la concentración de GAG en los andamiajes de fibrina de la primera generación mediante el kit Blyscan.

En el análisis ANOVA se detectaron diferencias significativas para el factor Estudio ( $p \leq 0,001$ ) y para el factor Concentración ( $p \leq 0,01$ ) (Tabla 21). En cuanto al factor Biomaterial no hubo diferencias en la concentración de GAG cuando el andamiaje era de Crioprecipitado o de Plasma (Figura 97). El test de Tukey mostró diferencias significativas ( $p \leq 0,001$ ) entre el Estudio Control y Cocultivo (Figura 98). La concentración de GAG fue significativamente mayor en el Estudio Cocultivo debido a la presencia de células secretoras de mucinas en su superficie. El test de Tukey del factor Concentración desveló que no hubo diferencias entre 1,5 mg/ml de fibrinógeno y 3 mg/ml de fibrinógeno en los andamiajes.

Tabla 21. ANOVA de los factores Estudio, Biomaterial y Concentración en el análisis global de los datos.

	GL	Valor F	P (>F)	
Estudio	1	75,9919	2,127e-10	***
Biomaterial	1	1,2633	0,268475	
Concentración	1	9,8478	0,003385	**
Residuos	36			

GL: Grados de libertad; P: Probabilidad. \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

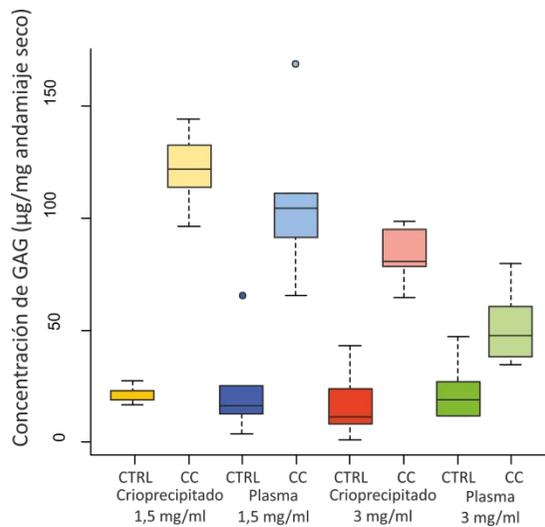


Figura 97. Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG en función del tipo de Estudio, Biomaterial y Concentración de fibrinógeno. Los resultados del análisis muestran un patrón claro en la distribución de la concentración de GAG en función del tipo de Estudio, como había indicado previamente la ANOVA al detectarse diferencias significativas. La concentración de elastina fue significativamente mayor cuando se cultivaban células en el andamiaje, Estudio Cocultivo. Se detectaron diferencias significativas para el factor Concentración de fibrinógeno. El factor Biomaterial no influyó en el contenido de GAG. Los círculos se corresponden con valores atípicos. CTRL (Control), CC (Cocultivo).  $n=5$ .

A continuación, se detallan los resultados obtenidos para cada factor analizado (estudio, biomaterial y concentración de fibrinógeno).

ESTUDIO. Los resultados mostraron diferencias muy significativas ( $p \leq 0,001$ ) entre Control y Cocultivo (Figura 98). Esto indicó que la concentración de GAG aumentó considerablemente al cultivar células en los andamiajes, siendo capaces de continuar secretando mucinas en cultivo tridimensional.

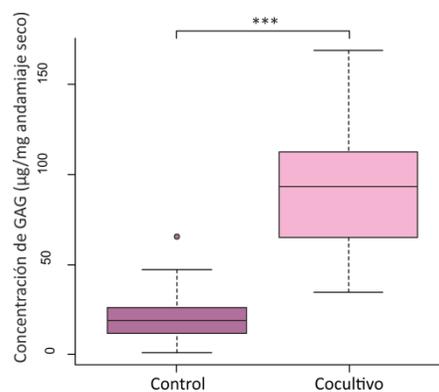


Figura 98. Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG en función del tipo de Estudio. El contenido de GAG fue significativamente mayor en los andamiajes que contenían células en su composición. Los círculos se corresponden con valores atípicos. \*\*\* $p \leq 0,001$ ;  $n=5$ .

BIOMATERIAL: Este factor, según se muestra en la Figura 99, no tuvo influencia sobre el valor de la concentración de GAG. El contenido de GAG fue similar en los andamiajes de composición Crioprecipitado y en los de composición Plasma.

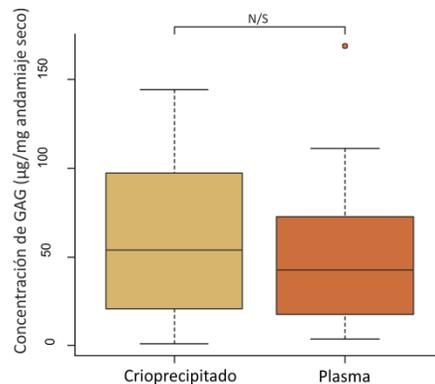


Figura 99. Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG en función del tipo de Biomaterial. Los círculos se corresponden con valores atípicos. N/S: No significación; n=5

CONCENTRACIÓN. En la Figura 100 se muestra que este factor no tuvo influencia sobre el valor de la concentración de GAG. El contenido de GAG fue similar en los andamiajes de Concentración 1,5 mg/ml y 3 mg/ml de fibrinógeno.

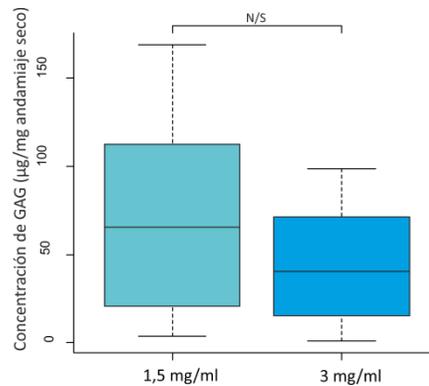


Figura 100. Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG en función de la Concentración de fibrinógeno. N/S: No significación; n=5.

## ANÁLISIS INDIVIDUALIZADO EN FUNCIÓN DEL ESTUDIO

En este apartado se realizó un análisis estadístico separando los datos en función del Estudio: Control y Cocultivo.

**CONTROL.** Para el conjunto de datos seleccionados en este Estudio, después de realizar el ANOVA sobre el modelo lineal generalizado de dos factores, no se observaron diferencias significativas para el factor Biomaterial y el factor Concentración (Figura 101-A).

**COCULTIVO.** Se seleccionaron solamente los datos referentes al Estudio Cocultivo y se realizó una ANOVA sobre el modelo lineal generalizado con los dos factores que pudieron afectar en la concentración de GAG. En este caso, el análisis no mostró diferencias para el factor Biomaterial, pero si para el factor Concentración ( $p \leq 0,001$ ).

Al realizar el análisis de Tukey, se comprobó que la concentración de GAG fue mayor cuanto menor era la concentración de fibrinógeno (Figura 101-B). Por lo tanto, se confirma que valores elevados de fibrinógeno en el andamiaje, contribuyen a una menor síntesis de GAG por parte de las células caliciformes de su composición.

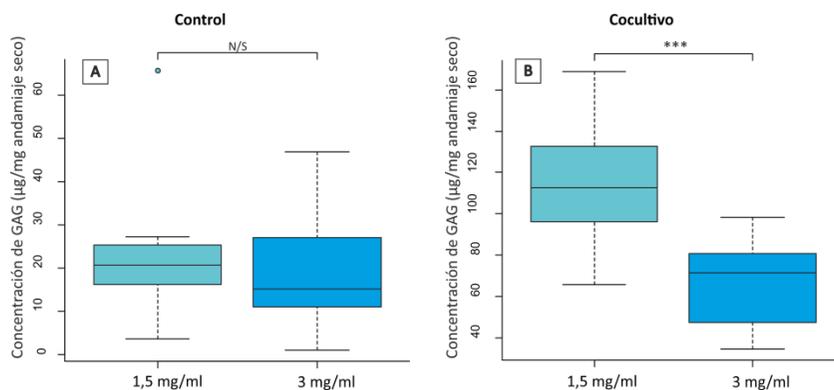


Figura 101. Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG en el Estudio Control y Cocultivo según la Concentración de fibrinógeno. (A) Concentración de GAG en el Estudio Control dependiendo de la Concentración de fibrinógeno. (B) Concentración de GAG en el Estudio Cocultivo dependiendo de la Concentración de fibrinógeno. Los círculos se corresponden con valores atípicos. \*\*\* $p \leq 0,001$ ; N/S: No significación;  $n=5$ . Nótese la diferencia de escala entre el Estudio.

## ANÁLISIS INDIVIDUALIZADO EN FUNCIÓN DEL BIOMATERIAL

En este apartado se realizó un análisis estadístico separando los datos en función del Biomaterial: Crioprecipitado y Plasma.

**CRIOPRECIPITADO.** En el análisis realizado sólo con los datos de Crioprecipitado se consideraron dos factores: Estudio y Concentración. Los resultados de la ANOVA mostraron la existencia de diferencias significativas para el factor Estudio ( $p \leq 0,001$ ) y para el factor Concentración ( $p \leq 0,05$ ). Tras realizar el test de Tukey de comparación entre grupos, se pudieron evidenciar diferencias significativas ( $p \leq 0,001$ ) entre el Estudio Control y el Estudio Cocultivo (Figura 102-A). Sin embargo, no se evidenciaron diferencias significativas para el factor Concentración.

**PLASMA.** Se seleccionaron solamente los datos referentes a este Biomaterial y se realizó una ANOVA sobre el modelo lineal generalizado con los dos factores que pudieron afectar en la concentración de GAG: Estudio y Concentración. Se detectaron diferencias significativas para el factor Estudio ( $p \leq 0,001$ ). El test de Tukey mostró diferencias significativas ( $p \leq 0,001$ ) entre el Estudio Control y Cocultivo (Figura 102-B).

En resumen, la concentración de GAG fue claramente mayor en el Estudio Cocultivo debido a la presencia de células secretoras de mucinas en la superficie de los andamiajes, independientemente de cual fuese el Biomaterial utilizado en su formulación.

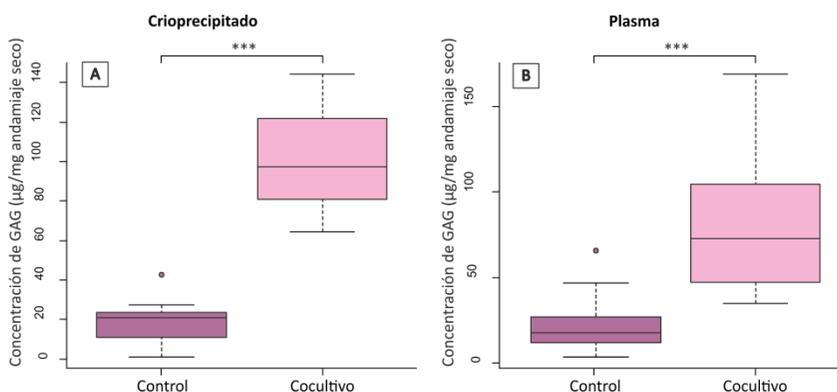


Figura 102. Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG en el Biomaterial Crioprecipitado y Plasma según el Estudio. (A) Concentración de GAG en el Biomaterial Crioprecipitado dependiendo del Estudio. (B) Concentración de GAG en el Biomaterial Plasma dependiendo del Estudio. Los círculos se corresponden a valores atípicos. \*\*\* $p \leq 0,001$ ; N/S: No significación;  $n=5$ . Nótese la diferencia de escala.

## ANÁLISIS INDIVIDUALIZADO EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN

En este apartado se realizó un análisis estadístico separando los datos en función de la Concentración de fibrinógeno: 1,5 mg/ml y 3 mg/ml.

1,5 mg/ml. Para el conjunto de datos seleccionados de esta Concentración, después de realizar la ANOVA sobre el modelo lineal generalizado se observaron diferencias significativas para el factor Estudio ( $p \leq 0,001$ ) pero no para el factor Biomaterial (Figura 103-A).

3 mg/ml. Se seleccionaron solamente los datos de la Concentración de fibrinógeno 3 mg/ml y se realizó una ANOVA sobre el modelo lineal generalizado con los dos factores que pudieron afectar en la concentración de GAG: Estudio y Biomaterial. Se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0,001$ ) para el factor Estudio y no se detectaron diferencias significativas para el factor Biomaterial (Figura 103-B).

En resumen, la concentración de GAG fue claramente mayor en el Estudio Cocultivo, independientemente de cual fuese la Concentración de fibrinógeno de su composición.

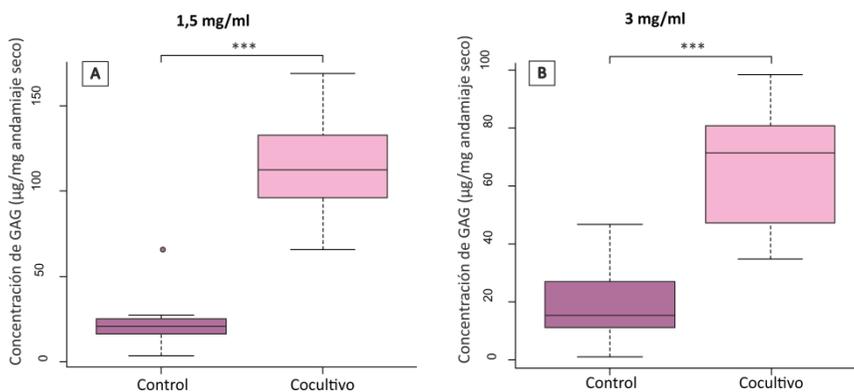


Figura 103. Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG a la Concentración de Fibrinógeno 1,5 mg/ml y 3 mg/ml en función del Estudio. (A) Concentración de GAG a la concentración de fibrinógeno 1,5 mg/ml según el Estudio. (B) Concentración de GAG a la concentración de fibrinógeno 3 mg/ml según el Estudio. Los círculos se corresponden a valores atípicos. \*\*\* $p \leq 0,001$ ; N/S: No significación;  $n=5$ . Nótese la diferencia de escala.

Los resultados obtenidos en el Capítulo 2 se pueden resumir en las siguientes observaciones.

1. El diseño de andamiajes de fibrina utilizando como material biológico crioprecipitado de plasma fresco permite la proliferación de células estromales de conjuntiva porcina en su interior.
2. El diseño de andamiajes de fibrina empleando plasma fresco como biomaterial biológico promueve en su interior la proliferación de células estromales de conjuntiva porcina.
3. Los andamiajes de fibrina de primera generación utilizando como base crioprecipitado de plasma fresco, a una baja (1,5 mg/ml) y a una alta (3 mg/ml) concentración de fibrinógeno, permiten la proliferación de células estromales en su interior y el mantenimiento de sus características fenotípicas. Las células epiteliales son capaces de proliferar en la superficie del andamiaje, manteniendo su fenotipo.
4. Los andamiajes de fibrina de primera generación utilizando plasma fresco como base de su composición, a una baja (1,5 mg/ml) y a una alta (3 mg/ml) concentración de fibrinógeno, promueve la proliferación de células estromales en su interior conservando sus características fenotípicas. Este tipo de andamiajes también facilitan la proliferación de las células epiteliales en la superficie del andamiaje, manteniendo su fenotipo.
5. Es posible determinar la proliferación celular en el interior de los andamiajes de fibrina de primera generación a lo largo del tiempo utilizando la técnica Alamar Blue.
6. El diseño de un modelo *in vitro* de conjuntiva porcina mediante ingeniería de tejidos utilizando crioprecipitado de plasma fresco como biomaterial es capaz de mantener el fenotipo de los componentes celulares de la conjuntiva, así como la composición bioquímica.

7. Es posible diseñar a partir de plasma de fresco un andamiaje tridimensional que permita el cultivo simultáneo de los dos componentes celulares principales de la conjuntiva. Las células estromales de su interior, así como las células epiteliales de su superficie, mantienen sus características fenotípicas. La composición bioquímica presenta valores similares a la conjuntiva nativa.

## VI- CAPÍTULO 2. DISCUSIÓN

La conjuntiva, junto con la córnea, se considera a nivel estructural y funcional, uno de los tejidos más importantes de la superficie ocular<sup>31,32,33</sup>. Enfermedades y lesiones que afecten a la conjuntiva, limitan la homeostasis y comprometen el correcto funcionamiento de la superficie ocular<sup>44</sup>. En lesiones severas, la ingeniería de tejidos representa una de las alternativas terapéuticas más exitosas para conseguir la reconstrucción óptima de la superficie ocular.

Un sustitutivo conjuntival ideal debe cumplir varios criterios para garantizar su efectividad<sup>57</sup>: debe ser lo suficientemente elástico para facilitar su manejo y adaptabilidad a la zona de implante; debe ser biocompatible evitando la inflamación y el rechazo; debe tener una capa que promueva la proliferación del componente estromal y, a su vez, actúe como soporte para facilitar el asentamiento de la capa epitelial.

La utilización de fibrina como biomaterial natural en la composición del andamiaje representa una apuesta prometedora, puesto que permite simular la estructura de la matriz extracelular de la conjuntiva y reproducir el ambiente nativo donde residen las células lo que facilita el mantenimiento de fenotipo celular *in vitro*.

El cultivo tridimensional de células hace posible reproducir el ambiente nativo donde residen las células. En este estudio se determinó la composición del andamiaje idóneo para el tratamiento de trastornos de la superficie ocular que impliquen defectos conjuntivales, utilizando la fibrina como biomaterial. La fibrina, obtenida a partir de plasma fresco o de crioprecipitado de plasma fresco, se utilizó como componente para optimizar el diseño de diferentes andamiajes variando la concentración de fibrinógeno. Los andamiajes de fibrina testados se caracterizaron mediante la técnica histológica de la tinción H-E y por microscopía electrónica de barrido, revelando una morfología celular fusiforme y un alto grado de celularidad, así como una estructura tridimensional estable en los andamiajes de crioprecipitado de plasma fresco (Figura 53-E,L; Figura 54-E,L) y en los andamiajes de plasma fresco (Figura 56-E,L; -E,L).

El fibrinógeno es una proteína soluble del plasma sanguíneo que representa el 1% del total de proteínas presentes en el plasma<sup>183</sup>, actúa promoviendo la adhesión y la proliferación celular<sup>106</sup>. Se considera un material biocompatible y biodegradable, que ha sido utilizado con éxito en el desarrollo de equivalentes de piel<sup>184,185</sup>, cartílago<sup>186-188</sup> y córnea<sup>120</sup>.

La concentración de fibrinógeno afecta a la proliferación celular y a la síntesis de colágeno<sup>129</sup>, y va a determinar el tamaño de poro del andamiaje. Una mayor

concentración de fibrinógeno se relaciona con un menor tamaño de poro. La porosidad de los andamiajes para dirigir las respuestas celulares promueve la alteración de las propiedades mecánicas de los andamiajes.

En ingeniería tisular, se promueve el desarrollo de andamiajes altamente porosos para facilitar la difusión de los nutrientes y del oxígeno y la eliminación de los desechos<sup>189</sup>.

En conclusión, el andamiaje de fibrina que contiene una mayor concentración de fibrinógeno presenta unas propiedades de manipulación adecuadas y, por lo tanto, es aplicable como un vehículo de suministro para células tales como fibroblastos<sup>190</sup>.

Algunos investigadores, proponen la combinación de fibrina con otros biomateriales naturales, como el colágeno<sup>96-98,191</sup>, o con biopolímeros, como la agarosa<sup>74</sup>, o incluso con polímeros sintéticos biocompatibles, como el polidimetilsiloxano<sup>192</sup>, para mejorar las características mecánicas de los andamiajes.

En este estudio, la utilización de la fibrina como biomaterial garantizó el desarrollo de un sustitutivo conjuntival de características similares a la conjuntiva nativa.

La utilización de crioprecipitado de plasma fresco como fuente de fibrina para el establecimiento de los andamiajes de primera generación, nos ha permitido realizar un estudio comparativo con el plasma fresco.

El análisis de la capacidad proliferativa de las células estromales en ambos tipos de andamiaje, reflejó que la proliferación celular en los andamiajes de plasma fresco es significativamente mayor, aunque la concentración de fibrinógeno sea la misma. Esta diferencia, hace pensar, que el proceso de obtención de los derivados sanguíneos influye posteriormente en el proceso de síntesis de la matriz extracelular, alterando la estructura tridimensional del andamiaje y dificultando la expansión celular en su interior.

De este modo, podría explicarse también, que no existan diferencias significativas en el proceso de expansión celular de las células epiteliales sobre la superficie de los andamiajes.

En relación a la caracterización inmunohistoquímica, tanto en los andamiajes de plasma fresco, como en los andamiajes de crioprecipitado de plasma fresco independientemente de la concentración de fibrinógeno en su composición, las células estromales han presentado positividad para el marcador vimentina. Además, las células epiteliales han sido capaces de seguir manteniendo reactividad para el marcador pancitoqueratina, poniendo de manifiesto su capacidad de expresión fuera del ambiente nativo.

En ingeniería tisular, cuando se quiere testar un nuevo andamiaje, uno de los parámetros a valorar es la capacidad proliferativa de las células en su interior. Para la determinación de este parámetro en células en monocapa, existen diferentes métodos, desde el uso de radioisótopos o moléculas marcadas radiactivamente, compuestos de tetrazolio que son reducidos a cristales de formazan por enzimas mitocondriales (MTT, XTT, MTS) o incorporación de BrdU (bromodesoxiuridina). El problema asociado a este tipo de técnicas es que requieren utilizar productos comerciales que resultan tóxicos para las células.

Como alternativa a los métodos anteriores, en este estudio se utilizó el AlamarBlue®, un método no tóxico, que permite medir viabilidad celular en células cultivadas directamente en superficies plásticas, en andamiajes tridimensionales, en el tejido, o incluso en células encapsuladas<sup>193-197</sup>.

Al tratarse de un método basado en el metabolismo celular, es conveniente tener en cuenta que cada tipo celular tiene un comportamiento único y unas propiedades específicas.

En el año 2011, miembros de este grupo de investigación, determinaron que el tiempo de incubación óptimo con AlamarBlue® para determinar la proliferación de los fibroblastos dérmicos en andamiajes de fibrina era 6 horas; 2 horas más que el tiempo establecido para las células en monocapa<sup>122</sup>.

En este nuevo estudio, al tratarse de un componente celular de diferente origen tisular y, testándose 4 andamiajes de composición diferente, se utilizó de nuevo el AlamarBlue® como método de medición. Los estudios realizados permitieron determinar que el tiempo de incubación óptimo para los andamiajes de crioprecipitado de plasma fresco de 1,5 mg/ml de fibrinógeno fue 26 horas. El mismo periodo de incubación fue necesario para los andamiajes de plasma fresco. En cambio, el tiempo de incubación óptimo para los andamiajes de crioprecipitado de plasma fresco de 3 mg/ml de fibrinógeno y para los andamiajes de plasma fresco de 3 mg/ml de fibrinógeno fue 30 horas. El incremento en el tiempo de incubación estaría justificado por un menor tamaño de poro en el andamiaje, que dificultaría la penetración del colorante metabólico, siendo necesario un mayor tiempo de incubación.

Cuando se aplica la técnica AlamarBlue®, hay que tener en cuenta, que el propio medio de cultivo puede dar señal, haciéndose necesario establecer un parámetro denominado blanco que restaremos al valor de fluorescencia obtenido<sup>198</sup>.

El AlamarBlue® se presenta como un método fiable que permite medir de forma sencilla y rápida el número de células viables que hay en el interior del andamiaje tridimensional

en cualquier momento del estudio. Actualmente, se están desarrollando técnicas más complejas, basadas en la autofluorescencia, para determinar la viabilidad celular en el interior de los andamiajes tridimensionales<sup>199</sup>.

En este estudio, hemos conseguido cultivar simultáneamente los dos componentes celulares principales de la conjuntiva, utilizando como andamiaje tridimensional dos alternativas de biomaterial biológico: crioprecipitado de plasma fresco y plasma fresco. El análisis histológico mediante la tinción H-E a las dos semanas de cultivo, puso de manifiesto, la correcta codistribución de las células estromales y las células epiteliales en los sustitutos tisulares. Además, mediante microscopía electrónica de barrido, se pudieron visualizar ambos tipos celulares en la estructura tridimensional de cada uno de los 4 tipos de andamiaje de estudio.

Por el contrario, la tinción Tricrómico de Masson no permitió determinar la presencia de fibras de colágeno en este tipo de andamiajes. Al no poder realizar una valoración cualitativa, a través del análisis de la composición bioquímica de los sustitutos tisulares se consiguió obtener los valores cuantitativos de colágeno, elastina y glicosaminoglicanos.

De este modo, se comprobó que en los andamiajes que no contenían células, la concentración de colágeno era mayor en los andamiajes de plasma, cuanto menor era la concentración de fibrinógeno. En cambio, durante el cocultivo el biomaterial no influyó en la concentración de colágeno, siendo mayor cuando mayor fue la concentración de fibrinógeno.

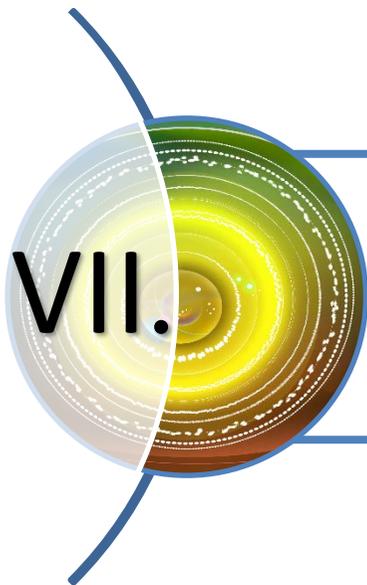
Además, los valores de elastina disminuyeron significativamente cuando se cultivaron simultáneamente los dos tipos celulares conjuntivales. Por el contrario, el biomaterial no tuvo influencia en la concentración de elastina; pero una mayor concentración de fibrinógeno, se relacionó con una mayor concentración de elastina.

Por el contrario, se comprobó que la concentración de glicosaminoglicanos fue significativamente mayor cuando se cultivaron las células en los sustitutos tisulares y cuanto menor fue la concentración de fibrinógeno. Por lo tanto, las células epiteliales son capaces de mantener su capacidad secretora en cultivo tridimensional; y cuando el tamaño de poro del andamiaje es mayor, las células poseen mayor capacidad proliferativa.

Por todo lo anterior, la utilización de la fibrina como biomaterial garantizó el desarrollo de un sustituto conjuntival que permite la proliferación de células estromales y actúa como soporte de células epiteliales conjuntivales que forman la capa epitelial. Las células son capaces de mantener sus capacidades fenotípicas, y la composición

bioquímica del andamiaje posee una menor concentración de colágeno y elastina, pero aumenta significativamente la concentración de glicosaminoglicanos.





**VII.**

### **CAPÍTULO 3:**

**DESCELULARIZACIÓN DE  
CONJUNTIVA PORCINA: DISEÑO  
DE LA SEGUNDA Y TERCERA  
GENERACIÓN DE ANDAMIAJES**



El material empleado para el desarrollo del presente estudio está detallado en el Anexo I, mientras que los protocolos empleados aparecen descritos en el Anexo II.

El tercer capítulo de este trabajo está basado en el diseño de andamiajes tridimensionales utilizando dos tipos de biomateriales biológicos derivados del proceso de descelularización de la conjuntiva porcina.

Como segunda generación de andamiajes se utilizó conjuntiva porcina descelularizada. Para la tercera generación de andamiajes se elaboró una formulación innovadora utilizando como base la fibrina y las fibras obtenidas de la digestión de la conjuntiva porcina descelularizada (Figura 104).

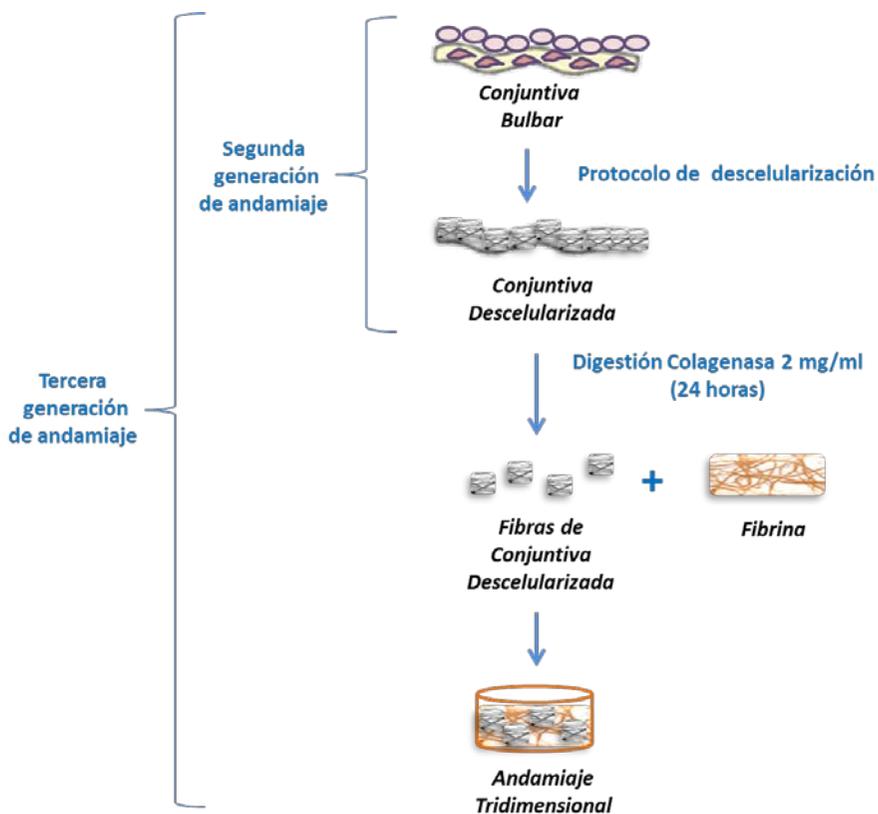


Figura 104. Esquema resumen de la composición de la segunda y tercera generación de andamiajes.

### ETAPA 1:

En una primera etapa, se aplicó un protocolo de descelerización basado en la combinación de choques osmóticos y choques de pH, en conjuntiva de origen porcino. Se probó la efectividad del protocolo comprobando la ausencia de componente celular mediante el análisis histológico y el ensayo Alamar Blue determinó la ausencia de viabilidad celular. Se valoró la estructura acelular tridimensional resultante a través de microscopía electrónica de barrido y se caracterizó biomecánicamente. Se realizó un ensayo de citotoxicidad de las soluciones de descelerización mediante la técnica de fluorescencia Live Dead (Figura 105).

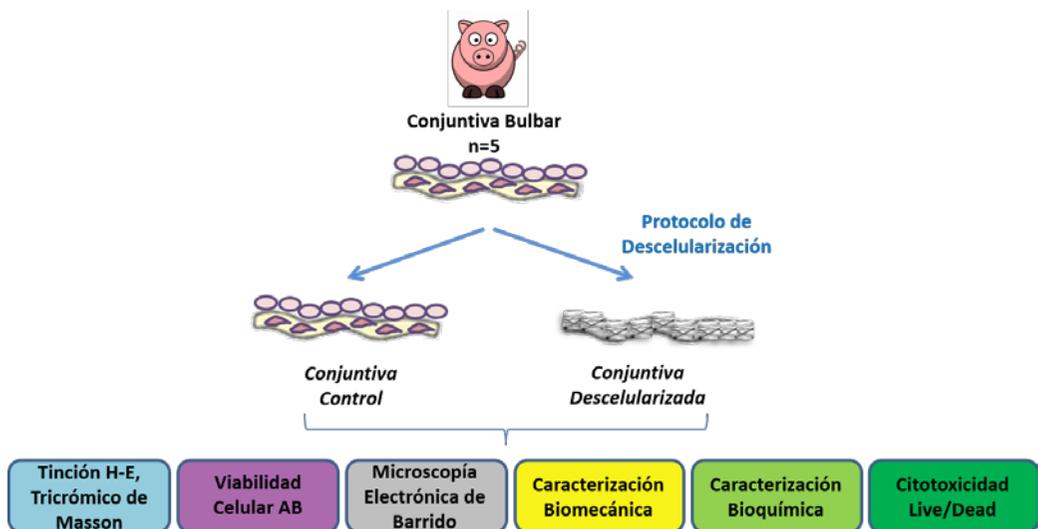


Figura 105. Estudio para comprobar la efectividad de un protocolo de descelerización en la conjuntiva porcina. Análisis histológico y determinación de la ausencia de viabilidad celular. Caracterización estructural, biomecánica y bioquímica de la matriz acelular tridimensional resultante. Ensayo citotóxico de las soluciones de descelerización.

## ETAPA 2:

Una vez comprobada la efectividad del protocolo de descelularización, se realizó un estudio de biocompatibilidad utilizando como base la conjuntiva porcina descelularizada y cultivando simultáneamente los dos tipos celulares conjuntivales: células estromales en el interior mediante inyección y células epiteliales en la superficie. Se determinó la capacidad de mantenimiento de la morfología de cada tipo celular mediante técnicas histológicas. La caracterización a nivel de sistema del cocultivo se llevó a cabo mediante estudios de microscopía electrónica de barrido y la determinación de su composición bioquímica (Figura 106).

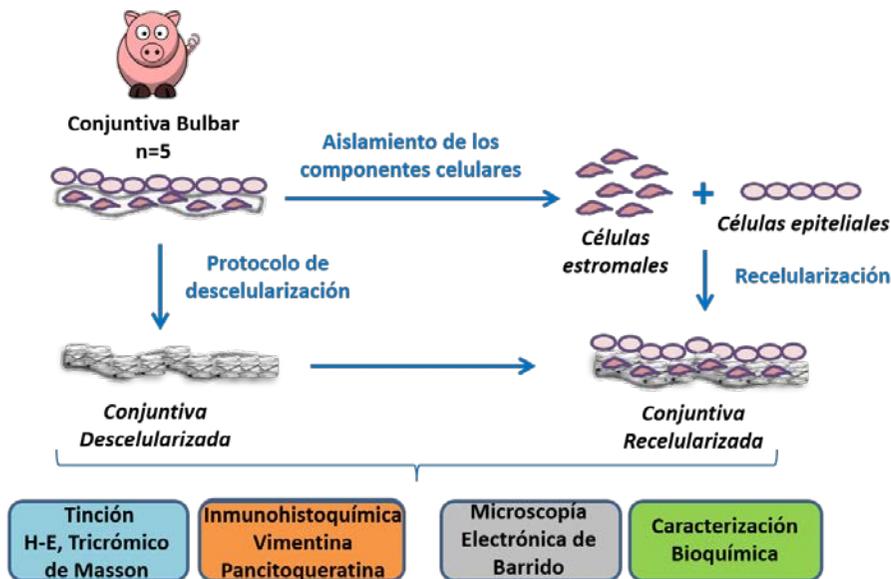


Figura 106. Cultivo de las células aisladas de la conjuntiva en conjuntiva descelularizada. Determinación de la morfología celular, la caracterización fenotípica de cada tipo celular, la distribución en el andamiaje y la composición bioquímica del andamiaje.

### ETAPA 3:

Por último, se elaboró un nuevo tipo de andamaje utilizando como material biológico la fibrina y las fibras obtenidas de la digestión de la conjuntiva porcina descelularizada. Los dos tipos celulares de la conjuntiva se cultivaron simultáneamente para comprobar la biocompatibilidad del andamaje: las células estromales formaron parte de la formulación del andamaje y las células epiteliales se cultivaron sobre la superficie.

Se determinó la capacidad de mantenimiento de la morfología de cada tipo celular mediante técnicas histológicas. La caracterización a nivel de sistema del cocultivo se llevó a cabo mediante estudios de microscopía electrónica de barrido, microscopía confocal y la determinación de su composición bioquímica (Figura 107).

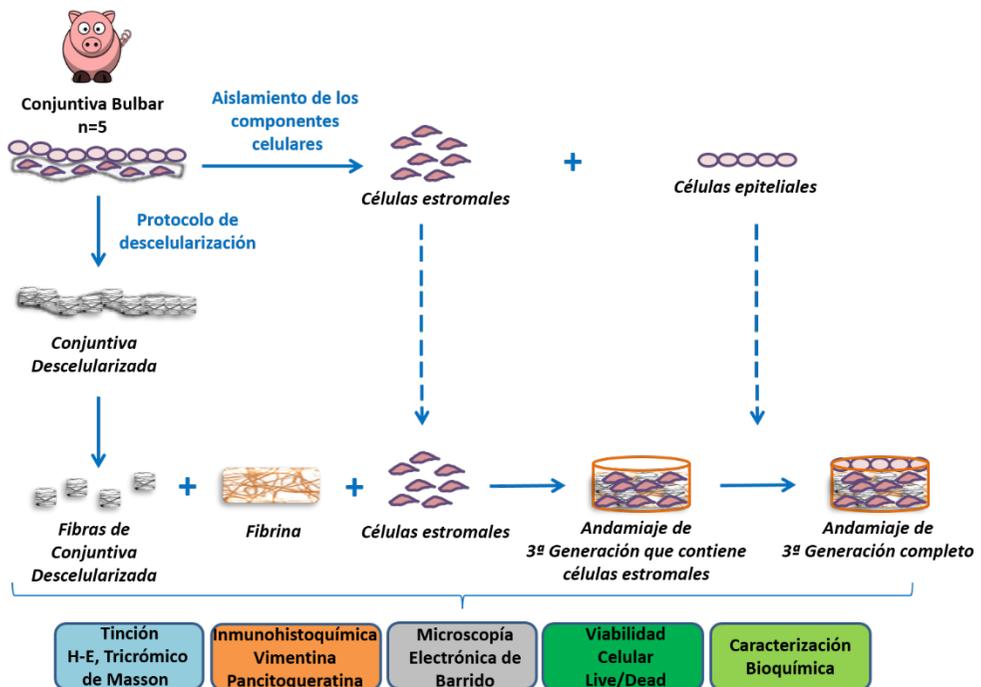


Figura 107. Cultivo de las células aisladas de la conjuntiva en un andamaje de fibrina con fibras de conjuntiva descelularizada. Determinación de la morfología celular, la caracterización fenotípica de cada tipo celular, la distribución en el andamaje, la viabilidad celular y la composición bioquímica del andamaje.

## VII- CAPÍTULO 3. MATERIAL Y MÉTODO

### ETAPA 1

#### 7.1. Descripción de un protocolo de descelularización óptimo

##### 7.1.1. Obtención y procesado de las muestras

Se escindió el tejido conjuntival de la zona bulbar alrededor de todo el anillo corneo-escleral de 5 ojos de cerdo. Cada muestra se dividió en dos secciones: una sección se utilizó como control sin sufrir ningún tipo de tratamiento y la otra sección se sometió a un proceso de descelularización.

El protocolo utilizado para la descelularización de la conjuntiva porcina ha sido ampliamente probado por los miembros de este grupo de investigación. Se ha comprobado su efectividad en variedad de tejidos de diferentes orígenes<sup>200</sup>.

##### 7.1.2. Aplicación del protocolo de descelularización en la conjuntiva porcina

El protocolo de descelularización aplicado está definido por 6 pasos secuenciales caracterizados por la incubación de las muestras en una solución hipotónica ácida (A) y posteriormente en una solución hipertónica básica (B). Finalizando con un tratamiento enzimático combinando desoxirribonucleasa I (DNAsa I, 50 µg/ml) y ribonucleasa A (RNAsa A, 40 µg/ml) para eliminar los posibles restos celulares. A continuación se detallan las etapas completas del protocolo de descelularización (Figura 108):

PASO 1: Lavado de 24 horas a TªA (temperatura ambiente) con agua destilada estéril.

PASO 2: Se introdujeron las muestras en la solución hipotónica (Anexo II – Protocolo XIII). En el Protocolo A/B esta solución fue ácida y, por tanto, se ajustó el pH entre 5-5,5. Las muestras se mantuvieron en esta solución hipotónica durante 48 horas a TªA.

PASO 3: Las muestras se pusieron en contacto con la solución hipertónica (Anexo II – Protocolo XIV). En este caso el pH se ajustó entre 11-11,5 para la solución hipertónica básica del Protocolo A/B. Las muestras se mantuvieron en esta solución hipertónica durante 72 horas a TªA.

PASO 4: Se llevaron a cabo 3 ciclos de lavado con PBS estéril de 10 minutos de duración bajo agitación orbital a 12.000 rpm en condiciones de TªA.

PASO 5: Se realizó un tratamiento enzimático con desoxirribonucleasa I (DNAsa I) (50 µg/ml) y ribonucleasa A (RNAsa A) (40 µg/ml) (Anexo II – Protocolo XV). Se dejó actuar durante 7 horas en un incubador de cultivos celulares a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa.

PASO 6: Por último, se finalizó con otra serie de 3 ciclos de lavado en PBS de 10 minutos de duración bajo agitación orbital a 12.000 rpm en condiciones de TªA.

Los ajustes de pH se alcanzaron con HCl 1 M y NaOH 2 M y todas las soluciones fueron preparadas en condiciones de asepsia.

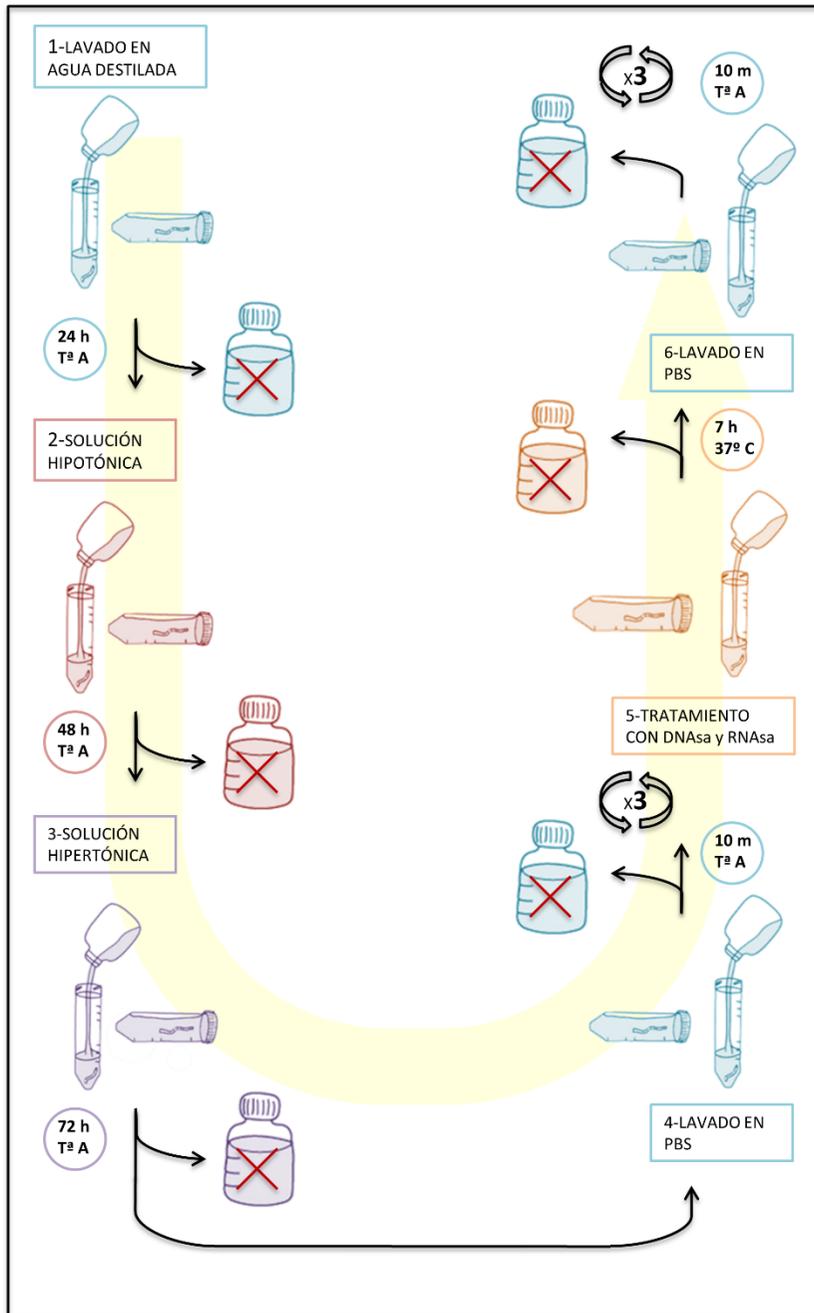


Figura 108. Diagrama esquemático del protocolo de descelerización. Se pueden apreciar las etapas constituyentes, los cambios y desechos de soluciones que se producen en cada paso así como las condiciones experimentales que las caracterizan.

### 7.1.3. Caracterización de las estructuras acelulares obtenidas

#### 7.1.3.1. Estudios de histología

Se obtuvieron 10 muestras para estudios histológicos: control (conjuntiva en fresco, n=5) y estudio (conjuntiva descelularizada, n=5). Se procesaron como se ha detallado en el punto 6.2.2.

Las secciones obtenidas se tiñeron con un protocolo estándar de Hematoxilina-Eosina (H-E) (Anexo II – Protocolo V). Además de la tinción H-E, se realizó la tinción Tricrómico de Masson, descrita en el Anexo II-Protocolo IX, para la visualización de las fibras de colágeno.

#### 7.1.3.2. Estudios de microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se obtuvieron 10 muestras para estudios de microscopía electrónica de barrido: control (conjuntiva en fresco, n=5) y estudio (conjuntiva descelularizada, n=5). Se procesaron como se ha detallado en el punto 6.2.4.

#### 7.1.3.3. Viabilidad celular AlamarBlue®

Se utilizó la técnica AlamarBlue® para determinar la viabilidad celular. Se realizó una toma de medidas a diferentes tiempos de incubación con el Alamar Blue de las matrices obtenidas después de la aplicación del protocolo de descelularización (n=5) considerando como control al proceso, la conjuntiva en Fresco (n=5).

Los tejidos en Fresco y las matrices descelularizadas se procesaron en fragmentos de 3 x 3 mm y se depositaron en una placa de 96 pocillos en una solución de medio de cultivo base (Dulbecco's modified Eagle Medium, DMEM) suplementada con AlamarBlue® al 10% (v/v). Tras añadir el medio, la placa se introdujo en el incubador de cultivos celulares a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa (Figura 109).

A tiempo 4, 6, 8, 10, 12 y 24 horas de incubación se recuperaron 100 µl de la solución y se midió la fluorescencia con una sensibilidad de 45 fmol, una longitud de onda de excitación de 560 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm, en el fluorímetro (Synergy HT, Bio-TEK). Para las mediciones se utilizaron placas de 96 pocillos. Cada vez

que se recogió una alícuota de la solución para la medida de la fluorescencia, se añadió una cantidad idéntica, para evitar una concentración en la señal. A la medida de fluorescencia se restó el valor obtenido en el blanco.

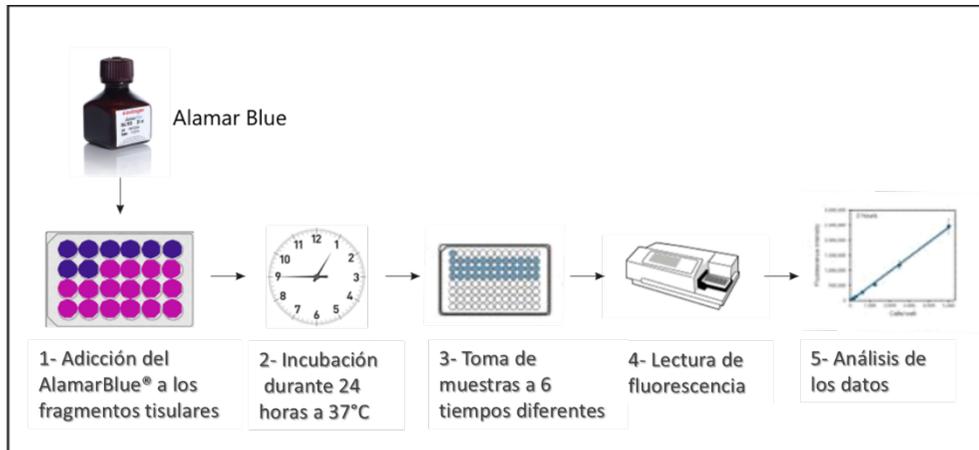


Figura 109. Representación esquemática del protocolo para la medida de viabilidad celular. Se añadió la solución de cultivo base suplementada con AlamarBlue® y se midieron, por fluorescencia, las muestras extraídas a 6 tiempos diferentes.

#### 7.1.3.4. Valoración del estado de la matriz extracelular: estudio biomecánico

Después de la aplicación del protocolo de descelularización, mediante ensayos biomecánicos se valoró el posible daño generado en la matriz extracelular. Para ello se realizó un test de tensión uniaxial con un tensiómetro (Imperial 1.000, Mecmesin) de carga 1.000 Newton (N).

Los ensayos se realizaron a T<sup>a</sup>A sobre fragmentos de conjuntiva de 20 mm de longitud y 5 mm de ancho: conjuntiva en Fresco (n=5) y conjuntiva descelularizada (n=5).

Al principio de las mediciones hasta precarga se utilizó una velocidad de avance de 75 mm/min. Una vez que se alcanzó el estado de precarga, la velocidad de avance hasta ruptura continuó a 75 mm/min. Se consideraron los datos de: Fuerza de rotura (N), Rigidez (N/mm), Tensión de rotura (MPa) y Módulo elástico, o de Young, (MPa).

#### *7.1.3.5. Citotoxicidad residual del medio de descelularización*

Con objeto de conocer si los reactivos químicos empleados en la elaboración de la solución hipotónica e hipertónica de descelularización se pudiesen mantener en concentraciones residuales dentro de la matriz acelular se realizó un ensayo de citotoxicidad.

En la evaluación de la posible citotoxicidad de los restos de las soluciones descelularizantes en las muestras, se utilizó el líquido del último lavado con PBS del protocolo de descelularización. Simultáneamente, se recuperaron células estromales y células epiteliales en P5, y se sembraron en cámaras de cultivo celular de 8 pocillos a una densidad inicial de  $5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>. El líquido de lavado se mezcló con el medio de cultivo específico para cada tipo celular en una proporción 1:1 y se filtró mediante un sistema de vacío.

Se utilizó la mezcla de medio de cultivo-líquido de lavado, preparado anteriormente, para añadirlo a las células cada 2-3 días durante un periodo total de 14 días.

Se consideró la realización de dos controles: positivo y negativo. Como control positivo se realizó el cambio de medio con el medio de cultivo específico para cada tipo celular. Como control negativo, se realizó el cambio de medio sólo con el medio de cultivo específico para cada tipo celular y 24 horas antes de realizar el ensayo de viabilidad celular, se añadió dimetilsulfóxido (DMSO) para provocar la muerte de las células en cultivo.

Transcurrido el tiempo de estudio, se procedió a la realización del ensayo Live/Dead para la visualización de células vivas y muertas (Figura 110). Se añadieron 200 µl de los reactivos: 2 µM de calceína AM y 4 µM de homodímero de etidio (Eth D-1), preparado sobre PBS, se incubó durante 40 minutos a T<sup>a</sup>A. Después de la incubación se realizó un lavado intenso con PBS para retirar el exceso de marcaje. La fluorescencia se visualizó con el microscopio láser confocal (TE2.000-U, Nikon Eclipse) y se cuantificaron las células vivas y muertas obtenidas, así como el porcentaje de viabilidad mediante el programa de análisis de imágenes ImageJ.

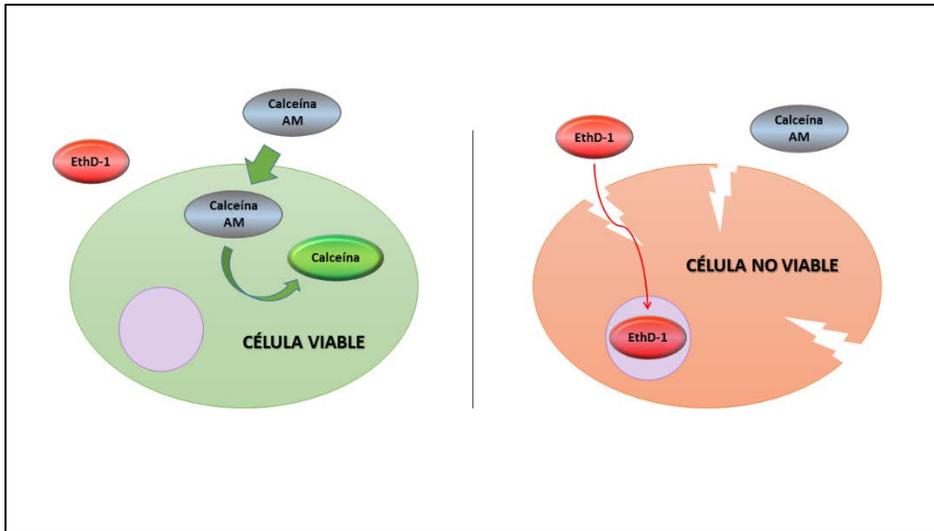


Figura 110. Esquema del funcionamiento del marcaje celular Live/Dead. La calceína AM tiñe el citoplasma de las células viables en verde. El homodímero de etidio tiñe los núcleos de las células muertas en rojo.

#### 7.1.3.6. Valoración del estado de la matriz extracelular: estudio bioquímico

Se recogieron 10 muestras de conjuntiva: en Fresco (n=5) y descellularizadas (n=5).

Se utilizaron kits colorimétricos comerciales específicos para cada componente extracelular: colágeno, elastina y glicosaminoglicanos (GAG), tal y como se detalló en el apartado 6.5.3.

Se midió la colorimetría obtenida por absorbancia, en el lector de placas (Multiskan EX, Labsystems), con los filtros recomendados por el fabricante. Se restó el blanco a la medida de absorbancia.

#### 7.1.3.7. Inmunohistoquímica

Se obtuvieron 10 muestras para estudios inmunohistoquímicos: control (conjuntiva en fresco, n=5) y estudio (conjuntiva descellularizada, n=5). Se procesaron como se ha detallado en el punto 6.2.2.

Las secciones obtenidas se sometieron a diferentes tinciones: Vimentina (Anexo II-Protocolo VII) y Pancitoqueratina (Anexo II-Protocolo VIII).

---

## ETAPA 2

---

### 7.2. Diseño de la segunda generación de andamiajes empleando como base conjuntiva descelularizada

#### 7.2.1. Obtención de muestras

Se escindió el tejido conjuntival de la zona bulbar alrededor de todo el anillo corneo-escleral de 5 ojos de cerdo. Se sometió a las muestras al protocolo de descelularización descrito en la etapa 1.

#### 7.2.2. Protocolo de elaboración: recelularización de conjuntiva porcina descelularizada con células conjuntivales

Las células estromales y epiteliales que se utilizaron como componente celular en el proceso de recelularización provenían del estudio desarrollado en el capítulo I. Las células conjuntivales se mantuvieron en cultivo hasta el correspondiente pase celular de estudio y, cuando alcanzaron el estado de preconfluencia, se tripsinizaron para conseguir la individualización celular. El recuento celular se realizó mediante la técnica azul tripán.

Utilizando como andamiaje la conjuntiva descelularizada (n=5) se cultivaron simultáneamente los dos componentes celulares de la conjuntiva (Figura 111).

Para ello fue necesaria la realización de tres etapas: en un primer paso se fijó la conjuntiva descelularizada de tamaño 5x5 mm a la base de una placa de poliestireno de 96 pocillos; en un segundo paso se inyectaron las células estromales y para finalizar se sembraron las células epiteliales. Se dejó evolucionar durante dos semanas.

#### PASO 1- FIJACIÓN DEL TEJIDO DESCELULARIZADO

Sobre la mezcla de plasma fresco (400 µl/ml) y MCF se añadió ácido tranexámico (4 mg/ml) para prevenir la fibrinólisis de la fibrina y, por último, se añadió cloruro cálcico (4 mg/ml) como activador del mecanismo de coagulación.

Se añadieron 100 µl de la mezcla en cada pocillo de la placa de 96 y se fijó la muestra de conjuntiva descelularizada a la mezcla. Se introdujo la placa de cultivo en el incubador de cultivos celulares a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa.

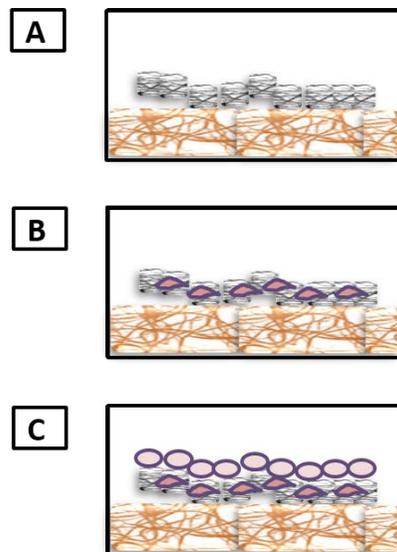
## PASO 2- INYECCIÓN DE CÉLULAS ESTROMALES

Cuando la fibrina polimerizó y los fragmentos de conjuntiva se encontraban adheridos a la base del pocillo, se inyectaron las células estromales a P5, empleando una jeringa de 1 ml, a una densidad de 10.000 células/ml en un volumen de 100  $\mu$ l de MCF. Los andamiajes se dejaron estabilizar en condiciones de cultivo estándar durante toda la noche.

## PASO 3- SIEMBRA DE CÉLULAS EPITELIALES EN LA SUPERFICIE

Al día siguiente, se sembraron sobre la superficie del andamiaje las células epiteliales a P5 una densidad de 25.000 células/ml utilizando 100  $\mu$ l de MCE. Se realizaron 5 estudios y el número de réplicas fue 5 para poder realizar la caracterización a nivel de sistema: una réplica para los estudios de histología, otra réplica para el estudio de SEM y tres réplicas para la cuantificación proteica.

Los andamiajes se mantuvieron en condiciones de cultivo estándar durante dos semanas. El MCE se reemplazó cada dos días.



*Figura 111. Cocultivo de los componentes celulares de la conjuntiva en el andamiaje de 2ª generación. (A) Fijación de la conjuntiva descelularizada a la placa utilizando fibrina. (B) Inyección de células estromales P5 en la conjuntiva descelularizada. (C) Se sembraron las células epiteliales P5 sobre la conjuntiva descelularizada utilizando MCE.*

#### *7.2.2.1. Estudios de histología*

Tras 2 semanas de cultivo, los 5 andamiajes se recuperaron y se colocaron en cassettes de histología, previamente rotulados. El análisis histológico se realizó como se ha descrito en la sección 6.2.2. Además de la tinción H-E, se realizó la tinción Tricrómico de Masson, descrita en el ANEXO II-Protocolo IX, para la visualización de las fibras de colágeno.

#### *7.2.2.2. Estudios de microscopía electrónica de barrido (SEM)*

Se utilizó la técnica SEM descrita en la sección 6.2.4. para la visualización de la codistribución de las células estromales y las células epiteliales en el andamiaje de conjuntiva descelularizada. Se analizaron 5 muestras.

#### *7.2.2.3. Caracterización bioquímica*

Se utilizaron 15 andamiajes de fibrina en los cuales se habían cultivado simultáneamente células estromales y células epiteliales. Además, se realizó la caracterización bioquímica de 15 andamiajes de conjuntiva descelularizada fijada con fibrina como control, los cuales no tenían células en su composición. Según el protocolo de preparación de muestras descrito en la sección 6.5.3.

### ETAPA 3

---

## 7.3. Diseño de la tercera generación de andamiajes de fibrina utilizando como base fibras obtenidas de la digestión enzimática de la conjuntiva descelularizada

### 7.3.1. Obtención de muestras

Se utilizaron 5 conjuntivas de la zona bulbar. Se sometieron al protocolo de descelularización A/B para posteriormente ser adaptadas a un tamaño de 10 mm x 3 mm. Las muestras se digirieron en 500 µl de solución de colagenasa (2 mg/ml) durante 24 horas. La solución resultante se centrifugó (centrífuga modelo 5427 R), se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 3 ml de MCF.

### 7.3.2. Protocolo de elaboración: Cocultivo de células conjuntivales en el andamiaje de fibrina elaborado con la solución obtenida tras la digestión de la conjuntiva descelularizada

Los andamiajes tridimensionales de la tercera generación, se elaboraron siguiendo el protocolo descrito en los andamiajes de la primera generación 6.2.1., añadiendo en su composición la solución resultante del proceso de digestión de la conjuntiva descelularizada (Tabla 22).

Tabla 22. Resumen de los componentes en la elaboración de los andamiajes de tercera generación.

	Biomaterial	MF	Densidad celular	Solución de digestión de conjuntiva descelularizada	Ácido Tranexámico	CaCl <sub>2</sub>
<b>Andamiaje de fibrina con base de PF de 1,5 mg/ml de fibrinógeno</b>	400 µl	420 µl	10.000 cél/ml	100 µl	40 µl	40 µl
<b>Andamiaje de fibrina con base de PF de 3 mg/ml de fibrinógeno</b>	800 µl	20 µl	10.000 cél/ml	100 µl	40 µl	40 µl
<b>Andamiaje de fibrina con base de CF de 1,5 mg/ml de fibrinógeno</b>	330 µl	490 µl	10.000 cél/ml	100 µl	40 µl	40 µl
<b>Andamiaje de fibrina con base de CF de 3 mg/ml de fibrinógeno</b>	660 µl	160 µl	10.000 cél/ml	100 µl	40 µl	40 µl

A día 0, se construyó el andamiaje con base de fibrina tal y como se ha indicado previamente incluyendo en su composición la solución de digestión de conjuntiva descelularizada, siendo la densidad de células estromales P5 en el interior de cada tipo de andamiaje de 10.000 células/ml. La formulación de volumen 1 ml se depositó en un *insert* específico para placa de cultivo de 24 pocillos. Los andamiajes se dejaron estabilizar en condiciones de cultivo estándar durante toda la noche.

Al día siguiente, se sembraron sobre la superficie del andamiaje células epiteliales a P5 una densidad de 25.000 células/ml utilizando MCE. Se añadió también el MCF para alimentar a las células estromales del interior de la matriz (Figura 112). Se realizaron 5 estudios y el número de réplicas para cada uno de los 4 tipos de andamiaje fue 6 para poder realizar la caracterización a nivel de sistema: una réplica para los estudios de histología, una réplica para el estudio de SEM, otra réplica para el estudio de viabilidad

celular y tres réplicas para la cuantificación proteica. Se elaboraron un total de 120 andamiajes.

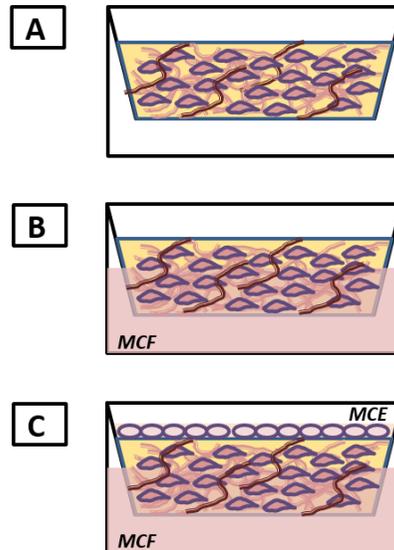


Figura 112. Cocultivo de los componentes celulares de la conjuntiva en el andamio de 3ª generación. (A) A día 0, las células estromales P5 se cultivaron en el interior del andamio de fibrina con fibras de conjuntiva descelularizada que se depositó en el inserto. (B) Al día siguiente se añadió MCF para alimentar a las células estromales. (C) Se sembraron las células epiteliales P5 sobre el andamio de fibrina y fibras de la conjuntiva descelularizada utilizando MCE.

#### 7.3.2.1. Estudios de histología

Tras 2 semanas de cultivo, los 20 andamiajes se recuperaron y se colocaron en cassettes de histología, previamente rotulados. El análisis histológico se realizó como se ha descrito en el apartado 6.2.2. Además de la tinción H-E, se realizó la tinción Tricrómico de Masson, descrita en el ANEXO II-Protocolo VIII, para la visualización de las fibras de colágeno.

#### 7.3.2.2. Estudios de microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para la visualización de la codistribución de las células estromales y las células epiteliales en el andamio de conjuntiva descelularizada se utilizó la técnica SEM. Se analizaron 20 muestras.

#### *7.3.2.3. Estudios de viabilidad celular Live/Dead*

Mediante microscopía confocal se realizaron reconstrucciones tridimensionales de la señal emitida por las cultivadas en los andamiajes de tercera generación.

Se utilizó la técnica de viabilidad celular Live/Dead, fundamento descrito en la sección 7.1.3.5., para la visualización de la codistribución de las células estromales y las células epiteliales en los andamiajes de fibrina de tercera generación a las 2 semanas de estudio. Se analizaron un total de 20 muestras.

#### *7.3.2.4. Caracterización bioquímica*

Se utilizaron 60 andamiajes de fibrina con fibras de conjuntiva descelularizada (n=15 de cada condición) en los cuales se habían cultivado simultáneamente células estromales y células epiteliales. Además, se realizó la caracterización bioquímica de 60 andamiajes de la tercera generación como control, los cuales no tenían células en su composición.

## VII- CAPÍTULO 3. RESULTADOS

### 7.4. Descripción de un protocolo de descelularización óptimo

Con el fin de realizar el análisis comparativo de los resultados obtenidos, se detallan conjuntamente los resultados correspondientes a la Etapa 1 y a la Etapa 2 del Capítulo III.

#### ETAPA I – ETAPA II

---

##### 7.4.1. Obtención y procesado de las muestras

Se analizaron un total de 15 muestras distribuidas en los tres grupos de estudio: conjuntiva en fresco (n=5), conjuntiva descelularizada (n=5) y conjuntiva recelularizada (n=5).

##### 7.4.2. Caracterización de las estructuras acelulares obtenidas

A continuación, se procede a la descripción de los resultados obtenidos por tipo de técnica aplicada.

###### 7.4.2.1. Estudios de histología

Mediante la técnica de tinción H-E, por la acción del colorante básico hematoxilina, se determinó la presencia de componente celular teñido de morado intenso; y la matriz extracelular teñida de rosa al contrastar con el colorante ácido eosina.

En el control, conjuntiva en fresco, se observó una elevada presencia de componente celular tanto en la capa estromal como en la superficie epitelial (Figura 113-A).

En la conjuntiva descelularizada con el protocolo de descelularización A/B, cabe destacar el estado de la matriz ampliamente estructurada y la escasa presencia de contenido celular (Figura 113-B).

En la conjuntiva recelularizada se observaron células de morfología fusiforme en la capa estromal y un estrato de entre 2 a 4 capas de células epiteliales en la superficie a las dos semanas de cultivo (Figura 113-C).

Con la tinción Tricrómico de Masson se detectó la presencia de fibras colágenas, teñidas de azul al contrastar con el colorante ácido. Por la acción del colorante básico hematoxilina, se determinó la presencia de componente celular teñido de morado intenso.

En el control, conjuntiva en fresco, se observó una elevada presencia de componente celular tanto en la capa estromal como en la superficie epitelial y una elevada presencia de fibras colágenas en el estroma (Figura 113-D).

En la conjuntiva descelularizada con el protocolo de descelularización A/B, la matriz apareció ampliamente estructurada con una elevada presencia de fibras colágenas en el estroma, y con escasa presencia de núcleos celulares (Figura 113-E).

En la conjuntiva recelularizada, a las 2 semanas de cultivo, se observaron células tanto en la capa estromal como en la superficie epitelial; así como fibras colágenas en la capa estromal (Figura 113-F).

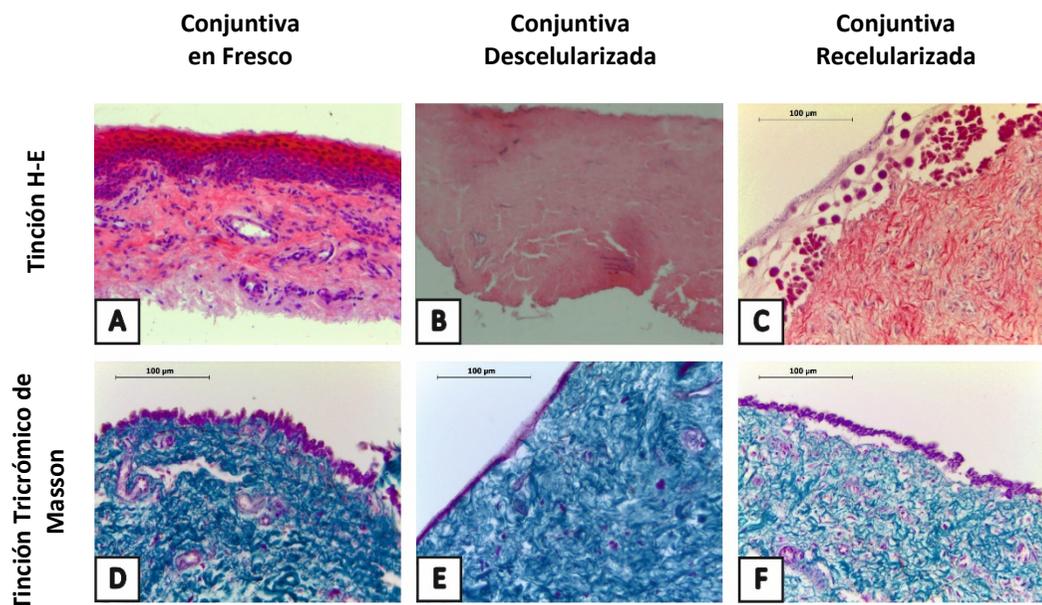


Figura 113. Comparación histológica de la conjuntiva en fresco (primera columna), conjuntiva descelularizada (segunda columna) y conjuntiva recelularizada (tercera columna). (A,B,C) Tinción Hematoxilina-Eosin. (D, E, F). Tinción Tricrómico de Masson. Visualizado a 40X en microscopio de campo claro; n=5.

#### 7.4.2.2. Estudios de microscopía electrónica de barrido (SEM)

La técnica SEM permitió la visualización de la microestructura de las diferentes muestras de estudio. Se analizaron un total de 15 imágenes.

La conjuntiva en fresco presentó una matriz completamente estructurada en la cual podían distinguirse células en su interior y también en su superficie (Figura 114-A).

Después de la aplicación del protocolo de descelularización A/B, no se evidenció ningún componente celular en la estructura ni restos celulares vinculados al proceso de eliminación celular. La disposición tridimensional de los componentes mayoritarios de las estructuras extracelulares, el colágeno y la elastina, se encontraron altamente conservados. Se puso de manifiesto un alto grado de conservación de la estructura tridimensional (Figura 114-B).

La conjuntiva recelularizada se caracterizó por el alto grado de conservación de la estructura tridimensional y por la perfecta integración del componente celular estromal en dicha estructura. También se pudo observar la capa de células epiteliales en la parte superficial (Figura 114-C).

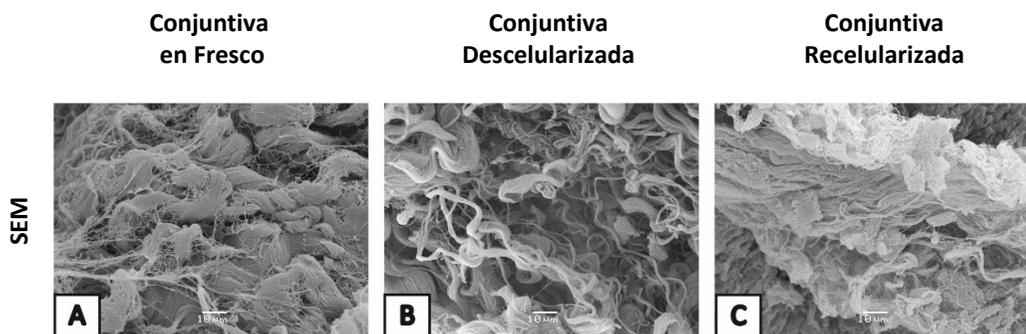


Figura 114. Comparación de la microestructura mediante la técnica SEM. (A) Conjuntiva en fresco. (B) Conjuntiva descelularizada. (C) Conjuntiva recelularizada. Visualizado a 1000 aumentos en microscopio de barrido; n=5.

### 7.4.2.3. Viabilidad celular AlamarBlue®

La determinación de viabilidad celular está basada en la actividad mitocondrial de las células, detectada mediante la técnica AlamarBlue®. El AlamarBlue® es un indicador de viabilidad celular, cuyo compuesto activo es la resazurina. La resazurina es un compuesto químico no tóxico, de color azul, permeable a las células y no fluorescente. Cuando en el tejido hay presencia de células metabólicamente activas, células viables, las enzimas mitocondriales reducen la resazurina a resorufina, un compuesto fluorescente de color rosa, que es fácilmente detectable y cuantificable.

En la Figura 115, se observa el máximo nivel de actividad celular en la conjuntiva en fresco a las 24 horas. Tal y como ocurrió en los andamiajes de fibrina del capítulo II al tratarse de estructuras tridimensionales, el AlamarBlue® necesita más tiempo para penetrar en el tejido.

Por el contrario, no se detectó fluorescencia para las muestras de conjuntiva descelularizada en ninguno de los tiempos de medición. Se determinó que, después de la aplicación del proceso de descelularización, no existieron restos celulares viables en la conjuntiva descelularizada.

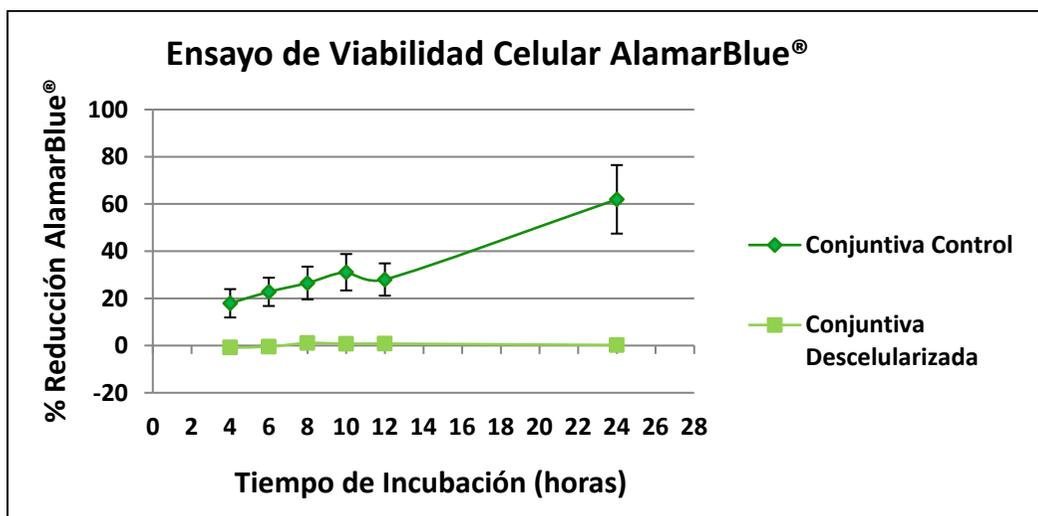


Figura 115. Viabilidad celular mediante la técnica AlamarBlue®. % Reducción de AlamarBlue® en función del tiempo de incubación; n=5.

#### 7.4.2.4. Valoración del estado de la matriz extracelular: estudio biomecánico

Se determinaron las propiedades biomecánicas de la conjuntiva tras la descelerización, comparándolas con la conjuntiva en fresco.

Se realizaron ensayos uniaxiales, para ello se sometió a tensión constante y se recopilaron los datos hasta la ruptura del tejido, generándose dos gráficas por muestra (Figura 116). Por un lado, la gráfica fuerza vs desplazamiento, donde se obtuvieron los datos de fuerza de rotura (N) y rigidez (N/mm), pendiente de la curva. Por otro lado, se obtuvo la gráfica tensión vs deformación, donde se consideró la fuerza por área, es decir, el grosor del tejido. Esta gráfica permitió obtener los datos de tensión de rotura (MPa) y el módulo elástico, o de Young (MPa), pendiente de la curva tensión vs deformación.

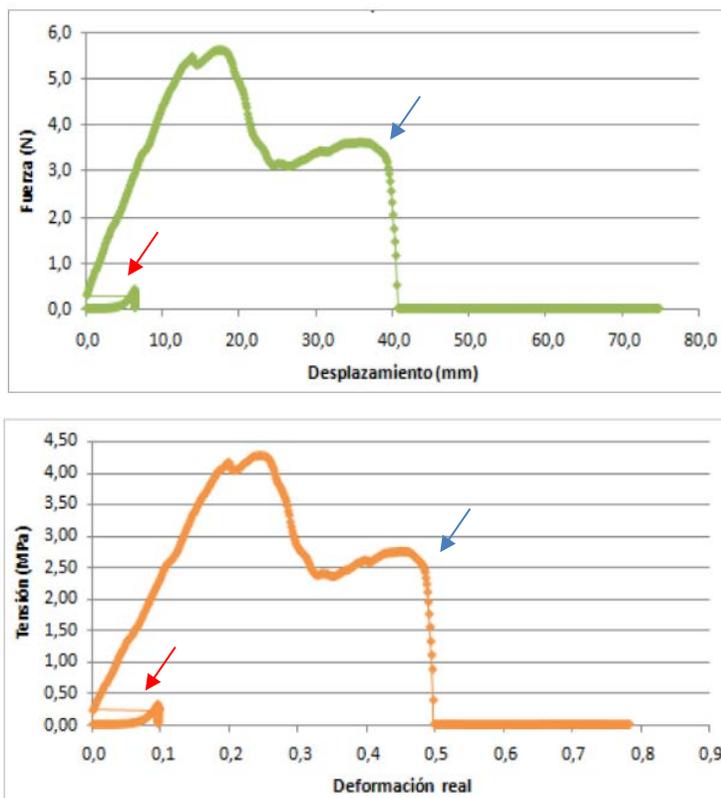


Figura 116. Ejemplo de gráficas obtenidas tras la realización del ensayo uniaxial. (A) Gráfica fuerza vs desplazamiento. (B) Gráfica tensión vs deformación. Se pudieron apreciar los datos obtenidos hasta precarga (flecha roja) y cuando se produjo la rotura del tejido (flecha azul).

RIGIDEZ. Los valores de fuerza de rotura fueron de  $6,66 \pm 3,12$  N para la conjuntiva en fresco, y de  $6,56 \pm 8,92$  N para la conjuntiva descelularizada.

Se obtuvieron los datos de rigidez a través de la fuerza. Se aplicó un análisis estadístico para el conjunto de datos y se realizó un análisis ANOVA para el factor Condición (Tabla 23). No se encontraron diferencias significativas entre la conjuntiva en fresco y la conjuntiva descelularizada (Figura 117).

Tabla 23. ANOVA para la rigidez con el factor Condición.

	GL	Valor F	P (>F)
Condición	1	0,292	0,6037
Residuos	8		

GL: Grados de libertad; P: Probabilidad.

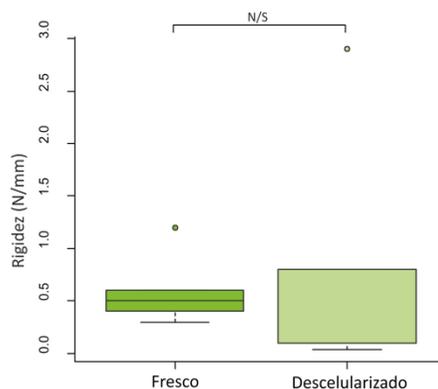


Figura 117. Representación en cajas y bigotes de la rigidez según el factor Condición. Valores obtenidos para la conjuntiva en fresco y la conjuntiva descelularizada. Los círculos se corresponden con valores atípicos. N/S: No significación; n=5.

MÓDULO ELÁSTICO. La obtención de los valores de fuerza (N) del tejido a lo largo de la realización del ensayo uniaxial, nos permitió considerar esa fuerza por unidad de superficie del tejido para la obtención de los datos de tensión. La tensión de rotura se produjo a los  $4,30 \pm 2,92$  MPa para la conjuntiva en Fresco y a los  $3,86 \pm 3,2$  MPa para la conjuntiva Descelularizada (Figura 118).

Se realizó una ANOVA sobre los datos obtenidos de módulo elástico en función de la condición (Tabla 24).

Tabla 24. ANOVA para el módulo elástico con el factor Condición.

	GL	Valor F	P (>F)
Condición	1	0,0741	0,7923
Residuos	8		

GL: Grados de libertad; P: Probabilidad.

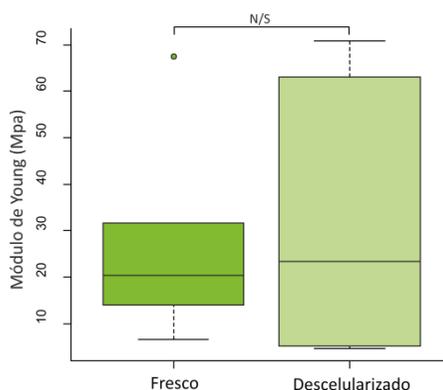


Figura 118. Representación en cajas y bigotes del módulo elástico según el factor Condición. Valores obtenidos para la conjuntiva en fresco y la conjuntiva descelularizada. Los círculos se corresponden con valores atípicos. N/S: No significación; n=5.

#### 7.4.2.5. Citotoxicidad del medio de descelularización

La tinción Live/Dead permitió discriminar colorimétricamente entre células vivas y muertas. Por una parte, la calceína mostró fluorescencia verde si existía actividad esterasa, es decir, si las células permanecían viables. Con la acción combinada del etidio, colorante incapaz de penetrar en células con la membrana plasmática intacta, se observó fluorescencia roja en las células muertas.

El DMSO produjo la muerte celular en el 100% de las células estromales (Figura 119-A) y el 100% de las células epiteliales (Figura 119-D).

Las muestras que se mantuvieron en cultivo durante 14 días con su medio de cultivo específico, presentaron un 100% de viabilidad: células estromales (Figura 119-B) y células epiteliales (Figura 119-E).

En las muestras de células estromales que se mantuvieron los 14 días con una mezcla de MF y la solución de lavado tras la aplicación del protocolo de descelularización (1:1), se observó una viabilidad de un 99,26 % (Figura 119-C).

En el caso de las células epiteliales a los 14 días en cultivo con una mezcla de ME y la solución de lavado tras la aplicación del protocolo de descelularización (1:1), se observó una viabilidad de un 93,98 % (Figura 119-F).

Se consideró que los restos de la solución de descelularización presentes tras el lavado de las muestras, no presentaron citotoxicidad sobre los dos componentes celulares de la conjuntiva.

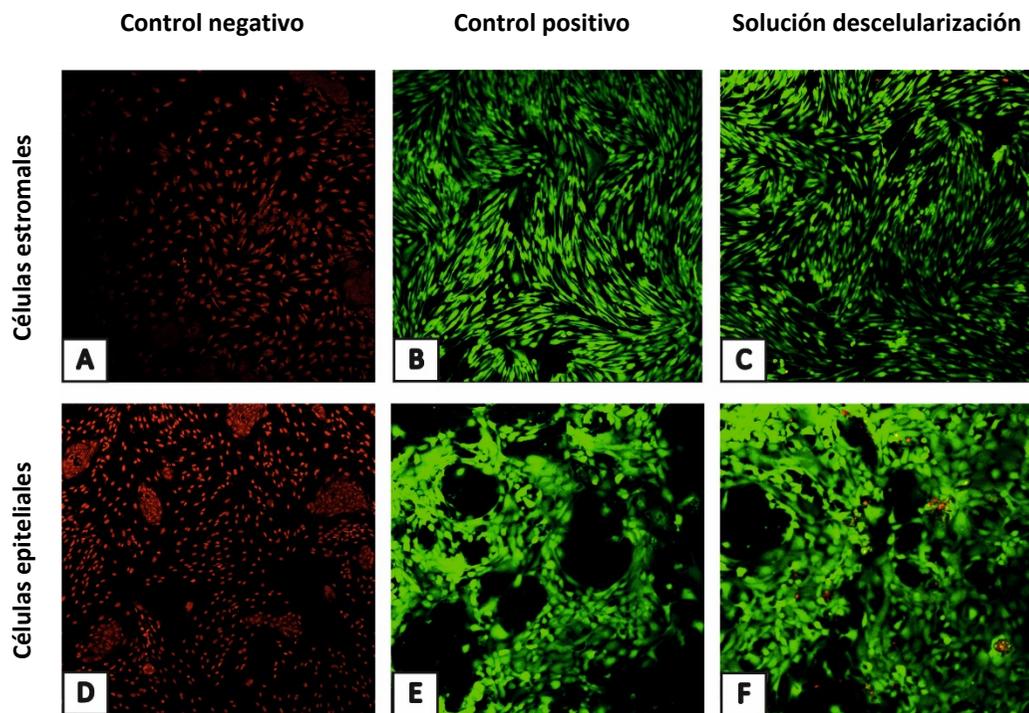


Figura 119. Resultados del ensayo de citotoxicidad sobre los componentes celulares de la conjuntiva. (A, B, C) Células estromales. (D, E, F) Células epiteliales. Visualizado a 10X en un microscopio de fluorescencia, n=5.

#### 7.4.2.6. Valoración del estado de la matriz extracelular: estudio bioquímico

Se realizó la cuantificación de las principales proteínas constituyentes de la matriz extracelular: colágeno, elastina y GAG. La comparación se realizó entre la conjuntiva en fresco, la conjuntiva descelularizada y la conjuntiva recelularizada.

Se analizaron los valores de absorbancia obtenidos tras la extracción con los diferentes kits comerciales. Para la detección del colágeno se utilizó el kit Sircol, la determinación de elastina se realizó mediando el kit Fastin y para la detección de glicosaminoglicanos se utilizó el kit Blyscan. Se aplicó un análisis estadístico en base al modelo lineal generalizado.

##### 7.4.2.6.1. Detección de colágeno

Se detectó la presencia de colágeno utilizando el kit comercial Sircol, obteniéndose una reacción colorimétrica de tonalidad rojiza. Se analizaron los valores de absorbancia y se aplicó un análisis estadístico en base al modelo lineal generalizado (Figura 120).

En el análisis ANOVA se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0,001$ ) entre la conjuntiva recelularizada y la conjuntiva en fresco y la conjuntiva descelularizada (Tabla 25). Los niveles de colágeno tan elevados en la conjuntiva recelularizada muestran que las células no sólo han sido capaces de integrarse en la estructura, sino también de seguir produciendo las proteínas propias de la matriz extracelular.

Tabla 25. ANOVA para la concentración de colágeno con el factor Condición.

	GL	Valor F	P (>F)
Condición	2	15,534	0,0004679 ***
Residuos	12		

GL: Grados de libertad; P: Probabilidad. \*\*\* $p \leq 0,001$ .

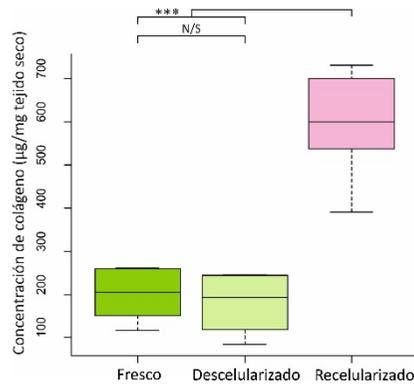


Figura 120. Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno en la conjuntiva en fresco, la conjuntiva descelularizada y la conjuntiva recelularizada. \*\*\* $p \leq 0,001$ ; N/S: No significación;  $n=5$ .

#### 7.4.2.6.2. Detección de elastina

El contenido de elastina se determinó utilizando el kit comercial Fastin, obteniéndose una reacción colorimétrica de tonalidad amarilla. Se analizaron los valores de absorbancia y se aplicó un análisis estadístico en base al modelo lineal generalizado (Figura 121).

En el análisis ANOVA no se encontraron diferencias significativas entre la conjuntiva en fresco, la conjuntiva descelularizada y la conjuntiva recelularizada (Tabla 26). Los niveles de elastina fueron más altos en la conjuntiva recelularizada.

Tabla 26. ANOVA para la concentración de elastina con el factor Condición.

	GL	Valor F	P (>F)
Condición	2	1,9144	0,1898
Residuos	12		

GL: Grados de libertad; P: Probabilidad. \*\*\* $p \leq 0,001$ ; N/S: No significación

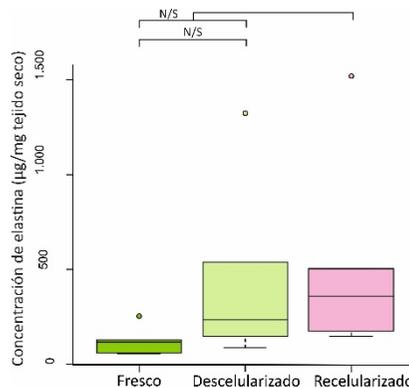


Figura 121. Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina en la conjuntiva en fresco, la conjuntiva descelularizada y la conjuntiva recelularizada. N/S: No significación; n=5.

#### 7.4.2.6.3. Detección de GAG

Se detectó la presencia de glicosaminoglicanos utilizando el kit comercial Fastin, obteniéndose una reacción colorimétrica de tonalidad azulada. Se analizaron los valores de absorbancia y se aplicó un análisis estadístico en base al modelo lineal generalizado (Figura 122).

En el análisis ANOVA se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre la conjuntiva descelularizada y la conjuntiva en fresco y la conjuntiva recelularizada (Tabla 27). Los niveles de glicosaminoglicanos disminuyeron después de la aplicación del proceso de descelularización, debido a la eliminación del componente celular.

Tabla 27. ANOVA para la concentración de colágeno con el factor Condición.

	GL	Valor F	P (>F)
Condición	2	8,438	0,005151 **
Residuos	12		

GL: Grados de libertad; P: Probabilidad. \*\* $p \leq 0,01$ .

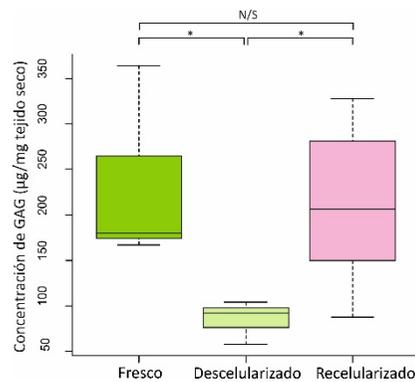


Figura 122. Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG en la conjuntiva en fresco, la conjuntiva descelularizada y la conjuntiva recelularizada. \* $p \leq 0,05$ ; N/S: No significación;  $n=5$ .

#### 7.4.2.7. Inmunohistoquímica

Mediante tinciones inmunohistoquímicas, se comprobó la naturaleza de las poblaciones celulares. Las células presentes en la capa estromal fueron positivas para el marcador vimentina: en la conjuntiva en fresco se apreció un gran número de células positivas (Figura 123-A), en la conjuntiva descelularizada la positividad fue claramente menor (Figura 123-B) y en la conjuntiva recelularizada las células presentes en el estroma presentaron una elevada positividad para el marcador vimentina (Figura 123-C).

El análisis de las tinciones con el marcador pancitoqueratina, específico de células epiteliales, determinó elevada positividad tanto en la conjuntiva en fresco (Figura 123-D) como en la conjuntiva recelularizada (Figura 123-F); en cambio, en la conjuntiva descelularizada, no se detectó positividad para este marcador (Figura 123-E).

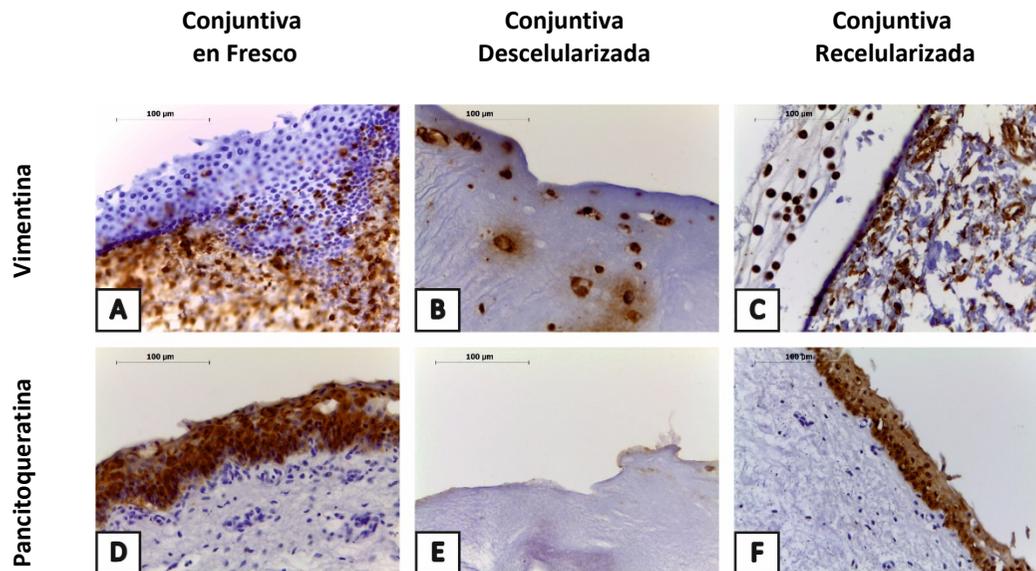


Figura 123. Comparación inmunohistoquímica de la conjuntiva en fresco (primera columna), conjuntiva descelularizada (segunda columna) y conjuntiva recelularizada (tercera columna). (A, B, C) Tinción Vimentina. (D, E, F) Tinción Pancitoqueratina. Visualizado a 40X en microscopio de campo claro; n=5.

### ETAPA III

## 7.5. Cocultivo de células conjuntivales en el andamiaje de fibrina elaborado con la solución obtenida tras la digestión de la conjuntiva descelularizada

### 7.5.1. Estudios de histología

En el estudio cocultivo, el análisis histológico de los andamiajes de fibrina de tercera generación mediante tinción H-E a las dos semanas de cultivo, determinó que las células epiteliales fueron capaces de establecer un epitelio estratificado sobre la superficie de los andamiajes y las células estromales de distribuirse en el interior del andamiaje (Figura 124). Se analizaron 20 muestras.

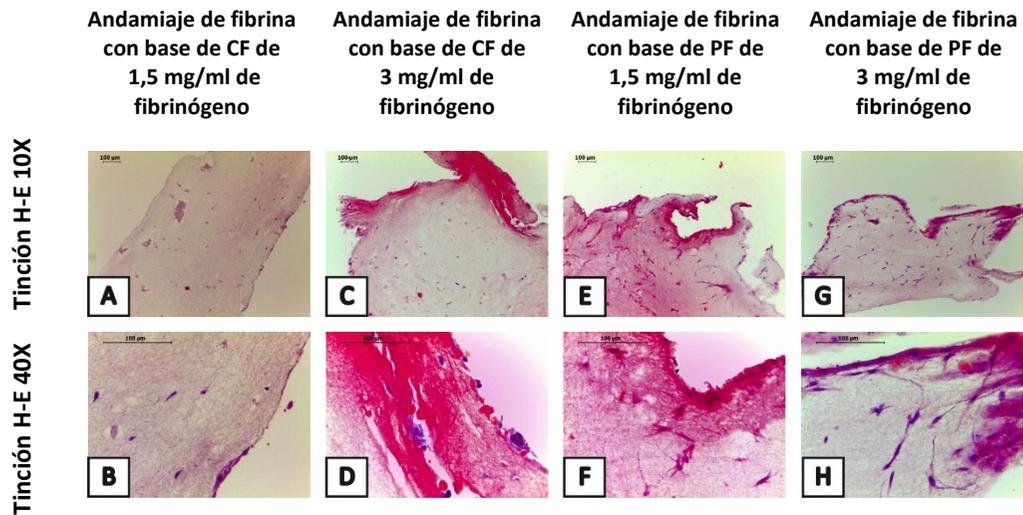


Figura 124. Análisis de la morfología celular mediante tinción H-E de los andamiajes de tercera generación que contienen células estromales en el interior y células epiteliales en la superficie. (A,B) Crioprecipitado de plasma fresco 1,5 mg/ml. (C,D) Crioprecipitado de plasma fresco 3 mg/ml. (E,F) Plasma fresco 1,5 mg/ml. (G,H) Plasma fresco 3 mg/ml. (A,C,E,G) 10X. (B,D,F,H) 40X.

### 7.5.2. Estudios de microscopía electrónica de barrido (SEM)

Mediante microscopía electrónica de barrido se detectó la integración de las células estromales en el interior de los andamiajes de fibrina de primera generación con crioprecipitado de plasma fresco en su composición (Figura 125-A,B,C,D) y también con plasma fresco (Figura 125-E,F,G,H). También se observó la morfología de las células epiteliales en la superficie. Se analizaron 20 muestras.

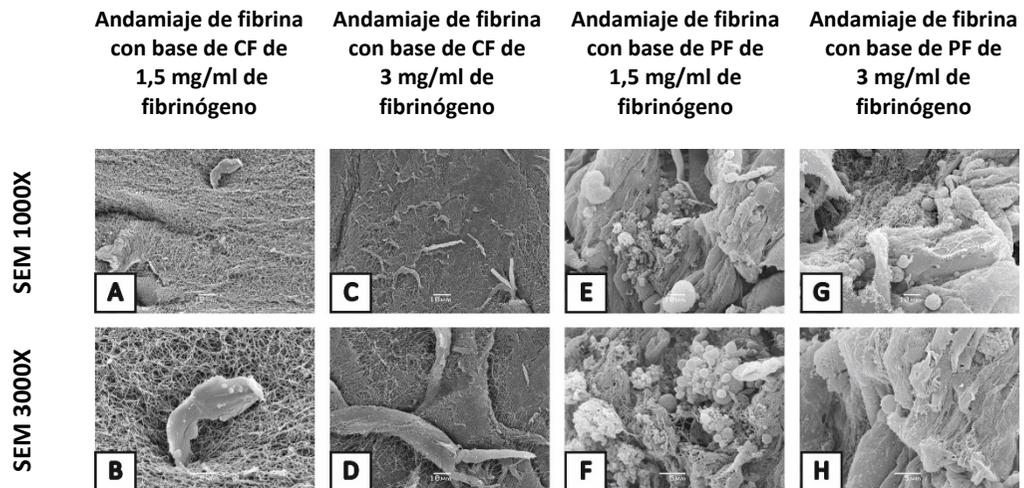


Figura 125. Análisis de la distribución celular mediante la técnica microscopía electrónica de barrido de los andamiajes de tercera generación que contienen células estromales en el interior y células epiteliales en la superficie. (A) Crioprecipitado de plasma fresco 1,5 mg/ml. (B) Crioprecipitado de plasma fresco 3 mg/ml. (C) Plasma fresco 1,5 mg/ml. (D) Plasma fresco 3 mg/ml. (A,C,E,G) 1000X. (B,D,F,H) 3000X.

### 7.5.3. Estudios de viabilidad celular Live/Dead

Mediante microscopía confocal y, empleando como marcadores calceína AM y homodímero de etidio, se valoró la distribución uniforme de las células en el interior del andamiaje y en la superficie a las dos semanas de cultivo. También se valoró la variable viabilidad celular contabilizándose células vivas (color verde) y células muertas (color rojo).

En la Figura 126 se observa una distribución uniforme de las células estromales en el interior de los andamiajes de fibrina de tercera generación, independientemente del biomaterial y de la concentración de fibrinógeno. Además, el análisis mediante microscopía confocal permitió distinguir la morfología poligonal de las células epiteliales en la superficie del andamiaje (Figura 126-A) así como la morfología fibroblástica de las células estromales en el interior de los andamiajes de fibrina de tercera generación.

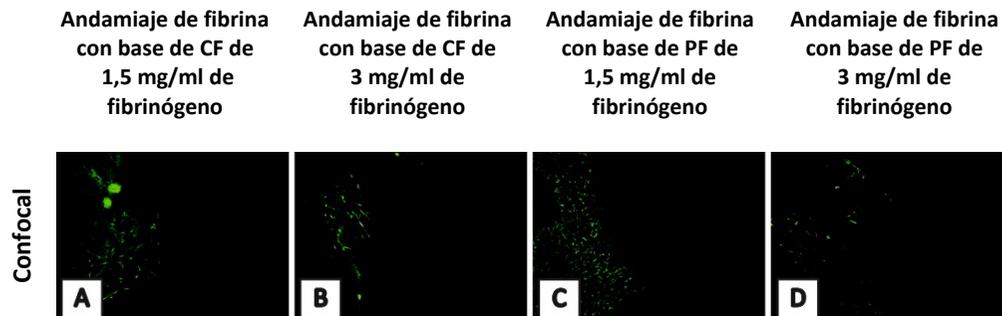


Figura 126. Análisis de la viabilidad celular mediante la técnica Live/Dead de los andamiajes de tercera generación que contienen células estromales en el interior y células epiteliales en la superficie. (A) Crioprecipitado de plasma fresco 1,5 mg/ml. (B) Crioprecipitado de plasma fresco 3 mg/ml. (C) Plasma fresco 1,5 mg/ml. (D) Plasma fresco 3 mg/ml.

#### 7.5.4. Estudios de inmunohistoquímica

El análisis inmunohistoquímico mediante el marcador vimentina permitió detectar la presencia de células estromales en el interior de los andamiajes de fibrina de tercera generación (Figura 127). Se confirmó la presencia de este marcador específico de células estromales, tanto en los andamiajes de fibrina con base de crioprecipitado de plasma fresco como en los andamiajes de fibrina con base de plasma fresco.

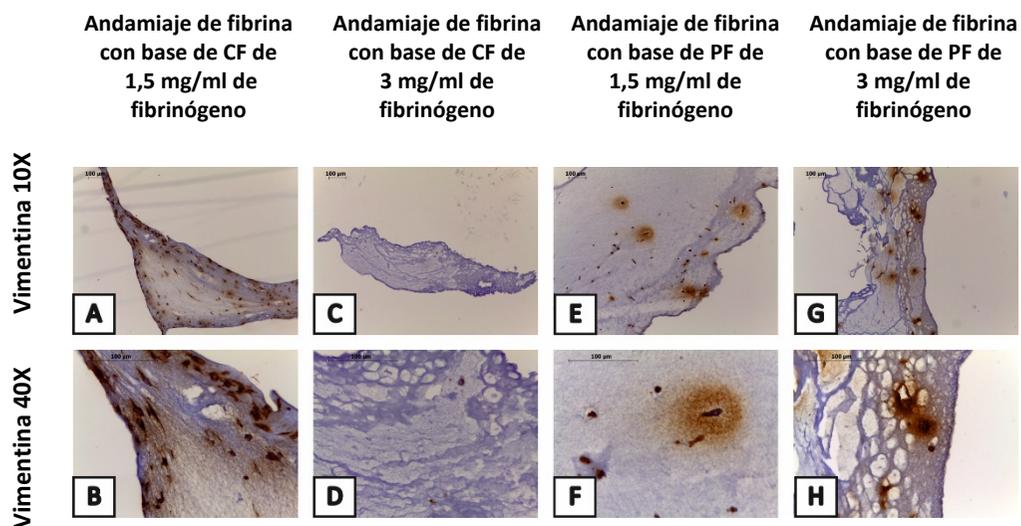


Figura 127. Análisis fenotípico mediante tinción inmunohistoquímica de vimentina de células estromales en el interior de andamiajes de fibrina de tercera generación. (A,B) Crioprecipitado de plasma fresco 1,5 mg/ml. (C,D) Crioprecipitado de plasma fresco 3 mg/ml. (E,F) Plasma fresco 1,5 mg/ml. (G,H) Plasma fresco 3 mg/ml. (A,C,E,G) 10X. (B,D,F,H) 40X.

El análisis inmunohistoquímico mediante el marcador pancitoqueratina no permitió detectar la presencia de células epiteliales en la superficie de los andamiajes de fibrina de tercera generación (Figura 128). En los andamiajes de fibrina con base de crioprecipitado de plasma fresco como en los andamiajes de fibrina con base de plasma fresco no se confirmó la presencia de este marcador específico de células epiteliales.

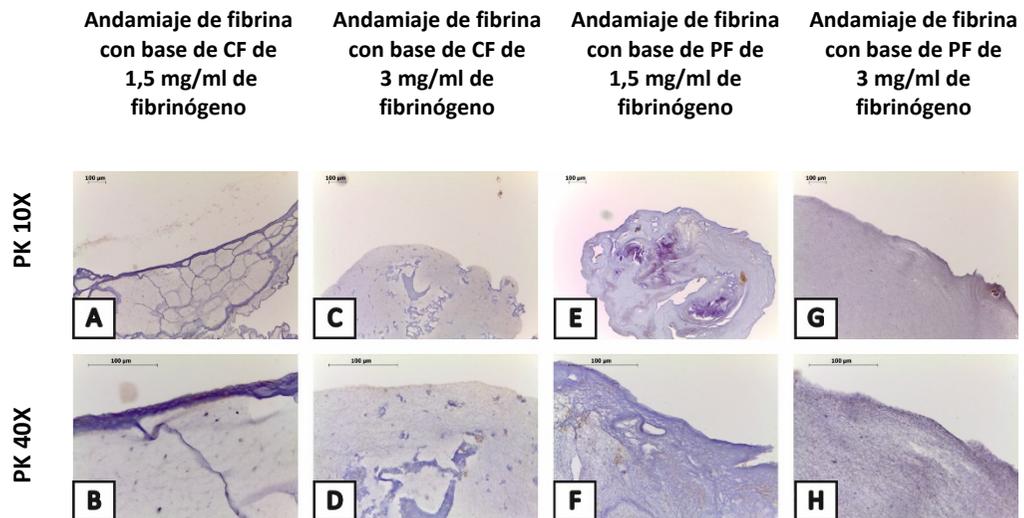


Figura 128. Análisis fenotípico mediante tinción inmunohistoquímica de pancitoqueratina de células epiteliales sobre andamiajes de fibrina de tercera generación. (A,B) Crioprecipitado de plasma fresco 1,5 mg/ml. (C,D) Crioprecipitado de plasma fresco 3 mg/ml. (E,F) Plasma fresco 1,5 mg/ml. (G,H) Plasma fresco 3 mg/ml. (A,C,E,G) 10X. (B,D,F,H) 40X.

### 7.5.5. Caracterización bioquímica

#### 7.5.5.1. Detección de colágeno

Se detectó la presencia de colágeno usando el kit comercial Sircol, obteniéndose una reacción colorimétrica de tonalidad rojiza. Se analizaron los valores de absorbancia y se aplicó un análisis estadístico en base al modelo lineal generalizado (Figura 129).

En el análisis ANOVA se encontraron diferencias significativas para el factor Estudio ( $p \leq 0,001$ ), pero no para los factores Biomaterial y Concentración (Tabla 28). El test de Tukey mostró diferencias significativas ( $p \leq 0,01$ ) entre cocultivo y control.

Tabla 28. ANOVA de los factores Estudio, Biomaterial y Concentración en el análisis global de los datos.

	GL	Valor F	P (>F)	
Estudio	1	11,7423	0,001544	**
Biomaterial	1	1,0834	0,304883	
Concentración	1	1,4215	0,240956	
Residuos	36			

GL: Grados de libertad; P: Probabilidad. \*\* $p \leq 0,01$ .

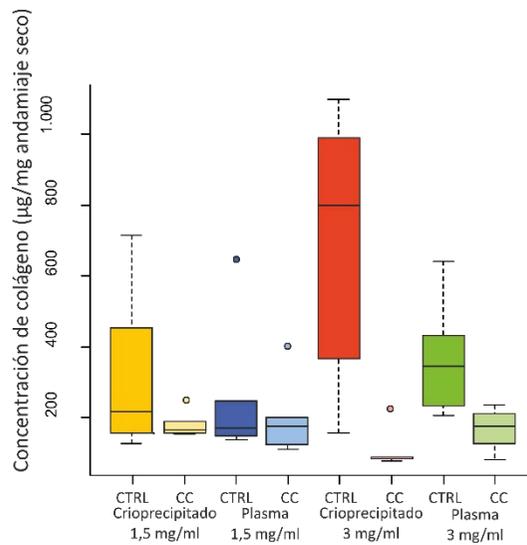


Figura 129. Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno en función del tipo de Estudio, Biomaterial y Concentración de fibrinógeno. CTRL (Control), CC (Cocultivo).  $n=5$

ESTUDIO. Los resultados mostraron diferencias muy significativas ( $p \leq 0,001$ ) entre Control y Cocultivo (Figura 130). Esto indicó que el contenido de colágeno por miligramo (mg) de muestra analizada disminuyó al cultivar células en el andamiaje.

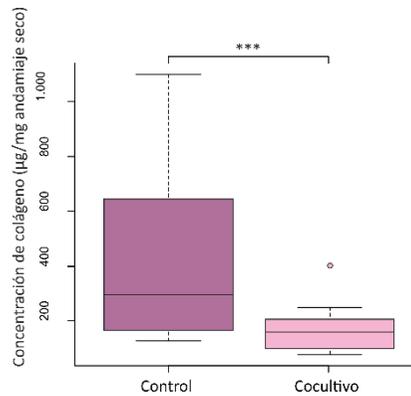


Figura 130. Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno en función del tipo de Estudio. El contenido de colágeno fue significativamente elevado en los andamiajes control. Los círculos se corresponden con valores atípicos. \*\*\* $p \leq 0,001$ ;  $n=5$ .

BIOMATERIAL. Según se muestra en la Figura 131, no existieron diferencias en función del biomaterial utilizado para la elaboración del andamiaje.

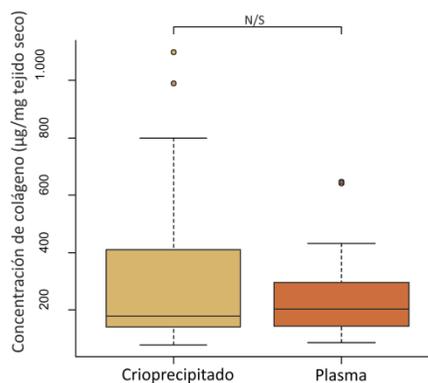


Figura 131. Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno en función del tipo de Biomaterial. El contenido de colágeno fue similar en los andamiajes de composición Crioprecipitado y en los de composición Plasma. Los círculos se corresponden con valores atípicos. N/S: No significación;  $n=5$ .

CONCENTRACIÓN. Este factor, según se muestra en la Figura 132, no tuvo influencia sobre el valor de la concentración de colágeno. Esto indicó que la concentración de fibrinógeno en los andamiajes tridimensionales no afectó a la concentración de colágeno.

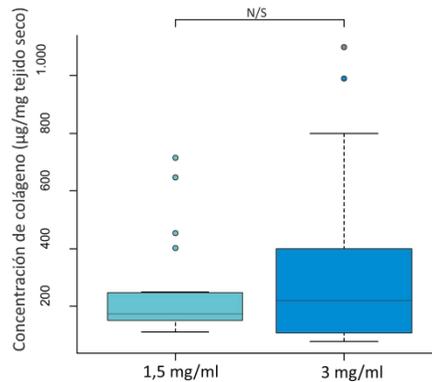


Figura 132. Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno en función de la Concentración de fibrinógeno. El contenido de colágeno fue similar en los andamiajes de concentración 1,5 mg/ml y 3 mg/ml de fibrinógeno. Los círculos se corresponden con valores atípicos. N/S: No significación; n=5.

#### ANÁLISIS INDIVIDUALIZADO EN FUNCIÓN DEL ESTUDIO

En este apartado se realizó un análisis estadístico separando los datos en función del Estudio: Control y Cocultivo. Analizando en cada grupo la influencia del factor Biomaterial y Concentración sobre el contenido de colágeno en los andamiajes. En el Estudio Control, el resultado de la ANOVA no mostró diferencias significativas para ambos factores.

Para el conjunto de datos seleccionados en el Estudio Cocultivo, después de realizar la ANOVA sobre el modelo lineal generalizado de dos factores no se detectaron diferencias significativas para los factores Biomaterial y Concentración.

## ANÁLISIS INDIVIDUALIZADO EN FUNCIÓN DEL BIOMATERIAL

En este apartado se realizó un análisis estadístico separando los datos en función del Biomaterial: Crioprecipitado y Plasma. Analizando en cada grupo la influencia del factor Estudio y Concentración sobre el contenido de colágeno en los andamiajes. Los resultados de las dos ANOVA, solo mostraron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) para el factor Estudio en el Biomaterial Crioprecipitado (Figura 133-A). En este caso, el cultivo de células en el andamio, contribuyó a la pérdida de colágeno en su estructura. Por el contrario, cuando el biomaterial utilizado fue Plasma, no afectó al contenido de colágeno en el andamio (Figura 133-B). Tampoco afectó a la concentración de colágeno la Concentración de fibrinógeno del biomaterial.

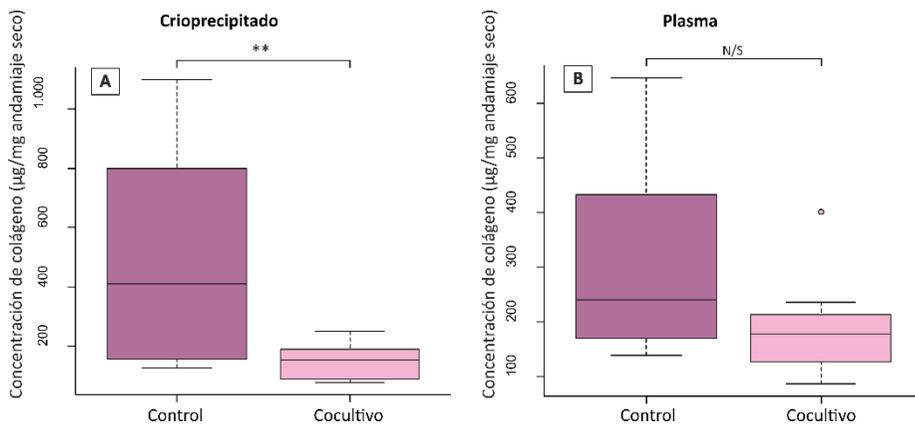


Figura 133. Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno en el Biomaterial Crioprecipitado y Plasma según el Estudio. (A) Concentración de colágeno en el Biomaterial Crioprecipitado dependiendo del Estudio. (B) Concentración de colágeno en el Biomaterial Plasma dependiendo del Estudio. \* $p \leq 0,05$ ; N/S: No significación;  $n=5$ . Nótese la diferencia de escala.

## ANÁLISIS INDIVIDUALIZADO EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN

En este apartado se realizó un análisis estadístico separando los datos en función de la Concentración de fibrinógeno: 1,5 mg/ml y 3 mg/ml.

Para el conjunto de datos seleccionados de la concentración 1,5 mg/ml, después de realizar la ANOVA sobre el modelo lineal generalizado de dos factores, Estudio (Figura 134-A) y Biomaterial, no se observaron diferencias significativas.

Se seleccionaron los datos referentes a la concentración de fibrinógeno 3 mg/ml y después de realizar la ANOVA sobre el modelo lineal generalizado de dos factores, se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0,01$ ) para el factor Estudio y no se detectaron diferencias significativas para el factor Biomaterial ( $p = 0,286904$ ).

Después de realizar el test de Tukey, se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0,01$ ) entre Control y Cocultivo (Figura 134-B). Disminuyendo la concentración de colágeno cuando se cultivaban células en el interior del andamiaje.

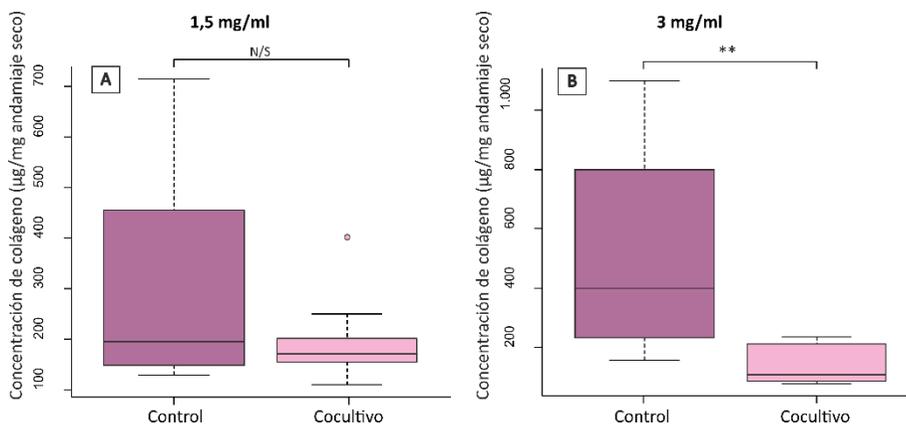


Figura 134. Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno a la Concentración de fibrinógeno 1,5 mg/ml y 3 mg/ml según el Estudio. (A) Concentración de colágeno dependiendo del Estudio a la Concentración de fibrinógeno 1,5 mg/ml. (B) Concentración de colágeno dependiendo del Estudio a la Concentración de fibrinógeno 3 mg/ml. Los círculos se corresponden con valores atípicos.  $**p \leq 0,01$ ; N/S: No significación;  $n=5$ . Nótese la diferencia de escala.

### 7.5.5.2. Detección de elastina

La presencia de elastina se detectó utilizando el kit comercial Fastin, obteniéndose una reacción colorimétrica de tonalidad amarilla. Se analizaron los valores de absorbancia aplicando un análisis estadístico en base al modelo lineal generalizado (Figura 135).

En el análisis ANOVA no se detectaron diferencias significativas para los factores analizados: Estudio, Biomaterial y Concentración (Tabla 29).

Tabla 29. ANOVA de los factores Estudio, Biomaterial y Concentración en el análisis global de los datos

	GL	Valor F	P (>F)
Estudio	1	0,6206	0,4360
Biomaterial	1	0,1076	0,7448
Concentración	1	0,5616	0,4585
Residuos	36		

GL: Grados de libertad; P: Probabilidad.

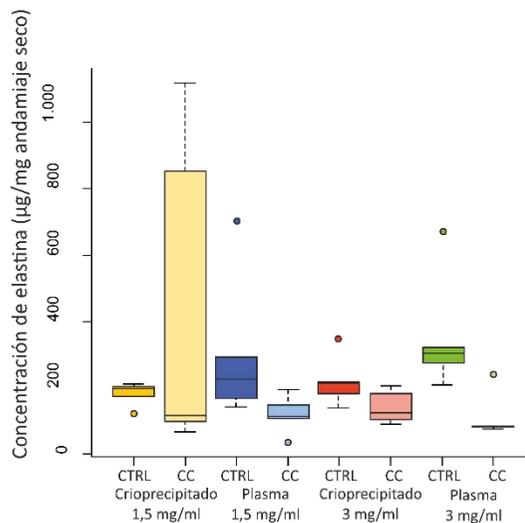


Figura 135. Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina en función del tipo de Estudio, Biomaterial y Concentración de fibrinógeno. Los resultados del análisis muestran un patrón claro en la distribución de la concentración de elastina en función del tipo de Estudio. La concentración de elastina fue mayor cuando no se cultivaban células en el andamiaje, Estudio Control. Los círculos se corresponden con valores atípicos. CTRL (Control), CC (Cocultivo). n=5.

A continuación, se detallan los resultados obtenidos por factor de análisis.

ESTUDIO. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre Control y Cocultivo (Figura 136). Esto indicó que el contenido de elastina por miligramo (mg) de muestra analizada no varía al cultivar células en el andamiaje.

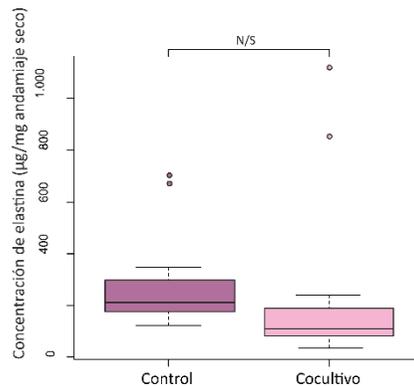


Figura 136. Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina en función del tipo de Estudio. Los círculos se corresponden con valores atípicos. N/S: No significación; n=5.

BIOMATERIAL. Según se muestra en la Figura 137, no existieron diferencias en función del Biomaterial utilizado para la elaboración del andamiaje. El contenido de elastina fue similar en los andamiajes de composición Crioprecipitado y en los de composición Plasma.

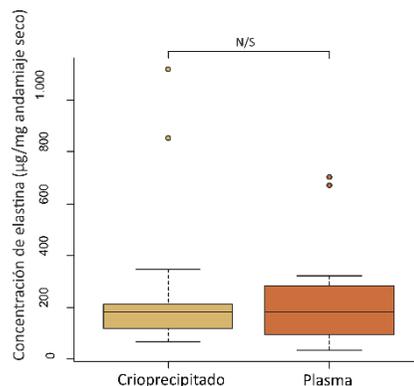


Figura 137. Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina en función del tipo de Biomaterial. Los círculos se corresponden con valores atípicos. N/S: No significación; n=5.

**CONCENTRACIÓN.** Este factor, según se muestra en la Figura 138, no tuvo influencia sobre el valor de la concentración de elastina. El contenido de elastina fue similar en los andamiajes de concentración de fibrinógeno 1,5 mg/ml y 3 mg/ml.

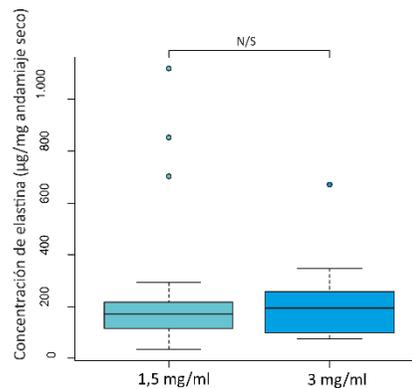


Figura 138. Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina en función de la Concentración de fibrinógeno. Los círculos se corresponden con valores atípicos. N/S: No significación; n=5.

Una vez realizado el análisis general de los datos, se realizó un análisis individualizado en función de los diferentes factores a analizar: Estudio, Biomaterial y Concentración de fibrinógeno.

#### ANÁLISIS INDIVIDUALIZADO EN FUNCIÓN DEL ESTUDIO

Se realizó un análisis estadístico separando los datos en función del Estudio: Control y Cocultivo. Analizando en cada grupo la influencia del factor Biomaterial y Concentración sobre el contenido de elastina en los andamiajes. Para el conjunto de datos seleccionados en el Estudio Control, después de realizar la ANOVA sobre el modelo lineal generalizado del factor Biomaterial y Concentración, no se detectaron diferencias significativas.

En el Estudio Cocultivo, el resultado de la ANOVA tampoco mostro diferencias significativas para ambos factores.

## ANÁLISIS INDIVIDUALIZADO EN FUNCIÓN DEL BIOMATERIAL

En este apartado se realizó un análisis estadístico separando los datos en función del Biomaterial: Crioprecipitado y Plasma.

En el análisis realizado sólo con los datos de Crioprecipitado se consideraron dos factores: Estudio y Concentración. Los resultados de la ANOVA no mostraron la existencia de diferencias significativas para ninguno de los factores (Figura 139-A)

Cuando se seleccionaron solamente los datos referentes al Biomaterial Plasma y se realizó la ANOVA sobre el modelo lineal generalizado con los dos factores que pudieron afectar en la concentración de elastina, se evidenció la existencia de diferencias significativas para el factor Estudio ( $p \leq 0,01$ ). El contenido de elastina disminuyó cuando se cultivaron células en el andamiaje (Figura 139-B).

En ambos casos, se confirmó que la concentración de fibrinógeno no influyó en la concentración de elastina.

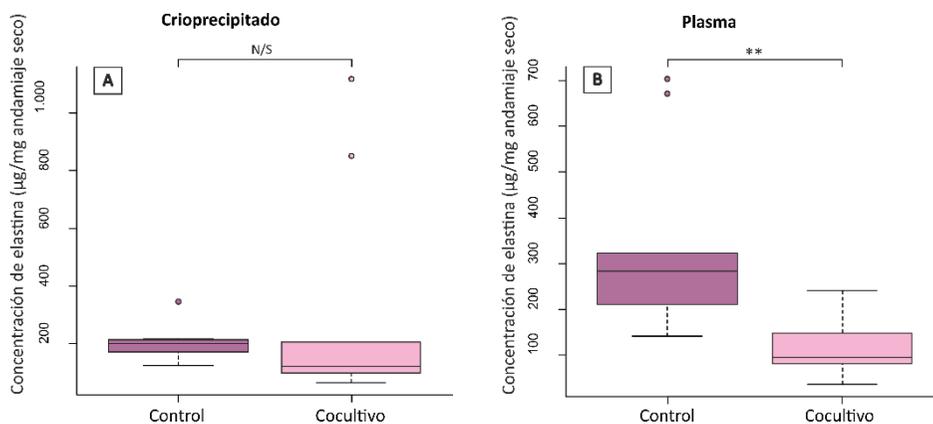


Figura 139. Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina en el Biomaterial Crioprecipitado y Plasma según el Estudio. (A) Concentración de elastina en el Biomaterial Crioprecipitado según el Estudio. (B) Concentración de elastina en el biomaterial Plasma según el estudio. N/S: No significación; n=5. Nótese la diferencia de escala.

## ANÁLISIS INDIVIDUALIZADO EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN

En este apartado se realizó un análisis estadístico separando los datos en función de la Concentración de fibrinógeno: 1,5 mg/ml y 3 mg/ml. Analizando en cada grupo la influencia del factor Estudio y Biomaterial sobre el contenido de elastina en los andamiajes

Para los datos seleccionados de la concentración 1,5 mg/ml, después de realizar la ANOVA sobre el modelo lineal generalizado de dos factores, no se detectaron diferencias significativas (Figura 140-A).

Para la concentración de fibrinógeno 3 mg/ml, se realizó una ANOVA sobre el modelo lineal generalizado con los dos factores que pudieron afectar a la concentración de elastina. Para el factor Estudio se detectaron diferencias significativas al hacer el test de Tukey entre sus grupos ( $p \leq 0,01$ ), siendo mayor la concentración de elastina cuando no había células en el andamio (Figura 140-B). Por el contrario, el análisis del factor Biomaterial nos mostró que los diferentes orígenes de la fibrina no influyeron en la concentración de elastina.

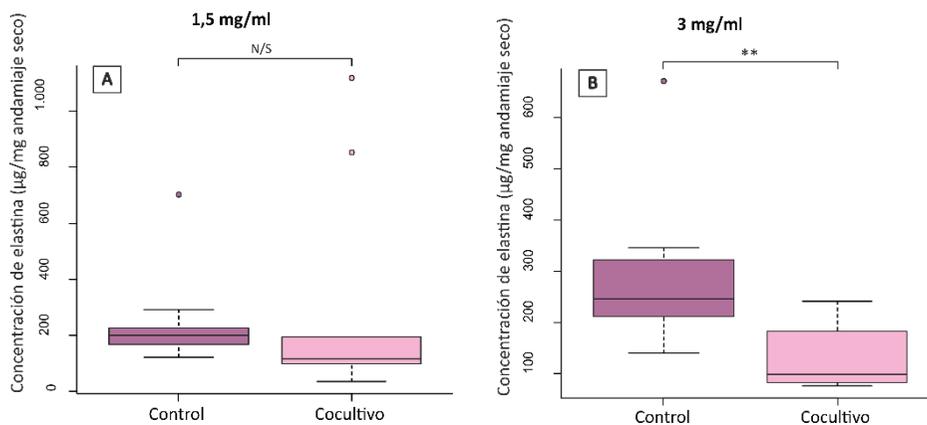


Figura 140. Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina a la Concentración de Fibrinógeno 1,5 mg/ml y 3 mg/ml en función del estudio Estudio. (A) Concentración de elastina a la concentración de fibrinógeno 1,5 mg/ml según el Estudio. (B) Concentración de elastina a la concentración de fibrinógeno 3 mg/ml según el Estudio. \*\* $p \leq 0,01$ ; N/S: No significación;  $n=5$ . Nótese la diferencia de escala.

### 7.5.5.3. Detección de GAG

La presencia de GAG se detectó utilizando el kit comercial Blyscan, obteniéndose una reacción colorimétrica de tonalidad azulada. Se analizaron los valores de absorbancia aplicando un análisis estadístico en base al modelo lineal generalizado.

En el análisis ANOVA se detectaron diferencias significativas para el factor Estudio ( $p \leq 0,001$ ) y para el factor Biomaterial ( $p \leq 0,01$ ) (Tabla 30). En cuanto al factor Concentración no hubo diferencias en la concentración de GAG cuando la concentración de fibrinógeno era de 1,5 mg/ml o de 3 mg/ml (Figura 141). El test de Tukey mostró diferencias significativas ( $p \leq 0,001$ ) entre el Estudio Control y Cocultivo (Figura 142). La concentración de GAG fue significativamente mayor en el Estudio Cocultivo debido a la presencia de células secretoras de mucinas en su superficie. El test de Tukey del factor Concentración desveló que no hubo diferencias entre 1,5 mg/ml de fibrinógeno y 3 mg/ml de fibrinógeno en los andamiajes.

Tabla 30. ANOVA de los factores Estudio, Biomaterial y Concentración en el análisis global de los datos.

	GL	Valor F	P (>F)	
Estudio	1	14,6462	0,0004978	***
Biomaterial	1	8,1858	0,0069886	**
Concentración	1	1,3688	0,2497095	
Residuos	36			

GL: Grados de libertad; P: Probabilidad. \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

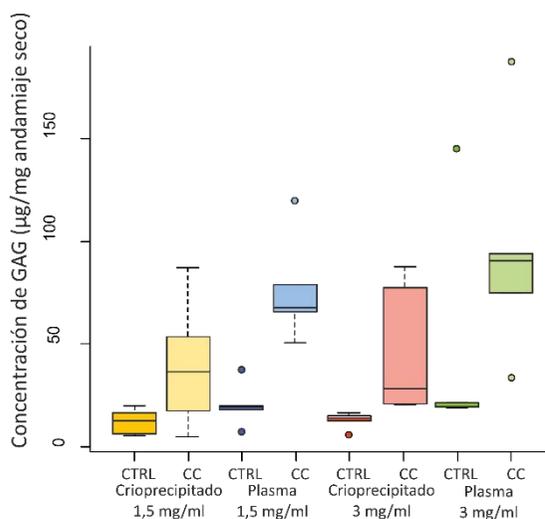


Figura 141. Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG en función del tipo de Estudio, Biomaterial y Concentración de fibrinógeno. Los resultados del análisis muestran un patrón claro en la distribución de la concentración de GAG en función del tipo de Estudio, como había indicado previamente la ANOVA al detectarse diferencias significativas. La concentración de elastina fue significativamente mayor cuando se cultivaban células en el andamio, Estudio Cocultivo. Se detectaron diferencias significativas para el factor Biomaterial. El factor Concentración de fibrinógeno no influyó en el contenido de GAG. Los círculos se corresponden con valores atípicos. CTRL (Control), CC (Cocultivo).  $n=5$ .

A continuación, se detallan los resultados obtenidos para cada factor analizado.

ESTUDIO. Los resultados mostraron diferencias muy significativas ( $p \leq 0,001$ ) entre Control y Cocultivo (Figura 142). Esto indicó que la concentración de GAG aumentó considerablemente al cultivar células en los andamiajes, siendo capaces de continuar secretando mucinas en cultivo tridimensional.

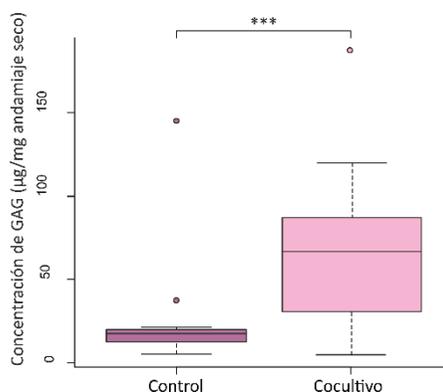


Figura 142. Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG en función del tipo de Estudio. El contenido de GAG fue significativamente mayor en los andamiajes que contenían células en su composición. Los círculos se corresponden con valores atípicos.  $***p \leq 0,001$ ;  $n=5$ .

BIOMATERIAL: Este factor, según se muestra en la Figura 143, tuvo influencia sobre el valor de la concentración de GAG ( $p \leq 0,05$ ). El contenido de GAG fue mayor en los andamiajes que llevaban Plasma en su composición.

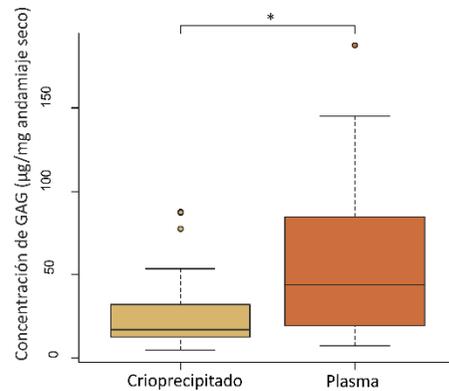


Figura 143. Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG en función del tipo de Biomaterial. Los círculos se corresponden con valores atípicos.  $*p \leq 0,05$ ;  $n=5$

CONCENTRACIÓN. En la Figura 144 se muestra que este factor no tuvo influencia sobre el valor de la concentración de GAG. El contenido de GAG fue similar en los andamiajes de Concentración 1,5 mg/ml y 3 mg/ml de fibrinógeno.

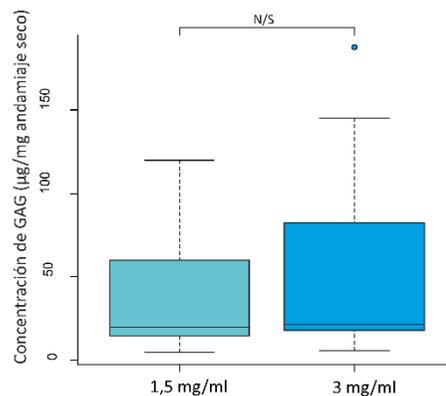


Figura 144. Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG en función de la Concentración de fibrinógeno. N/S: No significación;  $n=5$ .

## ANÁLISIS INDIVIDUALIZADO EN FUNCIÓN DEL ESTUDIO

En este apartado se realizó un análisis estadístico separando los datos en función del Estudio: Control y Cocultivo. Se analizó en cada grupo la influencia del factor Biomaterial y Concentración sobre el contenido de GAG en los andamiajes. En el Estudio Control, el resultado de la ANOVA no mostro diferencias significativas para ambos factores (Figura 145-A).

Para el conjunto de datos seleccionados en el Estudio Cocultivo, después de realizar la ANOVA sobre el modelo lineal generalizado de dos factores se detectaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) para el factor Biomaterial.

Al realizar el análisis de Tukey, se comprobó que la concentración de GAG fue mayor en los andamiajes que tenían en su composición el Biomaterial Plasma (Figura 145-B). Por lo tanto, se confirma que valores elevados de fibrinógeno en el andamio, contribuyen a una menor síntesis de GAG por parte de las células caliciformes de su composición.

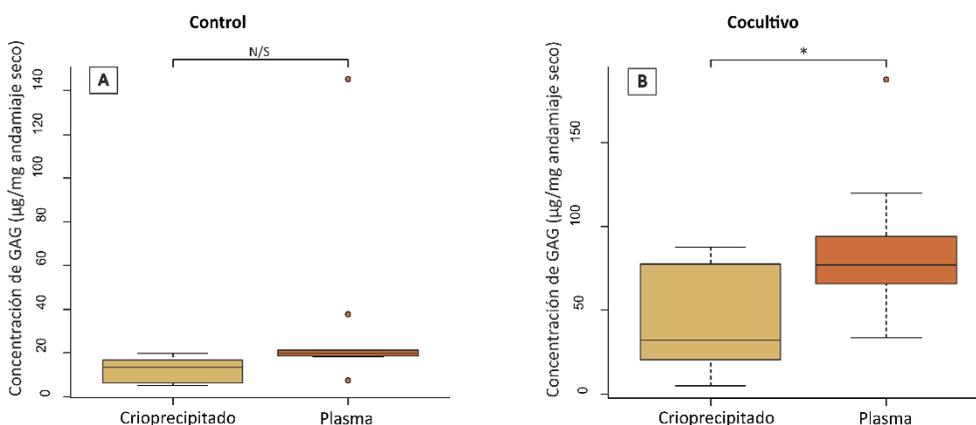


Figura 145. Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG en el Estudio Control y Cocultivo según el Biomaterial. (A) Concentración de GAG en el Estudio Control dependiendo del Biomaterial. (B) Concentración de GAG en el Estudio Cocultivo dependiendo del Biomaterial. Los círculos se corresponden con valores atípicos. \* $p \leq 0,05$ ; N/S: No significación;  $n=5$ . Nótese la diferencia de escala entre el Estudio.

## ANÁLISIS INDIVIDUALIZADO EN FUNCIÓN DEL BIOMATERIAL

En este apartado se realizó un análisis estadístico separando los datos en función del Biomaterial: Crioprecipitado y Plasma.

En el análisis realizado sólo con los datos de Crioprecipitado se consideraron dos factores: Estudio y Concentración. Los resultados de la ANOVA mostraron la existencia de diferencias significativas para el factor Estudio ( $p \leq 0,05$ ), pero no para el factor Concentración. Tras realizar el test de Tukey de comparación entre grupos, se pudieron evidenciar diferencias significativas ( $p \leq 0,01$ ) entre el Estudio Control y el Estudio Cocultivo (Figura 146-A).

Cuando se seleccionaron solamente los datos referentes a Plasma y se realizó una ANOVA sobre el modelo lineal generalizado con los dos factores que pudieron afectar en la concentración de GAG: Estudio y Concentración. Se detectaron diferencias significativas para el factor Estudio ( $p \leq 0,05$ ). El test de Tukey mostró diferencias significativas ( $p \leq 0,01$ ) entre el Estudio Control y Cocultivo (Figura 146-B).

La concentración de GAG fue claramente mayor en el Estudio Cocultivo debido a la presencia de células secretoras de mucinas en la superficie de los andamiajes.

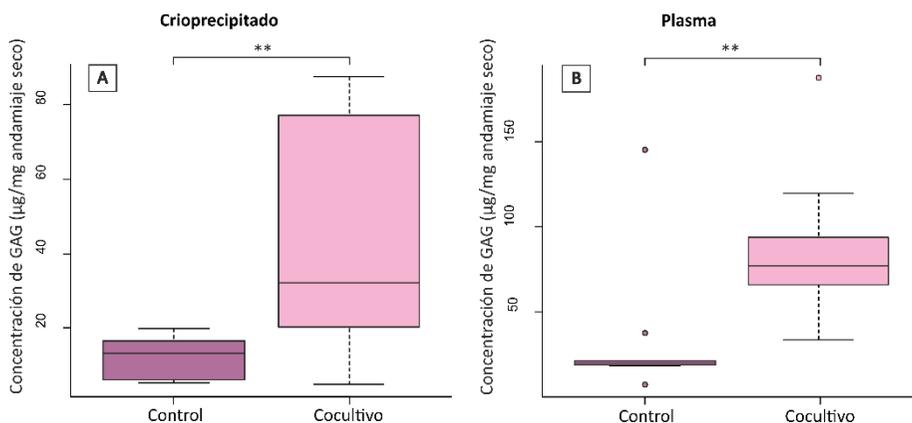


Figura 146. Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG en el Biomaterial Crioprecipitado y Plasma según el Estudio. (A) Concentración de GAG en el Biomaterial Crioprecipitado dependiendo del Estudio. (B) Concentración de GAG en el Biomaterial Plasma dependiendo del Estudio. \*\* $p \leq 0,01$ ;  $n=5$ . Nótese la diferencia de escala.

## ANÁLISIS INDIVIDUALIZADO EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN

En este apartado se realizó un análisis estadístico separando los datos en función de la Concentración de fibrinógeno: 1,5 mg/ml y 3 mg/ml. Se analizó en cada grupo la influencia del factor Estudio y Biomaterial sobre el contenido de elastina en los andamiajes

Para la concentración de fibrinógeno 1,5 mg/ml, se realizó una ANOVA sobre el modelo lineal generalizado con los dos factores que pudieron afectar a la concentración de GAG. Para el factor Estudio se detectaron diferencias significativas al hacer el test de Tukey entre sus grupos ( $p \leq 0,01$ ), siendo mayor la concentración de GAG cuando había células en el andamio (Figura 147-A). Por el contrario, el análisis del factor Biomaterial nos mostró que los diferentes orígenes de la fibrina no influyeron en la concentración de GAG.

Cuando se seleccionaron solamente los datos de la Concentración de fibrinógeno 3 mg/ml y se realizó una ANOVA sobre el modelo lineal generalizado con los dos factores que pudieron afectar en la concentración de GAG: Estudio y Biomaterial. No se detectaron diferencias significativas para ninguno de los dos factores (Figura 147-B).

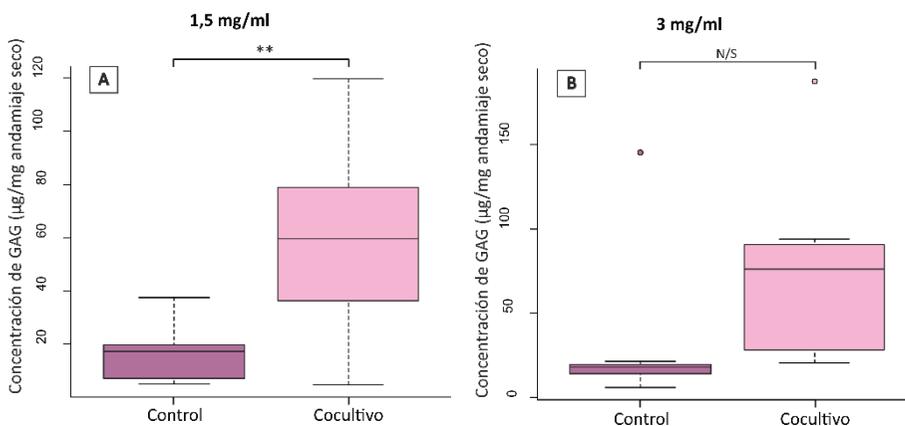


Figura 147. Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG a la Concentración de Fibrinógeno 1,5 mg/ml y 3 mg/ml en función del Estudio. (A) Concentración de GAG a la concentración de fibrinógeno 1,5 mg/ml según el Estudio. (B) Concentración de GAG a la concentración de fibrinógeno 3 mg/ml según el Estudio. Los círculos se corresponden a valores atípicos. \*\* $p \leq 0,01$ ; N/S: No significación;  $n=5$ . Nótese la diferencia de escala.

Los resultados obtenidos en el Capítulo 3 pueden resumirse en las siguientes observaciones:

1. El protocolo de descelularización basado en cambios de pH y choques osmóticos, resultó efectivo para conseguir la descelularización de la conjuntiva porcina.
2. El análisis por tinción H-E y SEM mostró una completa descelularización y preservación de los andamiajes a nivel microestructural.
3. Mediante la aplicación de la técnica de viabilidad celular Alamar Blue a nivel tisular, no se detectaron células viables en la conjuntiva acelular.
4. El análisis biomecánico mostró que tanto la rigidez como la elasticidad se mantuvieron en los tejidos descelularizados.
5. El estudio de citotoxicidad mediante la técnica Live/Dead puso de manifiesto la inocuidad de las soluciones de descelularización.
6. Se obtuvieron andamiajes biocompatibles donde las células estromales y las células epiteliales fueron capaces de adherirse, proliferar y recolonizar el tejido.
7. La digestión enzimática mediante colagenasa 2 mg/ml de conjuntiva descelularizada permitió la obtención de fibras que combinadas con fibrina facilitó la creación de los andamiajes de fibrina de tercera generación.
8. Los andamiajes de tercera generación, resultaron ser estructuras biocompatibles que permitieron el cultivo simultaneo de células estromales y de células epiteliales.

## VII- CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN

En este estudio, se propone un novedoso protocolo de descelularización aplicado a la conjuntiva bulbar porcina.

En la reconstrucción de la superficie ocular ha sido ampliamente utilizada la membrana amniótica<sup>171</sup> como soporte tisular para el establecimiento del epitelio corneal. Sin embargo, la membrana amniótica suele degradarse demasiado pronto como para asegurar el éxito del epitelio corneal trasplantado al tratar a pacientes con graves trastornos de la superficie ocular. En el estudio de Haifeng et al<sup>155</sup>, se preparó matriz xenogénica conjuntival acelular y se evaluó su eficacia y seguridad como un andamiaje de epitelio corneal mediante ingeniería tisular. El protocolo de descelularización de la conjuntiva de origen porcino se basó en la incubación con 0,1 % de SDS durante 12 horas a 37°C y se esterilizó a través de  $\gamma$ -irradiación. En comparación con la conjuntiva nativa, mediante este protocolo se consiguió eliminar más del 92% del ADN, y se mantuvieron más del 90% de los GAG y colágeno de la matriz extracelular. Las células epiteliales aisladas del limbo de conejos se cultivaron sobre la matriz xenogénica conjuntival acelular formando una estructura de múltiples capas epiteliales, que posteriormente se implantó en conejos con insuficiencia límbica.

El análisis de la cuantificación bioquímica de colágeno y GAG, reflejó que no había diferencias significativas entre el tejido en fresco y el tejido descelularizado: GAG tejido fresco  $52,09 \pm 4,46$  ug/mg, GAG tejido descelularizado  $48,63 \pm 3,40$  ug/mg, colágeno tejido fresco  $87,07 \pm 4,95$  ug/mg y colágeno tejido descelularizado  $74,87 \pm 7,09$  ug/mg.

En nuestro estudio tampoco se observaron diferencias significativas cuando se comparó la composición bioquímica de la conjuntiva en fresco, la conjuntiva descelularizada y la conjuntiva recelularizada.

Además, ha resultado fundamental la realización de ensayos de citotoxicidad y biocompatibilidad. No es posible determinar que un protocolo de descelularización se puede aplicar en otros tejidos si no se ha demostrado que los posibles residuos remanentes en la estructura no resultan tóxicos en la futura recolonización del tejido, ya sea autóloga o heteróloga.

En el estudio de Stapleton et al<sup>201</sup> se establecieron la realización de ensayos de citotoxicidad por contacto o desarrollando pruebas sobre los líquidos de lavados obtenidos después del proceso de descelularización realizado. En el presente trabajo se han llevado a cabo las dos opciones, el ensayo de citotoxicidad de los lavados de descelularización y por contacto directo con el tejido, denominado ensayo de biocompatibilidad.

En el ensayo de citotoxicidad se consiguió una muerte celular del 100% con el DMSO como control negativo. La tinción Live/Dead mostró un 100% de viabilidad en las células que habían estado en contacto solamente con el medio de cultivo, representando el control positivo. Los resultados para las soluciones obtenidas de los lavados de los tejidos descelularizados que se mantuvieron en cultivo con células estromales y células epiteliales, mostraron un leve porcentaje de citotoxicidad.

Para la realización del ensayo de biocompatibilidad, fue necesario fijar el tejido a una superficie plástica mediante fibrina para poder ponerlo en contacto con el componente celular. La siembra celular en la conjuntiva descelularizada se realizó mediante inyección en el caso de las células estromales. Las células epiteliales se cultivaron sobre la superficie. Después de dos semanas en cultivo, se pudo mostrar que la conjuntiva porcina descelularizada había sido recelularizada. Este hecho demuestra que los andamiajes de segunda generación son estructuras biocompatibles donde las células originarias del propio tejido son capaces de adherirse, crecer y proliferar, recolonizando las fibras proteicas remanentes.

En resumen, se analizó histológicamente la presencia de las células, se realizó un análisis cuantitativo para determinar los niveles de GAG, elastina y el colágeno. Las propiedades biomecánicas de la conjuntiva se determinaron utilizando el ensayo de tracción uniaxial al fracaso. El análisis histológico de la conjuntiva porcina descelularizada mostró una eliminación completa de los componentes celulares del tejido; la microestructura permaneció intacta según el análisis mediante SEM. Todos los componentes estructurales principales de la matriz se retuvieron, incluyendo el colágeno. No se observaron diferencias entre la conjuntiva en fresco, descelularizada y recelularizada. Las matrices acelulares fueron biocompatibles, las células crecieron en contacto, y no hubo una disminución en la viabilidad celular después de la incubación con soluciones de lavado del tejido descelularizado. Además, no se encontró reducción significativa en la resistencia última a la tracción, extensibilidad, o elasticidad después de descelularización. El andamiaje resultante es biocompatible *in vitro* y no mostró efectos adversos sobre la morfología celular o viabilidad<sup>202</sup>.

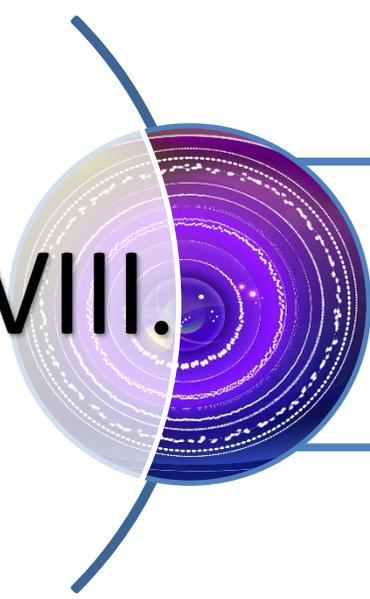
La mayoría de las técnicas de descelularización provocan el hinchamiento del tejido limitando la manipulación del mismo. En nuestro estudio no se observó este fenómeno en ninguna de las conjuntivas descelularizadas. Para evitar que se produzcan este tipo de alteraciones sería necesario utilizar algún tipo de polisacárido como suplemento en la solución de descelularización que facilite la conservación del tejido. Recientemente, se ha empleado el dextrano<sup>203</sup> para promover la conservación de la estructura corneal. En ese caso, las córneas se descelularizaron mediante un protocolo basado en la

aplicación de 1% Triton X-100, 0,5% SDS y la acción de nucleasas bajo agitación constante; seguido de un extenso lavado. Para reducir el hinchamiento del tejido, las soluciones de descelularización se completaron con 5% de dextrano.

Recientemente, se ha propuesto la utilización de andamiajes tridimensionales biológicos compuestos por matriz extracelular de origen natural (ECM) debido a sus potenciales aplicaciones terapéuticas. El potencial biológico de los andamiajes de ECM reside en su capacidad para promover la remodelación tisular. Los factores más importantes, son su capacidad biodegradable, las propiedades bioinductibles de las moléculas funcionales que componen la ECM nativa y la capacidad de modelar sus propiedades mecánicas en el momento de la implantación a través de una comprensión de su microestructura de fibras de colágeno<sup>133</sup>.

Por esta razón, los andamiajes de fibrina de la tercera generación que se proponen en este estudio, están compuestos por las fibras obtenidas tras la digestión enzimática de la conjuntiva descelularizada.





**VIII.**

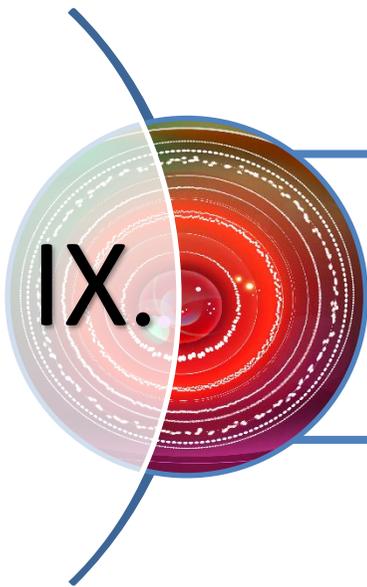
**CONCLUSIONES**



A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos establecer las siguientes conclusiones:

1. La aplicación de un protocolo de digestión enzimática secuencial empleando colagenasa tipo I (2mg/ml) y Tripsina/EDTA (0,25/0,02), sobre una biopsia de la zona bulbar de la conjuntiva porcina, permite la obtención de células estromales y células epiteliales viables, capaces de mantener sus propiedades fenotípicas durante la expansión in vitro.
2. Andamiajes de primera generación elaborados a partir de plasma fresco y una concentración de 1,5 mg/ml de fibrinógeno, permiten la adhesión y proliferación de células estromales en su interior y de células epiteliales en su superficie manteniendo características fenotípicas de ambos tipos celulares y conteniendo una composición bioquímica similar a la conjuntiva nativa.
3. El protocolo de descelularización basado en la combinación de choques osmóticos y cambios de pH, permite la obtención de una conjuntiva descelularizada con escasa presencia de núcleos celulares y que presenta una matriz estructurada de composición bioquímica y características biomecánicas similares a la conjuntiva nativa.
4. El andamiaje de segunda generación elaborado con conjuntiva descelularizada, permite la adhesión y proliferación de células estromales en su interior y de células epiteliales en su superficie manteniendo sus características fenotípicas. La conjuntiva recelularizada resultante, posee la misma composición bioquímica y estabilidad biomecánica que la conjuntiva nativa.
5. La digestión enzimática de conjuntiva descelularizada permite la obtención de fibras de colágeno que, combinadas con el biomaterial fibrina, constituyen un soporte biológico novedoso, denominado andamiaje de tercera generación, para el cultivo de los componentes celulares de la conjuntiva, y que presenta una composición bioquímica similar a la conjuntiva nativa.
6. La aplicación de las técnicas de cultivo celular y de ingeniería tisular descritas en este trabajo, ha permitido generar un equivalente de la conjuntiva de cerdo estructuralmente análogo a la conjuntiva nativa de este modelo experimental. La estandarización y traslación de las técnicas utilizadas, podría permitir en el futuro la elaboración de equivalentes de la conjuntiva humana.





**IX.**

**PERSPECTIVAS FUTURAS**



Esta tesis doctoral ha permitido el establecimiento de una línea de investigación basada en la creación de un sistema *in vitro* tridimensional de conjuntiva.

Las líneas futuras que se plantean después del análisis de los resultados obtenidos y de la exploración de las posibilidades actuales se centran en la implementación de los andamiajes tridimensionales con nanopartículas.

Los biomateriales sintéticos producidos en la actualidad de forma rutinaria incorporan componentes biológicamente activos para definir un entorno artificial *in vivo*. Se caracterizan por poseer interacciones complejas y dinámicas que regulan y promueven a las células, similares a las interacciones que ocurren en un microambiente celular natural.

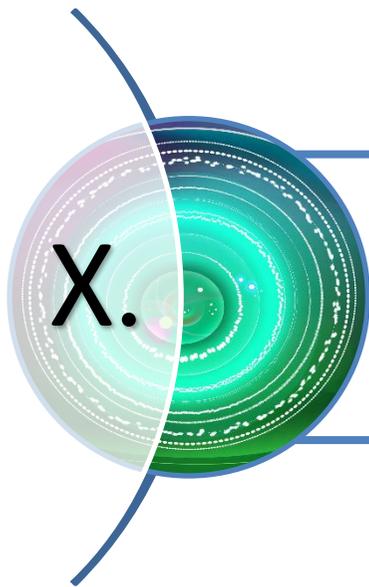
Los hidrogeles con base de fibrina se han empleado *in vitro* como un andamiaje tridimensional para promover la formación de tejido e investigar posteriormente los mecanismos moleculares asociados. Estos hidrogeles impulsan una variedad de procesos celulares, y el fundamento de su desarrollo es mejorar la presentación de señales biológicas, o adaptar las señales biológicas para tejidos específicos. La presentación de estas señales podría optimizarse mediante la administración de nanopartículas, que se pueden emplear para activar la expresión de factores de inducción característicos del tejido nativo.

Como perspectivas futuras, se podría aplicar a nuestros andamiajes elaborados con componentes biológicos el novedoso concepto de las nanopartículas. Este concepto enlaza las propiedades físico-químicas de los biomateriales naturales con su comportamiento biológico para desarrollar y optimizar una combinación de un hidrogel con células incorporadas en su estructura y nanoestructuras transportadoras de medicamentos.

Con este novedoso diseño se persigue aprovechar los beneficios que se derivan de la combinación de las propiedades descritas anteriormente y conseguir andamiajes más efectivos desde el punto de vista de la translación clínica y el rendimiento terapéutico que los desarrollados en la actualidad.

Las nanoestructuras que se incorporarán a los andamiajes deben actuar como un medio efectivo de transporte de moléculas bioactivas capaces de inhibir factores específicos relacionados con procesos inflamatorios oculares graves (TNF-alfa o IL-10), promover en los tejidos dañados los procesos de restitución epitelial (TFFs) o facilitar la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular (EGF).





## **BIBLIOGRAFÍA**



1. Zhu J. Eye Anatomy. *Lasik MD*. 2014;1. doi:10.1002/9780470015902.a0000108.pub2.
2. Deshpande P, Ramachandran C, Sefat F, et al. Simplifying corneal surface regeneration using a biodegradable synthetic membrane and limbal tissue explants. *Biomaterials*. 2013;34(21):5088-5106. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.03.064.
3. Czyz CN, Cahill K V., Foster JA. Reconstructive designs for the eyelids. *Oper Tech Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2011;22(1):35-46. doi:10.1016/j.otot.2011.01.005.
4. Most SP, Mobley SR, Larrabee WF. Anatomy of the eyelids. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2005;13(4):487-492. doi:10.1016/j.fsc.2005.06.003.
5. Sun MT, Pham DT, O'Connor AJ, et al. The Biomechanics of eyelid tarsus tissue. *J Biomech*. 2015;48(12):3455-3459. doi:10.1016/j.jbiomech.2015.05.037.
6. Kakizaki H, Malhotra R, Selva D. Upper eyelid anatomy: an update. *Ann Plast Surg*. 2009;63(3):336-343. doi:10.1097/SAP.0b013e31818b42f7.
7. Gipson IK. The ocular surface: The challenge to enable and protect vision. The Friedenwald lecture. In: *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. Vol 48.; 2007:4391-4398. doi:10.1167/iovs.07-0770.
8. Presland A. Applied ocular physiology and anatomy. *Anaesth Intensive Care Med*. 2007;8(9):379-382. doi:10.1016/j.mpaic.2007.07.001.
9. Thoft RA, Friend J. Biochemical transformation of regenerating ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1977;16(1):14-20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/832961>.
10. Tseng SC, Tsubota K. Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. *Am J Ophthalmol*. 1997;124(6):825-835. doi:10.1016/S0002-9394(14)71700-3.
11. Paulsen F. Functional anatomy and immunological interactions of ocular surface and adnexa. *Dev Ophthalmol*. 2008;41:21-35. doi:10.1159/000131068.
12. Obata H. Anatomy and histopathology of the human lacrimal gland. *Cornea*. 2006;25(10 Suppl 1):S82-S89. doi:10.1097/01.ico.0000247220.18295.d3.
13. Hirayama M, Ogawa M, Oshima M, et al. Functional lacrimal gland regeneration by transplantation of a bioengineered organ germ. *Nat Commun*. 2013;4:2497. doi:10.1038/ncomms3497.
14. Gandhi S, Jain S. The anatomy and physiology of cornea. In: *Keratoprotheses and Artificial Corneas: Fundamentals and Surgical Applications*.; 2015:19-25. doi:10.1007/978-3-642-55179-6\_3.
15. Derek W. DelMonte TK. Anatomy and physiology of the cornea and related structures. *J Cataract Refract Surg*. 2011;37:588-598. doi:10.1016/j.jcrs.2010.12.037.
16. Asbell P, Brocks D. Cornea Overview. In: *Encyclopedia of the Eye*.; 2010:522-531. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374203-2.00058-0>.

17. Meek KM. The cornea and sclera. In: *Collagen: Structure and Mechanics.*; 2008:359-396. doi:10.1007/978-0-387-73906-9\_13.
18. Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. Human corneal anatomy redefined: A novel pre-descemet's layer (Dua's Layer). In: *Ophthalmology.* Vol 120.; 2013:1778-1785. doi:10.1016/j.ophtha.2013.01.018.
19. Wolosin JM, Budak MT, Akinci M a M. Ocular surface epithelial and stem cell development. *Int J Dev Biol.* 2004;48(8-9):981-991. doi:10.1387/ijdb.041876jw.
20. Osei-Bempong C, Figueiredo FC, Lako M. The limbal epithelium of the eye--a review of limbal stem cell biology, disease and treatment. *Bioessays.* 2013;35(3):211-9. doi:10.1002/bies.201200086.
21. Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE. Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp Eye Res.* 2005;81(3):247-264. doi:10.1016/j.exer.2005.02.016.
22. Figueira EC, Di Girolamo N, Coroneo MT, Wakefield D. The phenotype of limbal epithelial stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48(1):144-56. doi:10.1167/iovs.06-0346.
23. Ebrahimi M, Taghi-Abadi E, Baharvand H. Limbal stem cells in review. *J Ophthalmic Vis Res.* 2009;4(1):40-58. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3448387&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
24. Schlötzer-Schrehardt U, Dietrich T, Saito K, et al. Characterization of extracellular matrix components in the limbal epithelial stem cell compartment. *Exp Eye Res.* 2007;85(6):845-860. doi:10.1016/j.exer.2007.08.020.
25. Notara M, Shortt AJ, Galatowicz G, Calder V, Daniels JT. IL6 and the human limbal stem cell niche: A mediator of epithelial-stromal interaction. *Stem Cell Res.* 2010;5(3):188-200. doi:10.1016/j.scr.2010.07.002.
26. Li W, Hayashida Y, Chen Y-T, Tseng SCG. Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell Res.* 2007;17(1):26-36. doi:10.1038/sj.cr.7310137.
27. Castro-Muñozledo F. Review: corneal epithelial stem cells, their niche and wound healing. *Mol Vis.* 2013;19:1600-13. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3724956&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
28. Yoon J, Ismail S, Sherwin T. Limbal stem cells: Central concepts of corneal epithelial homeostasis. *World J Stem Cells.* 2014;6(4):391-403. doi:10.4252/wjsc.v6.i4.391.
29. Kenyon KR, Tseng SC. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology.* 1989;96(5):709-22; discussion 722-3. doi:10.1016/S0161-6420(89)32833-8.
30. Rama P, Bonini S, Lambiase A, et al. Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation.* 2001;72(9):1478-1485. doi:10.1097/00007890-200111150-

- 00002.
31. Calonge M, Diebold Y, de Salamanca AE, et al. Conjunctival Epithelium Biology: Role of Conjunctival Epithelial Cells In Vitro. *Ocul Surf.* 2005;3(1):S51. doi:10.1016/S1542-0124(12)70369-5.
  32. Selvam S, Thomas PB, Yiu SC. Tissue engineering: current and future approaches to ocular surface reconstruction. *Ocul Surf.* 2006;4(3):120-136.
  33. Shortt AJ, Secker G a, Notara MD, et al. Transplantation of ex vivo cultured limbal epithelial stem cells: a review of techniques and clinical results. *Surv Ophthalmol.* 2007;52(5):483-502. doi:10.1016/j.survophthal.2007.06.013.
  34. Chung SH, Lee JH, Yoon JH, Lee HK, Seo KY. Multi-layered culture of primary human conjunctival epithelial cells producing MUC5AC. *Exp Eye Res.* 2007;85(2):226-233. doi:10.1016/j.exer.2007.04.005.
  35. Garcia-Posadas L, Arranz-Valsero I, Lopez-Garcia A, Soriano-Romani L, Diebold Y. A new human primary epithelial cell culture model to study conjunctival inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(10):7143-7152. doi:10.1167/jiov.13-12866.
  36. Holland EJ, Mannis MJ, Lee WB. *Ocular Surface Disease: Cornea, Conjunctiva and Tear Film.*; 2013. doi:10.1016/B978-1-4557-2876-3.00055-9.
  37. Watanabe H. Significance of mucin on the ocular surface. *Cornea.* 2002;21(2 Suppl 1):S17-S22. doi:10.1097/00003226-200203001-00005.
  38. Dartt DA. Control of mucin production by ocular surface epithelial cells. *Exp Eye Res.* 2004;78(2):173-185. doi:10.1016/j.exer.2003.10.005.
  39. Mantelli F, Argüeso P. Functions of ocular surface mucins in health and disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008;8(5):477-483. doi:10.1097/ACI.0b013e32830e6b04.
  40. Hodges RR, Dartt DA. Tear film mucins: Front line defenders of the ocular surface; comparison with airway and gastrointestinal tract mucins. *Exp Eye Res.* 2013;117:62-78. doi:10.1016/j.exer.2013.07.027.
  41. Davidson HJ, Kuonen VJ. The tear film and ocular mucins. *Vet Ophthalmol.* 2004;7(2):71-77. doi:10.1111/j.1463-5224.2004.00325.x.
  42. Gipson IK. Distribution of mucins at the ocular surface. *Exp Eye Res.* 2004;78(3):379-388. doi:10.1016/S0014-4835(03)00204-5.
  43. Takahashi Y, Watanabe A, Matsuda H, et al. Anatomy of Secretory Glands in the Eyelid and Conjunctiva. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg.* 2013;29(3):1. doi:10.1097/IOP.0b013e3182833dee.
  44. Hoang-Xuan T, Robin H, Demers PE, et al. Pure ocular cicatricial pemphigoid. A distinct immunopathologic subset of cicatricial pemphigoid. *Ophthalmology.* 1999;106(2):355-61. doi:10.1016/S0161-6420(99)90076-3.
  45. Tauber J. Ocular Cicatricial Pemphigoid. *Ophthalmology.* 2008;115(9):1639-1640. doi:10.1016/j.opht.2008.06.002.

46. Kirzhner M, Jakobiec F a. Ocular Cicatricial Pemphigoid: A Review of Clinical Features, Immunopathology, Differential Diagnosis, and Current Management. *Semin Ophthalmol*. 2011;26(4-5):270-277. doi:10.3109/08820538.2011.588660.
47. Queisi MM, Zein M, Lamba N, Meese H, Foster CS. Update on ocular cicatricial pemphigoid and emerging treatments. *Surv Ophthalmol*. 2016;61(3):314-317. doi:10.1016/j.survophthal.2015.12.007.
48. Ahmed M, Zein G, Khawaja F, Foster CS. Ocular cicatricial pemphigoid: Pathogenesis, diagnosis and treatment. *Prog Retin Eye Res*. 2004;23(6):579-592. doi:10.1016/j.preteyeres.2004.05.005.
49. Levine MR. Ocular cicatricial pemphigoid. In: *Smith and Nesi's Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery, Third Edition.*; 2012:355-357. doi:10.1007/978-1-4614-0971-7\_22.
50. Gerull R, Nelle M, Schaible T. Toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome: a review. *Crit Care Med*. 2011;39(6):1521-1532. doi:10.1097/CCM.0b013e31821201ed.
51. Harr T, French LE. Toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5(1):39. doi:10.1186/1750-1172-5-39.
52. Borchers AT, Lee JL, Naguwa SM, Cheema GS, Gershwin ME. Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Autoimmun Rev*. 2008;7(8):598-605. doi:10.1016/j.autrev.2008.06.004.
53. Bunker DJL, George RJ, Kleinschmidt A, Kumar RJ, Maitz P. Alkali-Related Ocular Burns: A Case Series and Review. *J Burn Care Res*. 2014;35:261–268. doi:10.1097/BCR.0b013e31829b0037.
54. Brodovsky SC, McCarty CA, Snibson G, et al. Management of alkali burns: An 11-year retrospective review. *Ophthalmology*. 2000;107(10):1829-1835. doi:10.1016/S0161-6420(00)00289-X.
55. Zoukhri D, Fix A, Alroy J, Kublin CL. Mechanisms of murine lacrimal gland repair after experimentally induced inflammation. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(10):4399-4406. doi:10.1167/iovs.08-1730.
56. Ramos T, Scott D, Ahmad S. An Update on Ocular Surface Epithelial Stem Cells: Cornea and Conjunctiva. *Stem Cells Int*. 2015;2015:601731. doi:10.1155/2015/601731.
57. Schrader S, Notara M, Beaconsfield M, Tuft SJ, Daniels JT, Geerling G. Tissue engineering for conjunctival reconstruction: established methods and future outlooks. *Curr Eye Res*. 2009;34(11):913-924. doi:10.3109/02713680903198045.
58. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260(5110):920-6. doi:10.1126/science.8493529.
59. Liu C, Xia Z, Czernuszka JT. Design and Development of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering. *Chem Eng Res Des*. 2007;85(7):1051-1064. doi:10.1205/cherd06196.

60. Langer R, Vacanti JP. Tissue Engineering. *Science (80- )*. 1993;260:920-926. doi:10.1126/science.8493529.
61. Nerem RM, Sambanis a. Tissue engineering: from biology to biological substitutes. *Tissue Eng*. 1995;1(1):3-13. doi:10.1089/ten.1995.1.3.
62. Kamel RA, Ong JF, Eriksson E, Junker JPE, Caterson EJ. Tissue engineering of skin. *J Am Coll Surg*. 2013;217(3):533-555. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2013.03.027.
63. MacNeil S. Biomaterials for tissue engineering of skin. *Mater Today*. 2008;11(5):26-35. doi:10.1016/S1369-7021(08)70087-7.
64. Groeber F, Holeiter M, Hampel M, Hinderer S, Schenke-Layland K. Skin tissue engineering - In vivo and in vitro applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(4):352-366. doi:10.1016/j.addr.2011.01.005.
65. Priya SG, Jungvid H, Kumar A. Skin tissue engineering for tissue repair and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*. 2008;14(1):105-118. doi:10.1089/teb.2007.0318.
66. Biedermann T, Boettcher-Haberzeth S, Reichmann E. Tissue engineering of skin for wound coverage. *Eur J Pediatr Surg*. 2013;23(5):375-382. doi:10.1055/s-0033-1352529.
67. Groeber F, Holeiter M, Hampel M, Hinderer S, Schenke-Layland K. Skin Tissue Engineering-In Vivo and In Vitro Applications. *Clin Plast Surg*. 2012;39(1):33-58. doi:10.1016/j.cps.2011.09.007.
68. Mohamed A, Xing MM. Nanomaterials and nanotechnology for skin tissue engineering. *Int J Burns Trauma*. 2012;2(1):29-41. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3415966&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
69. MacNeil S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature*. 2007;445(7130):874-80. doi:10.1038/nature05664.
70. Langer R, Vacanti J. Advances in tissue engineering. In: *Journal of Pediatric Surgery*. Vol 51.; 2016:8-12. doi:10.1016/j.jpedsurg.2015.10.022.
71. Ikada Y. Challenges in tissue engineering. *J R Soc Interface*. 2006;3(10):589-601. doi:10.1098/rsif.2006.0124.
72. Clark RAF, Ghosh K, Tonnesen MG. Tissue engineering for cutaneous wounds. *J Invest Dermatol*. 2007;127(5):1018-1029. doi:10.1038/sj.jid.5700715.
73. Shevchenko R V, James SL, James SE. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *J R Soc Interface*. 2010;7(43):229-258. doi:10.1098/rsif.2009.0403.
74. Alaminos M, Sánchez-Quevedo MDC, Muñoz-Ávila JI, et al. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(8):3311-3317. doi:10.1167/iops.05-1647.
75. Mauck RL, Burdick JA. Engineering cartilage tissue. In: *Tissue Engineering: From Lab to Clinic*.; 2011:493-520. doi:10.1007/978-3-642-02824-3\_23.

76. Temenoff JS, Mikos AG. Review: Tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials*. 2000;21(5):431-440. doi:10.1016/S0142-9612(99)00213-6.
77. Balakrishnan B, Banerjee R. Biopolymer-based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Chem Rev*. 2011;111(8):4453-4474. doi:10.1021/cr100123h.
78. Zhang L, Hu J, Athanasiou KA. The role of tissue engineering in articular cartilage repair and regeneration. *Crit Rev Biomed Eng*. 2009;37(1-2):1-57. doi:10.1126/scisignal.3104re1.Basal.
79. Kock L, Van Donkelaar CC, Ito K. Tissue engineering of functional articular cartilage: The current status. *Cell Tissue Res*. 2012;347(3):613-627. doi:10.1007/s00441-011-1243-1.
80. Nesić D, Whiteside R, Brittberg M, Wendt D, Martin I, Mainil-Varlet P. Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006;58(2):300-322. doi:10.1016/j.addr.2006.01.012.
81. Hardingham T, Tew S, Murdoch A. Tissue engineering: chondrocytes and cartilage. *Arthritis Res*. 2002;4 Suppl 3:S63-8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3240137&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
82. Johnstone B, Alini M, Cucchiaroni M, et al. Tissue engineering for articular cartilage repair--the state of the art. *Eur Cell Mater*. 2013;25:248-67. doi:vol025a18 [pii].
83. Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Koizumi N, Kinoshita S. Ocular surface reconstruction using stem cell and tissue engineering. *Prog Retin Eye Res*. 2015;51:187-207. doi:10.1016/j.preteyeres.2015.07.003.
84. Chiou AGY, Florakis GJ, Kazim M. Management of conjunctival cicatrizing diseases and severe ocular surface dysfunction. *Surv Ophthalmol*. 1998;43(1):19-46. doi:10.1016/S0039-6257(98)00005-8.
85. Nakamura T, Kinoshita S. New hopes and strategies for the treatment of severe ocular surface disease. *Curr Opin Ophthalmol*. 2011;22(4):274-278. doi:10.1097/ICU.0b013e3283477d4d.
86. Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology*. 2001;108(9):1569-74. doi:10.1016/S0161-6420(01)00694-7.
87. Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Koizumi N. Progress in Retinal and Eye Research Ocular surface reconstruction using stem cell and tissue engineering. *Prog Retin Eye Res*. 2016;51:187-207. doi:10.1016/j.preteyeres.2015.07.003.
88. Hornof M, Toropainen E, Urtti A. Cell culture models of the ocular barriers. *Eur J Pharm Biopharm*. 2005;60(2):207-225. doi:10.1016/j.ejpb.2005.01.009.
89. Zhu J, Marchant RE. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Rev Med Devices*. 2011;8(5):607-26. doi:10.1586/erd.11.27.
90. Nover AB, Lee SL, Georgescu MS, et al. Porous titanium bases for osteochondral tissue engineering. *Acta Biomater*. 2015;27:286-293. doi:10.1016/j.actbio.2015.08.045.

91. Zhou H, Lee J. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 2011;7(7):2769-2781. doi:10.1016/j.actbio.2011.03.019.
92. Swetha M, Sahithi K, Moorthi A, Srinivasan N, Ramasamy K, Selvamurugan N. Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol.* 2010;47(1):1-4. doi:10.1016/j.ijbiomac.2010.03.015.
93. Wahl DA, Czernuszka JT. Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair. *Eur Cells Mater.* 2006;11:43-56. doi:vol011a06 [pii].
94. Yoshikawa H, Myoui A. Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. *J Artif Organs.* 2005;8(3):131-6. doi:10.1007/s10047-005-0292-1.
95. Moran JM, Pazzano D, Bonassar LJ. Characterization of polylactic acid-polyglycolic acid composites for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng.* 2003;9(1):63-70. doi:10.1089/107632703762687546.
96. Cen L, Liu W, Cui L, Zhang W, Cao Y. Collagen tissue engineering: Development of novel biomaterials and applications. *Pediatr Res.* 2008;63(5):492-496. doi:10.1203/PDR.0b013e31816c5bc3.
97. Parenteau-Bareil R, Gauvin R, Berthod F. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials (Basel).* 2010;3(3):1863-1887. doi:10.3390/ma3031863.
98. Glowacki J, Mizuno S. Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers.* 2008;89(5):338-344. doi:10.1002/bip.20871.
99. Chevally B, Herbage D. Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy. *Med Biol Eng Comput.* 2000;38(2):211-218. doi:10.1007/BF02344779.
100. Lee CH, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm.* 2001;221(1-2):1-22. doi:10.1016/S0378-5173(01)00691-3.
101. Burnouf T, Su C-Y, Radosevich M, Goubran H, El-Ekiaby M. Blood-derived biomaterials: fibrin sealant, platelet gel and platelet fibrin glue. *Isbt Sci Ser Vol 4, No 1, State Art Present.* 2009;4:136-142. doi:10.1111/j.1751-2824.2009.01222.x.
102. Burnouf T, Goubran HA, Chen T-M, Ou K-L, El-Ekiaby M, Radosevic M. Blood-derived biomaterials and platelet growth factors in regenerative medicine. *Blood Rev.* 2013;27(2):77-89. doi:10.1016/j.blre.2013.02.001.
103. 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;60(4):607-612. doi:10.1002/jbm.10107.
104. Fu RH, Wang YC, Liu SP, et al. Decellularization and recellularization technologies in tissue engineering. *Cell Transplant.* 2014;23(4-5):621-630. doi:10.3727/096368914X678382.
105. Gilbert TW. Strategies for tissue and organ decellularization. *J Cell Biochem.* 2012;113(7):2217-2222. doi:10.1002/jcb.24130.

106. Ahmed TAE, Dare E V, Hincke M. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008;14(2):199-215. doi:10.1089/ten.teb.2007.0435.
107. Jockenhoevel S, Zund G, Hoerstrup SP, et al. Fibrin gel - advantages of a new scaffold in cardiovascular tissue engineering. *Eur J Cardio-thoracic Surg.* 2001;19(4):424-430. doi:10.1016/S1010-7940(01)00624-8.
108. Li Y, Meng H, Liu Y, Lee BP. Fibrin gel as an injectable biodegradable scaffold and cell carrier for tissue engineering. *Sci World J.* 2015;2015. doi:10.1155/2015/685690.
109. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost.* 2005;3(8):1894-1904. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01365.x.
110. Lauricella AM. Fibrin network variability. *Acta Bioquim Clin Latinoam.* 2007;41(1):7-19.
111. Fowler WE, Fretto LJ, Erickson HP, McKee PA. Electron microscopy of plasmic fragments of human fibrinogen as related to trinodular structure of the intact molecule. *J Clin Invest.* 1980;66(1):50-56. doi:10.1172/JCI109834.
112. Weisel JW, Stauffacher C V, Bullitt E, Cohen C. A Model for Fibrinogen : Domains and Sequence. *Science (80- ).* 1985;230(4732):1388-1391. doi:10.1126/science.4071058.
113. Siebenlist KR, Meh DA, Mosesson MW. Plasma factor XIII binds specifically to fibrinogen molecules containing ??' chains. *Biochemistry.* 1996;35(32):10448-10453. doi:10.1021/bi9606206.
114. Kaminski M, Siebenlist KR, Mosesson MW. Evidence for thrombin enhancement of fibrin polymerization that is independent of its catalytic activity. *J Lab Clin Med.* 1991;117(3):218-225. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2002278>.
115. Blombäck B, Bark N. Fibrinopeptides and fibrin gel structure. *Biophys Chem.* 2004;112(2-3 SPEC. ISS.):147-151. doi:10.1016/j.bpc.2004.07.013.
116. Okada M, Blombäck B, Chang MD, Horowitz B. Fibronectin and fibrin gel structure. *J Biol Chem.* 1985;260(3):1811-1820. doi:0049-3848(83)90039-7 [pii].
117. des Rieux A, Shikanov A, Shea LD. Fibrin hydrogels for non-viral vector delivery in vitro. *J Control Release.* 2009;136(2):148-154. doi:10.1016/j.jconrel.2009.02.004.
118. Lloyd AW, Faragher RGA, Denyer SP. Ocular biomaterials and implants. *Biomaterials.* 2001;22(8):769-785. doi:10.1016/S0142-9612(00)00237-4.
119. Chirila T V, Hirst LW, Barnard Z, Zainuddin, Harkin DG, Schwab IR. *Reconstruction of the Ocular Surface Using Biomaterials.*; 2009. doi:10.1533/9781845697433.1.213.
120. Han B, Schwab IR, Madsen TK, Isseroff RR. A fibrin-based bioengineered ocular surface with human corneal epithelial stem cells. *Cornea.* 2002;21(5):505-10. doi:10.1097/01.ICC.0000016343.19018.1D.
121. Sierra DH, Eberhardt AW, Lemons JE. Failure characteristics of multiple-component fibrin-based adhesives. *J Biomed Mater Res.* 2002;59(1):1-11. doi:10.1002/jbm.1210.

122. Aranda JL, Ferna A, Puente P De, Luden D, Varela G, Iglesias J. Autologous fibrin scaffolds cultured dermal fibroblasts and enriched with encapsulated bFGF for tissue engineering. 2011;648-654. doi:10.1002/jbm.a.33231.
123. Yang YI, Seol DL, Kim HI, Cho MH, Lee SJ. Composite fibrin and collagen scaffold to enhance tissue regeneration and angiogenesis. *Curr Appl Phys.* 2007;7(SUPPL.1). doi:10.1016/j.cap.2006.11.026.
124. Catelas I, Sese N, Wu BM, Dunn JCY, Helgerson S, Tawil B. Human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation in fibrin gels in vitro. *Tissue Eng.* 2006;12(8):2385-2396. doi:10.1089/ten.2006.12.2385.
125. Soon ASC, Stabenfeldt SE, Brown WE, Barker TH. Engineering fibrin matrices: The engagement of polymerization pockets through fibrin knob technology for the delivery and retention of therapeutic proteins. *Biomaterials.* 2010;31(7):1944-1954. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.10.060.
126. Poterjoy BS, Josephson CD. Platelets, Frozen Plasma, and Cryoprecipitate: What is the Clinical Evidence for Their Use in the Neonatal Intensive Care Unit? *Semin Perinatol.* 2009;33(1):66-74. doi:10.1053/j.semperi.2008.10.004.
127. Callum JL, Karkouti K, Lin Y. Cryoprecipitate: The Current State of Knowledge. *Transfus Med Rev.* 2009;23(3):177-188. doi:10.1016/j.tmr.2009.03.001.
128. Pantanowitz L, Kruskall MS, Uhl L. Cryoprecipitate: Patterns of use. *Am J Clin Pathol.* 2003;119(6):874-881. doi:10.1309/56MQ-VQAQ-G8YU-90X9.
129. Vavken P, Joshi SM, Murray MM. Fibrin concentration affects ACL fibroblast proliferation and collagen synthesis. *Knee.* 2011;18(1):42-46. doi:10.1016/j.knee.2009.12.008.
130. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials.* 2006;27(19):3675-3683. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.02.014.
131. Bader A, Schilling T, Teebken OE, et al. Tissue engineering of heart valves - Human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. *Eur J Cardio-thoracic Surg.* 1998;14(3):279-284. doi:10.1016/S1010-7940(98)00171-7.
132. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials.* 2011;32(12):3233-3243. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.
133. Badylak SF. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials.* 2007;28(25):3587-3593. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.04.043.
134. Keane TJ, Swinehart IT, Badylak SF. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods.* 2015;84:25-34. doi:10.1016/j.ymeth.2015.03.005.
135. Du L, Wu X. Development and characterization of a full-thickness acellular porcine cornea matrix for tissue engineering. *Artif Organs.* 2011;35(7):691-705. doi:10.1111/j.1525-1594.2010.01174.x.

136. Yoeruek E, Bayyoud T, Maurus C, et al. Decellularization of porcine corneas and repopulation with human corneal cells for tissue-engineered xenografts. *Acta Ophthalmol.* 2012;90(2). doi:10.1111/j.1755-3768.2011.02261.x.
137. Pang K, Du L, Wu X. A rabbit anterior cornea replacement derived from acellular porcine cornea matrix, epithelial cells and keratocytes. *Biomaterials.* 2010;31(28):7257-7265. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.05.066.
138. Lee W, Miyagawa Y, Long CL, Cooper DKC, Hara H. A comparison of three methods of decellularization of pig corneas to reduce immunogenicity. *Int J Ophthalmol.* 2014;7(4):587-593. doi:10.3980/j.issn.2222-3959.2014.04.01.
139. Shao Y, Yu Y, Pei C-G, et al. Evaluation of novel decellularizing corneal stroma for cornea tissue engineering applications. *Int J Ophthalmol.* 2012;5(4):415-8. doi:10.3980/j.issn.2222-3959.2012.04.02.
140. Xiao J, Duan H, Liu Z, et al. Construction of the recellularized corneal stroma using porous acellular corneal scaffold. *Biomaterials.* 2011;32(29):6962-6971. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.05.084.
141. Wu Z, Zhou Y, Li N, et al. The use of phospholipase A2 to prepare acellular porcine corneal stroma as a tissue engineering scaffold. *Biomaterials.* 2009;30(21):3513-3522. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.03.003.
142. Huang M, Li N, Wu Z, et al. Using acellular porcine limbal stroma for rabbit limbal stem cell microenvironment reconstruction. *Biomaterials.* 2011;32(31):7812-7821. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.07.012.
143. Sasaki S, Funamoto S, Hashimoto Y, et al. In vivo evaluation of a novel scaffold for artificial corneas prepared by using ultrahigh hydrostatic pressure to decellularize porcine corneas. *Mol Vis.* 2009;15(May):2022-2028. doi:10.1007/s10856-005-6689-9.
144. Gonzalez-Andrades M, de la Cruz Cardona J, Ionescu AM, Campos A, del Mar Perez M, Alamino M. Generation of bioengineered corneas with decellularized xenografts and human keratocytes. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(1):215-220. doi:10.1167/iovs.09-4773.
145. Oh JY, Kim MK, Lee HJ, Ko JH, Wee WR, Lee JH. Processing Porcine Cornea for Biomedical Applications. *TISSUE Eng Part C.* 2009;15(4):635-645. doi:10.1089/ten.TEC.2009.0022.
146. Xu Y-G, Xu Y-S, Huang C, Feng Y, Li Y, Wang W. Development of a rabbit corneal equivalent using an acellular corneal matrix of a porcine substrate. *Mol Vis.* 2008;14(November):2180-2189.
147. Zhang C, Nie X, Hu D, et al. Survival and integration of tissue-engineered corneal stroma in a model of corneal ulcer. *Cell Tissue Res.* 2007;329(2):249-257. doi:10.1007/s00441-007-0419-1.
148. Zhang C, Jin Y, Nie X, Liu Y, Lei J, Hu D. [A comparative study on biocompatibility of acellular corneal stroma materials prepared by serial digestion methods]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 2006;20(2):185-188. Available at:

- <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=med5&NEWS=N&AN=16529331>.
149. Fan X, Chen P, Fu Y. [Xenogenic corneal acellular matrix as carrier for reconstruction of biological cornea epithelium-scaffold-endothelium compound]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. 2007;43(5):437-441. Available at:  
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=med5&NEWS=N&AN=17706094>.
150. Fang XF, Zhao J, Shi WY, Xie LXC 16/7/12. Biocompatibility of acellular corneal stroma and transportation of tissue-engineered corneal epithelium. *Chinese J Ophthalmol*. 2008;44:934-942 ST - Biocompatibility of acellular cornea. Available at:  
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed8&NEWS=N&AN=19176124>.
151. Amano S, Shimomura N, Yokoo S, Araki-Sasaki K, Yamagami S. Decellularizing corneal stroma using N2 gas. *Mol Vis*. 2008;14(April):878-882.
152. Lin XC, Hui YN, Wang YS, Meng H, Zhang YJ, Jin Y. Lamellar keratoplasty with a graft of lyophilized acellular porcine corneal stroma in the rabbit. *Vet Ophthalmol*. 2008;11(2):61-66. doi:10.1111/j.1463-5224.2008.00601.x.
153. Shao Y, Quyang L, Zhou Y, et al. Preparation and physical properties of a novel biocompatible porcine corneal acellularized matrix. *Vitr Cell Dev Biol - Anim*. 2010;46(7):600-605. doi:10.1007/s11626-010-9328-9.
154. Shao Y, Tang J, Zhou Y, et al. Original Article A novel method in preparation of acellularporcine corneal stroma tissue for lamellar keratoplasty. 2015;7(12):2612-2629.
155. Zhao H, Qu M, Wang Y, Wang Z, Shi W. Xenogeneic acellular conjunctiva matrix as a scaffold of tissue-engineered corneal epithelium. *PLoS One*. 2014;9(11). doi:10.1371/journal.pone.0111846.
156. Fang X-F, Zhao J, Shi W-Y, Xie L-X. [Reconstruction tissue-engineered corneal epithelium using xenogeneic acellular corneal stroma as scaffold]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. 2008;44(9):825-830. Available at:  
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=med5&NEWS=N&AN=19175163>.
157. Zhang S jiang, Yang Z ming, Deng L, Luo J cong, Li X qun. Preparation of xenogenic corneal stroma and its cytoconsistency. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 2005;27(6):670-673.
158. Ponce Márquez S, Martínez VS, McIntosh Ambrose W, et al. Decellularization of bovine corneas for tissue engineering applications. *Acta Biomater*. 2009;5(6):1839-1847. doi:10.1016/j.actbio.2009.02.011.
159. Fox J, Weisberg S, Adler D, et al. An R Companion to Applied Regression, Second Edition. *R Top Doc*. 2014:167.
160. Slate EAP and EH. Global Validation of Linear Models Assumptions. R package version 1.0.0.2. <http://CRAN.R-project.org/package=gvlma>. 2015.

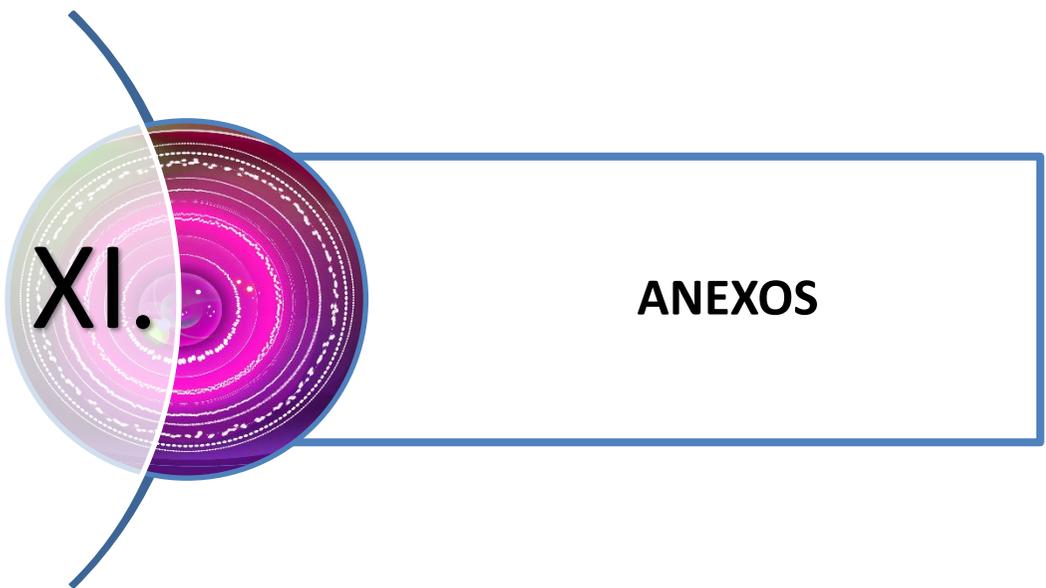
161. Hothorn T, Bretz F, Westfall P, Heiberger RM. multcomp: Simultaneous Inference in General Parametric Models. 2008;50(3):346-363. Available at: <http://cran.r-project.org>.
162. Sanchez I, Martin R, Ussa F, Fernandez-Bueno I. The parameters of the porcine eyeball. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2011;249(4):475-482. doi:10.1007/s00417-011-1617-9.
163. Lu R, Zhang X, Huang D, et al. Conjunctival reconstruction with progenitor cell-derived autologous epidermal sheets in rhesus monkey. *PLoS One*. 2011;6(11). doi:10.1371/journal.pone.0025713.
164. Remtulla S, Hallett PE. A schematic eye for the mouse, and comparisons with the rat. *Vision Res*. 1985;25(1):21-31. doi:10.1016/0042-6989(85)90076-8.
165. Watsky MA, Jablonski MM, Edelhofer HF. Comparison of conjunctival and corneal surface areas in rabbit and human. *Curr Eye Res*. 1988;7(5):483-6. doi:10.3109/02713688809031801.
166. Li ZY, Wong F, Chang JH, et al. Rhodopsin transgenic pigs as a model for human retinitis pigmentosa. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39(5):808-819.
167. Müller B, Boeck T, Hartmann C. Effect of excimer laser beam delivery and beam shaping on corneal sphericity in photorefractive keratectomy. *J Cataract Refract Surg*. 2004;30(2):464-470. doi:10.1016/S0886-3350(03)00559-5.
168. Choy EPY, Cho P, Benzie IFF, Choy CKM. Dry eye and blink rate simulation with a pig eye model. *Optom Vis Sci*. 2008;85(2):129-34. doi:10.1097/OPX.0b013e31816225ed.
169. Diebold Y, Calonge M. Characterization of epithelial primary cultures from human conjunctiva. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1997;235(5):268-276. doi:10.1007/BF01739635.
170. Johnen S, Wickert L, Meier M, Salz AK, Walter P, Thumann G. Presence of xenogenic mouse RNA in RPE and IPE cells cultured on mitotically inhibited 3T3 fibroblasts. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(5):2817-2824. doi:10.1167/iovs.10-6429.
171. Dhamodaran K, Subramani M, Matalia H, Jayadev C, Shetty R, Das D. One for all: A standardized protocol for ex vivo culture of limbal, conjunctival and oral mucosal epithelial cells into corneal lineage. *Cytotherapy*. 2016;18(4):546-561. doi:10.1016/j.jcyt.2016.01.003.
172. Shatos MA, Ríos JD, Horikawa Y, et al. Isolation and characterization of cultured human conjunctival goblet cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(6):2477-2486. doi:10.1167/iovs.02-0550.
173. Gipson IK, Spurr-Michaud S, Tisdale A. Human conjunctival goblet cells express the membrane associated mucin MUC16: Localization to mucin granules. *Exp Eye Res*. 2016;145:230-234. doi:10.1016/j.exer.2015.12.009.
174. Dollner R, Granzow C, Helmke BM, Ruess A, Schad A, Dietz A. The Impact of Stromal Cell Contamination on Chemosensitivity Testing of Head and Neck Carcinoma. *Anticancer Res*. 2004;24(1):325-331.

175. Carr M, Chavez-Muñoz C, Lai A, Ghahary A. Dermal fibroblasts influence the expression profile of 14-3-3 proteins in human keratinocytes. *Mol Cell Biochem*. 2011;353(1-2):205-214. doi:10.1007/s11010-011-0788-3.
176. Notara M, Haddow DB, MacNeil S, Daniels JT. A xenobiotic-free culture system for human limbal epithelial stem cells. *Regen Med*. 2007;2(6):919-927. doi:10.2217/17460751.2.6.919.
177. Varghese VM, Prasad T, Kumary T V. Optimization of culture conditions for an efficient xeno-feeder free limbal cell culture system towards ocular surface regeneration. *Microsc Res Tech*. 2010;73(11):1045-1052. doi:10.1002/jemt.20831.
178. Balasubramanian S, Jasty S, Sitalakshmi G, Madhavan HN, Krishnakumar S. Influence of feeder layer on the expression of stem cell markers in cultured limbal corneal epithelial cells. *Indian J Med Res*. 2008;128(5):616-622.
179. Shimazaki J, Higa K, Morito F, et al. Factors Influencing Outcomes in Cultivated Limbal Epithelial Transplantation for Chronic Cicatricial Ocular Surface Disorders. *Am J Ophthalmol*. 2007;143(6):945-953. doi:10.1016/j.ajo.2007.03.005.
180. Miyashita H, Shimmura S, Higa K, et al. A novel NIH/3T3 duplex feeder system to engineer corneal epithelial sheets with enhanced cytokeratin 15-positive progenitor populations. *Tissue Eng Part A*. 2008;14(7):1275-82. doi:10.1089/tea.2007.0212.
181. Abdalla WM. Efficacy of Limbal-conjunctival Autograft Surgery with Stem Cells in Pterygium Treatment. *Middle East Afr J Ophthalmol*. 2009;16(4):260-262. doi:10.4103/0974-9233.58417.
182. Dharmodaran K, Subramani M, Jeyabalan N, et al. Characterization of ex vivo cultured limbal, conjunctival, and oral mucosal cells: A comparative study with implications in transplantation medicine. *Mol Vis*. 2015;21:828-45. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4522244&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
183. Moure F, Rendueles M, Díaz M. Coupling process for plasma protein fractionation using ethanol precipitation and ion exchange chromatography. *Meat Sci*. 2003;64(4):391-398. doi:10.1016/S0309-1740(02)00205-X.
184. Mazlyzam AL, Aminuddin BS, Fuzina NH, et al. Reconstruction of living bilayer human skin equivalent utilizing human fibrin as a scaffold. *Burns*. 2007;33(3):355-363. doi:10.1016/j.burns.2006.08.022.
185. Currie LJ, Sharpe JR, Martin R. The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements: a review. *Plast Reconstr Surg*. 2001;108(6):1713-1726. doi:10.1097/00006534-200111000-00045.
186. Eyrich D, Brandl F, Appel B, et al. Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. *Biomaterials*. 2007;28(1):55-65. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.08.027.
187. Munirah S, Kim SH, Ruszymah BHI, Khang G. The use of fibrin and poly(lactic-co-glycolic acid) hybrid scaffold for articular cartilage tissue engineering: An in vivo analysis. *Eur Cells Mater*. 2008;15:41-52. doi:vol015a04 [pii].

188. Kessler MW, Grande DA. Tissue engineering and cartilage. *Organogenesis*. 2008;4(1):28-32. doi:10.1016/B978-0-12-370869-4.00018-5.
189. Loh QL, Choong C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Eng Part B Rev*. 2013;19(6):485-502. doi:10.1089/ten.TEB.2012.0437.
190. Zhao H, Ma L, Zhou J, Mao Z, Gao C, Shen J. Fabrication and physical and biological properties of fibrin gel derived from human plasma. *Biomed Mater*. 2008;3(1):015001. doi:10.1088/1748-6041/3/1/015001.
191. Cummings CL, Gawlitta D, Nerem RM, Stegemann JP. Properties of engineered vascular constructs made from collagen, fibrin, and collagen-fibrin mixtures. *Biomaterials*. 2004;25(17):3699-3706. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.10.073.
192. Briganti E, Spiller D, Mirtelli C, et al. A composite fibrin-based scaffold for controlled delivery of bioactive pro-angiogenic growth factors. *J Control Release*. 2010;142(1):14-21. doi:10.1016/j.jconrel.2009.09.029.
193. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*. 2000;267(17):5421-5426. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x.
194. Gonzalez RJ, Tarloff JB. Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. *Toxicol Vitro*. 2001;15(3):257-259. doi:10.1016/S0887-2333(01)00014-5.
195. Rampersad SN. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Switzerland)*. 2012;12(9):12347-12360. doi:10.3390/s120912347.
196. Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L, Parikh R, Bullock P. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicol Vitro*. 2004;18(5):703-710. doi:10.1016/j.tiv.2004.03.012.
197. Al-Nasiry S, Hanssens M, Luyten C, Pijnenborg R. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Hum Reprod*. 2007;22(5):1304-1309. doi:10.1093/humrep/dem011.
198. Munshi S, Twining RC, Dahl R. Alamar blue reagent interacts with cell-culture media giving different fluorescence over time: Potential for false positives. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2014;70(2):195-198. doi:10.1016/j.vascn.2014.06.005.
199. 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;18(3):198-204. doi:10.1089/ten.TEC.2011.0334.
200. Ramos J. Desarrollo y análisis de un protocolo de descelerización para la obtención de válvulas cardíacas acelulares. *Tesis Dr Univ León*. 2014.
201. Stapleton TW, Ingram J, Katta J, et al. Development and characterization of an acellular porcine medial meniscus for use in tissue engineering. *Tissue Eng Part A*.

- 
- 2008;14(4):505-518. doi:10.1089/tea.2007.0233.
202. Wilshaw S-P, Kearney JN, Fisher J, Ingham E. Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering. *Tissue Eng.* 2006;12(8):2117-2129. doi:10.1089/ten.2006.12.ft-133.
203. Choi YC, Choi JS, Kim BS, Kim JD, Yoon HI, Cho YW. Decellularized Extracellular Matrix Derived from Porcine Adipose Tissue as a Xenogeneic Biomaterial for Tissue Engineering. *Tissue Eng Part C Methods.* 2012;18(11):866-876. doi:10.1089/ten.tec.2012.0009.





**XI.**

**ANEXOS**



## 11.1. ANEXO I. MATERIAL

PREPARACIÓN DE MUESTRAS		
MATERIAL	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
<b>RECOGIDA Y TRANSPORTE</b>		
Anfotericina B	Sigma-Aldrich	A9528
Colistimetato de sodio	GES	838185.2
Recipiente plástico 4,5 l	Deltalab	222803
Recipiente plástico 1 l	Deltalab	241013
Suero fisiológico estéril 250 ml	Braun Medical	3570380
Suero fisiológico estéril 500 ml	Braun Medical	3570470
Sulfametoxazol-Trimetoprima	Almofarma	656754.8
Tobramicina	Braun Medical	600551
Vancomicina	Normon	618694.7
<b>EXTRACCIÓN DE TEJIDO CONJUNTIVAL</b>		
Compresa de algodón	Indas	8470004821741
Gasa	Torval	V203010
Pinza de disección	HEBU Medical	HB274
Placa Petri 100 mm	Corning	CO430167
Placa Petri 35 mm	Nunc	126794
Punch 4 mm	Stiefel	006-0004
Tijera de disección	HEBU Medical	HB1929
<b>ESTERILIZACIÓN</b>		
DMEM	BIOWEST	L0064
Etanol	Panreac	121086.1211
Penicilina/Estreptomina	Sigma-Aldrich	P4333-100ML
Placa de 24 pocillos	BD	353047

TÉCNICAS CULTIVO CELULAR		
MATERIAL	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
<b>ESTABLECIMIENTO Y MANTENIMIENTO</b>		
Azul Tripán	Sigma-Aldrich	T8154
Cámara Neubauer	Paul Marienfeld GmbH	-
Colagenasa tipo I	Serva	1745401
EGF	Sigma-Aldrich	E9644
Filtro de vacío 150 ml- 0,22µm	Millipore	SCGPU01RE
Filtro de vacío 250 ml- 0,22µm	Millipore	SCGPU02RE
Filtro de vacío 50 ml- 0,22µm	Millipore	SCGP00525
Frasco de cultivo 25 cm <sup>2</sup>	TPP	TPP90026
Frasco de cultivo 75 cm <sup>2</sup>	TPP	TPP90076
Frasco de cultivo 175 cm <sup>2</sup>	TPP	TPP90176
Ham's F12	BIOWEST	L0136
Insulina	Sigma-Aldrich	I6631-100MG
L-Glutamina	PAA Laboratories GmbH	M11-004
Medio base de cultivo (DMEM)	PAA Laboratories GmbH	E15-005
Microtubo 0,5 ml	Deltalab	200400
Penicilina/ Estreptomina (P/E)	Sigma-Aldrich	P4333-100ML
Pipeta serológica 1 ml estéril	Labclinics	PN1E1
Pipeta serológica 5 ml estéril	Labclinics	PN5E1
Pipeta serológica 10 ml estéril	Labclinics	PN10E1
Placa multipocillo 24	BD	353047
Punta 0,5-10 µl	Labbox	TIPP-011-1K0
Punta 2-200 µl	Labbox	TIPP-200-1K0
Punta 100-1000 µl	Labbox	TIPP-1K1-1K0
Suero bovino fetal (SBF)	LINU	50181
Tripsina/ EDTA 0,25% (T/E)	Sigma-Aldrich	T4049-100ML
Tóxina Colérica	Gentaur	44-100
Tubo de polipropileno 15 ml	Deltalab	429946
Tubo de polipropileno 50 ml	Deltalab	429926

<b>CARACTERIZACIÓN CELULAR</b>		
<b>MATERIAL</b>	<b>CASA COMERCIAL</b>	<b>REFERENCIA</b>
<b>INMUNOFLUORESCENCIA</b>		
CD90	BD	550402
Citoqueratina-7	ThermoScientific	MS-1352P0
e-Cadherina	BD Bioscience	610181
Hoescht	Sigma-Aldrich	H6024-10ML
Lectina HPA	-	-
Medio de montaje	BD	Vecta shield H-1000
Metanol	Sigma-Aldrich	534013
MUC5AC	EMD Millipore Corporation	MAB-2011
Multichamber	Ibidi	80826
Parafilm	Pechiney	PM-966
PBS	Sigma-Aldrich	P5493-1L
Suero de burro	Sigma-Aldrich	D9663
Vimentina	Santa Cruz Biotechnology	SC-6260
<b>TINCIÓN ÁCIDO PERIÓDICO DE SCHIFF</b>		
Ácido periódico	Sigma-Aldrich	P5463
Agua destilada	Laboratorio Farmac	346189
Etanol 96°	Panreac	121085.1211
Etanol 70°	Panreac	192695
Hematoxilina II de Gill	Merck	1.05174.1000
Reactivo de Schiff	Merck	1.09033.0500
PBS	Sigma-Aldrich	P5493-1L

<b>ANDAMIAJES DE FIBRINA</b>		
<b>MATERIAL</b>	<b>CASA COMERCIAL</b>	<b>REFERENCIA</b>
<b>ELABORACIÓN</b>		
Ácido Tranexámico	Rottapharm	672018
Cloruro cálcico	Braun Medical	635656
Criotubo estéril 3ml	VWR	479-1775
Insert 24 pocillos	BD	353095
Placa de 96	Labclinics	256510
Placa de 24	BD	353047
<b>HISTOLOGÍA</b>		
Ácido acético glacial	Fluka	1005706
Agua destilada 1 l	Laboratorio Farmac	346189
Cassette de histología 1 celda	Deltalab	554143
Cassette de histología 2 celdas	Labbox	127300
Cubreobjetos de vidrio (24X24)	Paul Marienfeld GmbH	-
Cubreobjetos de vidrio (24X50)	Menzel-Glaser	AC1575
EnVision™	DAKO	K4061
Eosina Y	Sigma-Aldrich	HT110216
Etanol 96°	Panreac	121085.1211
Etanol absoluto	Panreac	121086.1211
Hematoxilina de Mayer	Sigma-Aldrich	S1275
Medio de montaje (DPX)	Sigma-Aldrich	44581
Pancitoqueratina	PROGEN	61835
Parafina	Merck	1151619025
Paraformaldehído 4%	Panreac	252931.1211
Portaobjetos	Menzel-Glaser	J3800AMNZ
Tricrómico de Masson	Sigma-Aldrich	HT15-1KT
Vimentina	DAKO	M0725
Xilol	Sigma-Aldrich	S34056

<b>ANDAMIAJES DE FIBRINA</b>		
<b>MATERIAL</b>	<b>CASA COMERCIAL</b>	<b>REFERENCIA</b>
<b>PROLIFERACIÓN CELULAR</b>		
Alamar Blue®	Abd Serotec	BUF012B
Azul Tripán	Sigma-Aldrich	T8154
Cámara de Neubauer	Paul Marienfeld	-
Colagenasa I	Serva	1745401
Microtubo 0,5 ml	Deltalab	200400
Placa de cultivo 96	Labclinics	256510
Placa de cultivo 24	BD	353047
Tubo de polipropileno 15 ml	Deltalab	429946
<b>MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO</b>		
Agua destilada 1 l	Laboratorio Farmac	346189
Etanol 96°	Panreac	121085.1211
Etanol absoluto	Panreac	121086.1211
Glutaraldehído	Sigma-Aldrich	G5882-50ML
Tampón fosfato salino (PBS)	Sigma-Aldrich	P5493-1L
<b>ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD</b>		
Cámara de cultivo 8 pocillos	Nunc Brand	154534
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma-Aldrich	D2650-100ML
Kit Live/Dead®	Life Technologies	L-3224
Tampón fosfato salino (PBS)	Sigma-Aldrich	P5493-1L

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA		
MATERIAL	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
<b>DETECCIÓN DE ELASTINA</b>		
Kit Fastin	Biocolor	F4000
Microtubo de 1,5 ml	Deltalab	640450
Microtubo de 2 ml	Deltalab	4092.7N
Placa multipocillo 96 con bordes negros	Labclinics	256510
<b>DETECCIÓN DE COLÁGENO</b>		
Ácido acético	Sigma-Aldrich	A9967
Ácido clorhídrico (HCl)	Sigma-Aldrich	H1758
Kit Sircol	Biocolor	S5000
Microtubo de 1,5 ml	Deltalab	640450
Microtubo de 2 ml	Deltalab	4092.7N
Pepsina	Sigma-Aldrich	P7012-1G
Placa multipocillo 96 con bordes negros	Thermo Scientific/Nunc	265301
<b>DETECCIÓN DE GAG</b>		
Acetato sódico (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich	S8750-250G
Ácido etilendiaminotetraacético disodio (Na <sub>2</sub> EDTA)	Sigma-Aldrich	E5134-100G
Agua destilada 1 l	Laboratorio Farmac	346189
Clorhidrato de cisteína	Sigma-Aldrich	C1276-10G
Kit Blyscan	Biocolor	B3000
Microtubo de 1,5 ml	Deltalab	640450
Microtubo de 2 ml	Deltalab	4092.7N
Papaína	Sigma-Aldrich	P3125-100MG
Placa multipocillo 96 con bordes negros	Thermo Scientific/Nunc	265301
Tampón fosfato salino (PBS)	Sigma-Aldrich	P5493-1L

<b>PROTOCOLO DE DESCELULARIZACIÓN</b>		
<b>MATERIAL</b>	<b>CASA COMERCIAL</b>	<b>REFERENCIA</b>
<b>PREPARACIÓN DE SOLUCIONES</b>		
Ácido clorhídrico (HCl)	Sigma-Aldrich	H1758
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	Sigma-Aldrich	E6758-500G
Agua destilada 1 l	Laboratorio Farmac	346189
Cloruro sódico (NaCl)	Panreac	121659.1211
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)	Sigma-Aldrich	P7626-250MG
Frasco de urocultivo	Soria Genlab	FRM100EU
Hidróxido sódico (NaOH)	Sigma-Aldrich	S8045
Microtubo de 0,5 ml	Deltalab	200400
Penicilina/ Estreptomicina (P/E)	Sigma-Aldrich	P4333-100ML
Solución almacenamiento pHmetro	Hanna Instruments	900070308
Solución calibración pH 4	Hanna Instruments	900070040
Solución calibración pH 7	Hanna Instruments	900070070
Solución electrolito pHmetro	Hanna Instruments	900070710
Tampón fosfato salino (PBS)	Sigma-Aldrich	P5493-1L
Tampón Trizma® hidrocloreuro (TRIS)	Sigma-Aldrich	T5941-500G
<b>TRATAMIENTO ENZIMÁTICO</b>		
Albúmina humana	Octapharma	662667.2
Cloruro de magnesio (MgCl <sub>2</sub> )	Merck	5833
Cloruro sódico (NaCl)	Panreac	121659.1211
Desoxirribonucleasa I (DNAsa I)	AppliChem	A3778.0500
Glicerol	Panreac	131339.1211
Ribonucleasa A (RNAsa A)	AppliChem	A2760.0500
Tampón Trizma® hidrocloreuro (TRIS)	Sigma-Aldrich	T5941-500G



## 11.2. ANEXO II. PROTOCOLOS

### **PROTOCOLO I: INMUNOHISTOQUÍMICA INDIRECTA**

---

1. Lavado de las muestras con PBS 1X, dos veces durante 5 minutos.
2. Permeabilización con Tritón al 0,3 % en PBS 1X durante 10 minutos en el caso de los antígenos citoplasmáticos.
3. Lavado con PBS 1X, tres veces durante 5 minutos.
4. Incubación con la solución de bloqueo (suero de burro al 5% en PBS 1X) durante 1 hora.
5. Incubación de las células con los anticuerpos primarios específicos, para células epiteliales (CK7) y para fibroblastos conjuntivales (Vimentina y CD90) durante toda la noche a 4°C. Para la detección de MUC5AC y de e-cadherina la incubación con el anticuerpo primario se realizó durante 1 hora a 37°C. Incubación de las muestras con su anticuerpo secundario correspondiente conjugado con AlexaFluor durante 1 hora.
6. Lavado con PBS 1X, tres veces durante 5 minutos. Contrateñir los núcleos con Hoechst (1:1000) durante 10 minutos.
7. Lavado con PBS 1X, dos veces.
8. Montaje con medio de montaje Vector®.

Todos los procesos se realizaron a temperatura ambiente excepto la incubación con los anticuerpos primarios.

## **PROTOCOLO II: INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA**

---

1. Lavado de las muestras con PBS 1X, dos veces durante 5 minutos.
2. Incubación con la lectina HPA a 37°C durante 30 minutos.
3. Lavado con PBS 1X dos veces durante 5 minutos.
4. Contrateñir los núcleos con Hoechst (1:1000) durante 10 minutos.
5. Lavado con PBS 1X, dos veces.
6. Montaje con medio de montaje Vector®.

### **PROTOCOLO III: TINCIÓN PAS**

---

1. Incubación de las muestras con alcohol de 96°C durante 3 minutos.
2. Incubación de las muestras con alcohol de 70°C durante 3 minutos.
3. Lavado con agua destilada durante 30 segundos.
4. Incubación con ácido periódico durante 2 minutos.
5. Lavado con agua destilada durante 30 segundos.
6. Incubación con reactivo de Schiff durante 5 minutos en oscuridad.
7. Incubación con PBS durante 15 minutos.

---

## PROTOCOLO IV: OBTENCIÓN DE CRIOPRECIPITADO Y PLASMA SOBRENADANTE DE CRIOPRECIPITADO

---

### **OBJETO:**

Describir el método de obtención de crioprecipitado y plasma sobrenadante de crioprecipitado.

El crioprecipitado es la porción de plasma insoluble en frío que precipita después de que el plasma fresco congelado se ha descongelado entre 1-6 °C. El crioprecipitado contiene aproximadamente el 50% de Factor VIII, el 20-40% de fibrinógeno y una parte de Factor XIII presente en la unidad de plasma fresco congelado original.

**Comienza:** con la disponibilidad de una unidad de plasma fresco congelado a partir de la cual se pretende obtener crioprecipitado.

**Finaliza:** con la obtención y registro informático de una unidad de crioprecipitado y una unidad de plasma libre de crioprecipitado que contiene los factores presentes en la unidad de plasma original excepto el Factor VIII, fibrinógeno y Factor XIII (ver Anexo 1 de PR-PTO-01).

### **DESARROLLO**

El crioprecipitado se puede preparar a partir de PFC cuarentenado o a partir de PFC cuarentenado o inactivado, preferentemente de aféresis, según disponibilidad.

- 1)** Sacar del congelador las unidades seleccionadas de PFC y mantenerlas a 4º C hasta que se descongelen (12-16 horas).
- 2)** Unir mediante sellado estéril una bolsa satélite en la que reflejamos el nº de donación. Pinzar entre ambas.
- 3)** Centrifugar la bolsa a 4200 rpm durante 10 minutos a 4º C (programa 4 centrífuga Jouan KR4i). Antes de centrifugar ejecutar un “precool”.

**4)** Sacar con mucho cuidado las bolsas del cubilete de la centrífuga y colocarla en el extractor manual de plasma. Observar cómo el crioprecipitado se ha quedado adherido a las paredes de la bolsa primaria.

**5)** Separar rápidamente el crioprecipitado para evitar que se disuelva. Para ello, retirar el pinzado entre la bolsa primaria y la satélite, accionar la prensa y dejar pasar el plasma libre de crioprecipitado a la bolsa satélite.

**6)** Dejar unos ml de plasma junto con el crioprecipitado para que el volumen final sea 25-30 ml.

**7)** Registrar en eDelphyn:

Crioprecipitado---Componente a transformar (E3826) ----nº donación (leer el código de la etiqueta del plasma). En ese momento se genera informáticamente los 2 productos y sus etiquetas respectivas – seguir los pasos hasta completar etiquetaje.

Crioprecipitado: E3575.

Plasma sobrenadante de crioprecipitado: E2553.

Almacenar según lo requerido por el proyecto, bien a 4°C o bien congelar a temperatura inferior a -20°C.

**8)** Dar de baja los productos solicitados en eDelphyn por motivo “destino biobanco”.

**9)** Registrar los productos en eDelphyn de biobanco.

#### DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA

- Manual Técnico AABB (American Association of Blood Banks).
- Clinical Practise of Transfusion Medicine. Ed by Petz and Swisher.
- Estándares de Acreditación en Transfusión Sanguínea. CAT.

---

## PROTOCOLO V: TINCIÓN HEMATOXILINA&EOSINA

---

Antes de comenzar con la tinción, se introdujeron las muestras en una estufa (1.500E, Shel Lab) a 60°C durante media hora.

En primer lugar, se van a desparafinar y rehidratar las muestras:

- Xilol, 5 minutos (min) (2 ciclos), alcohol absoluto, 5 min (2 ciclos), alcohol 90°, 5 min (2 ciclos), alcohol 70°, 5 min y lavado en agua corriente, 2 min.

Posteriormente, se procede a realizar la tinción:

- Hematoxilina de Mayer, 2 min, como mordiente inmersión en alcohol de 50° y solución de eosina Y, 4 min.\*

A continuación se deshidratan las muestras antes de su montaje.

- Alcohol de 90°, 5 min (2 ciclos), alcohol absoluto, 5 min (2 ciclos) y xilol, 5 min (2 ciclos).

Finalmente, se añade una gota de medio de montaje (*Distyrene Plasticizer Xylene*, DPX) sobre las muestras teñidas y se coloca el cubreobjetos de vidrio, aplicando un poco de presión para eliminar la presencia de burbujas que puedan interferir con la visualización de las preparaciones.

Como resultado de la tinción, los núcleos se van a teñir de morado; el citoplasma y la fibrina de rosa; la musculatura y los glóbulos rojos de rosa fuerte, rojo o anaranjado.

\*Preparación de eosina Y, se añade 1 gramo de eosina Y en 100 ml de agua destilada. Además se añaden 2-3 gotas de ácido acético glacial y se agita vigorosamente hasta su completa dilución.

---

## PROTOCOLO VI: PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA SEM

---

En primer lugar, es necesario deshidratar las muestras para proceder a desecarlas.

- Lavado con PBS, 30 min (3 ciclos), alcohol al 20%, 40 min, alcohol al 30%, 40 min, alcohol al 50%, 40 min, alcohol al 70%, 40 min, alcohol al 80%, 40 min, alcohol al 90%, 40 min, alcohol al 96%, 40 min (3 ciclos), Etanol Absoluto, 40 min (2 ciclos).

Una vez que las muestras están en etanol absoluto, se desecan por punto crítico en un desecador (CPD Balzers).

1. Para ello se inserta la cámara en el agente intermedio (alcohol absoluto) y se colocan las muestras sin tocar la zona de estudio.
2. Se cierra la cámara de presión y se refrigera, *cooling*, por debajo de 10°C (5 min).
3. Se permite la entrada de CO<sub>2</sub> líquido, *medium in*, abriendo la bombona. Comprobar que la válvula esté bien cerrada. En este paso se inicia la sustitución del agente intermedio por el CO<sub>2</sub>. Se agita, *stirrer*, durante todo el proceso de sustitución.
4. Se deja que la cámara se llene completamente.
5. Se permite la salida de parte del líquido, *medium out*, pero las muestras quedan siempre cubiertas.
6. Se repiten los pasos 4 y 5 durante 6 veces, con 3 lavados de 15 min, y luego el resto de 10 min.
7. Se llena la cámara de CO<sub>2</sub> justo por debajo del borde superior de la ventana frontal.
8. Se apaga *stirrer*, *medium in*, *cooling* y se enciende *heating*. Una vez alcanzados los 40°C, el CO<sub>2</sub> habrá pasado de líquido a gas superando así el punto crítico del CO<sub>2</sub>. Se deja hasta presión de 90 bar.
9. Se permite la salida del gas, *gas out*, muy lentamente durante 15 minutos aproximadamente asegurándose antes de que la válvula está cerrada completamente.
10. Se abre la cámara de presión, se retiran las muestras y se cierra la bombona.

Tras la completa desecación de las muestras se introducen las muestras en un recubridor (Sputter coater SCD 004, Balzers) para cubrirlas con una capa de oro coloidal que asegure la conductividad eléctrica de toda su superficie.

Se colocan las muestras con cinta doble sobre los soportes específicos para SEM, evitando tocar la zona de estudio y se abre la válvula de argón.

1. Se inserta la muestra en la campana y se enciende el equipo.
2. Se hace el vacío entre 0,05 y 0,07 (esto se consigue con varios lavados de hasta un mínimo de 0,02). En este paso se sustituye el aire que contiene el equipo por el gas argón.
3. Se ajusta el tiempo a 400 segundos y la corriente a 25-30 mA.
4. Se enciende el botón *start*.

Una vez recubierta las muestras, ya estarían listas para su visualización en el microscopio.

---

## PROTOCOLO VII: INMUNOHISTOQUÍMICA VIMENTINA

---

1. En primer lugar, se van a desparafinar y rehidratar las muestras:
  - Xilol: 10 minutos (2 ciclos); alcohol absoluto: 5 minutos (2 ciclos); alcohol 90°C: 5 minutos (2 ciclos); alcohol 70°C: 5 minutos y lavado en agua corriente: 2 minutos.
2. Inactivación de la peroxidasa endógena mediante incubación con una solución metanol – peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3% durante 30 minutos en oscuridad.
3. Lavado con PBS durante 5 minutos (3 ciclos).
4. Pretratamiento para desenmascarar epítomos:
  - Olla a presión en buffer de citrato sódico en agua destilada (5,882 g/ 2 l), pH 6.
  - Tratamiento con tripsina durante 30 minutos en cámara húmeda a 37°C.
5. Lavado con PBS durante 5 minutos (3 ciclos).
6. Incubación con el anticuerpo primario vimentina (1/1000) en cámara húmeda durante toda la noche a 4°C.
7. Lavado con PBS durante 5 minutos (3 ciclos).
8. Envision® durante 40 minutos en cámara húmeda. (Es anti-mouse por el anticuerpo primario es monoclonal).
9. Lavado con PBS durante 5 minutos (3 ciclos).
10. Revelado: 100 µl agua destilada; 2 µl HPS (*Hydrogen Peroxidase Solution*); 2 µl BSS (*Buffer Saline Solution*); 4 µl DAB (*Diaminobencidina*)
11. Parada de la reacción y lavado en agua corriente.
12. Contraste de núcleos con Hematoxilina de Harris.
13. Lavado en agua corriente.
14. Deshidratación de las muestras.
15. Montaje de preparaciones.

---

## PROTOCOLO VIII: INMUNOHISTOQUÍMICA PANCITOQUERATINA

---

1. En primer lugar, se van a desparafinar y rehidratar las muestras:
  - Xilol: 10 minutos (2 ciclos); alcohol absoluto: 5 minutos (2 ciclos); alcohol 90°C: 5 minutos (2 ciclos); alcohol 70°C: 5 minutos y lavado en agua corriente: 2 minutos.
2. Inactivación de la peroxidasa endógena mediante incubación con una solución metanol – peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3% durante 30 minutos en oscuridad.
3. Lavado con PBS durante 5 minutos (3 ciclos).
4. Pretratamiento para desenmascarar epítomos:
  - Olla a presión en buffer de citrato sódico en agua destilada (5,882 g/ 2 l), pH 6.
  - Tratamiento con tripsina durante 30 minutos en cámara húmeda a 37°C.
5. Lavado con PBS durante 5 minutos (3 ciclos).
6. Incubación con el anticuerpo primario pancitoqueratina (1/200) en cámara húmeda durante toda la noche a 4°C.
7. Lavado con PBS durante 5 minutos (3 ciclos).
8. Envision® durante 40 minutos en cámara húmeda. (Es anti-mouse por el anticuerpo primario es monoclonal).
9. Lavado con PBS durante 5 minutos (3 ciclos).
10. Revelado: 100 µl agua destilada; 2 µl HPS (*Hydrogen Peroxidase Solution*); 2 µl BSS (*Buffer Saline Solution*); 4 µl DAB (*Diaminobencidina*)
11. Parada de la reacción y lavado en agua corriente.
12. Contraste de núcleos con Hematoxilina de Harris.
13. Lavado en agua corriente.
14. Deshidratación de las muestras.
15. Montaje de preparaciones.

---

## PROTOCOLO IX: TINCIÓN TRICRÓMICO DE MASSON

---

Antes de comenzar con la tinción, se introdujeron las muestras en una estufa (1.500E, Shel Lab) a 60°C durante 30 minutos.

1. En primer lugar, se van a desparafinar y rehidratar las muestras:  
Xilol: 10 minutos (2 ciclos); alcohol absoluto: 5 minutos (2 ciclos); alcohol 90°C: 5 minutos (2 ciclos); alcohol 70°C: 5 minutos y lavado en agua corriente: 2 minutos.
2. Teñir con Hematoxilina férrica de Weigert\* 20 minutos.
3. Lavar en agua corriente 30 minutos.
4. Teñir con fucsina ácida\* mediante inmersión 2 minutos.
5. Lavar en agua destilada.
6. Tratar con ácido fosfomolibdico\* mediante inmersión 5 minutos.
7. Drenar la preparación para quitar el exceso de fosfomolibdico y secar un poco.
8. Teñir con verde luz \* 15 minutos.
9. Lavar con agua destilada.
10. Tratar con ácido acético al 1% durante 2 minutos.
11. Deshidratar y montar.

\*Preparación de Hematoxilina férrica de Weigert:

Solución A: se añaden 5 gramos de hematoxilina en 500 ml de alcohol 96°.

Solución B: se añaden 5,8 gramos de percloruro de hierro en 5 ml de HCl concentrado. Se añaden también 490 ml de agua destilada.

Se mezclan ambas soluciones a partes iguales 10 minutos antes de usarla, se debe echar la solución B sobre la A para que la mezcla sea la adecuada. Se filtra la solución resultante.

\*Preparación de fucsina ácida: se añaden 0,5 gramos de fucsina ácida en 0,5 ml de ácido acético glacial y 100 ml de agua destilada. Se filtra la solución resultante, se puede reutilizar.

\*Preparación de ácido fosfomolibdico: se añade 1 gramo de ácido fosfomolibdico en 100 ml de agua destilada. Se filtra la solución resultante, no se puede reutilizar.

\*Preparación de verde luz: se añade 0,1 de verde luz SF en 0,2 ml de ácido acético puro y 100 ml de agua destilada. Se filtra la solución resultante, no se puede reutilizar.

---

## PROTOCOLO X: REALIZACIÓN DEL ENSAYO BIOQUÍMICO SIRCOL

---

Para la realización de este protocolo se requieren dos días, en el primer día se procesan las muestras para su digestión enzimática y en el segundo día se realiza el protocolo para la detección de colágeno.

### DIA 1:

1. Se prepara la solución enzimática para la digestión:

Solución stock. Pepsina 4 mg/ml en HCl 10 mM (se almacena a -20°C) Tarda en disolverse 1 h aproximadamente. Se agita en el agitador orbital (Rocker 25, Labnet) a 4°C hasta su completa disolución.

Solución de trabajo. 0,1 mg/ml de la solución stock de pepsina en ácido acético 0,5 M.

NOTA: La solución stock se descongela a 4°C y se disuelve en ácido acético 0,5 M previamente enfriado a 4°C.

2. Se introducen las muestras desecadas en tubos de 2 ml y se añade 1,5 ml de la solución de digestión. Se mantiene la digestión enzimática durante toda la noche a 4°C.

### DIA 2:

3. Se recuperan 100 µl de cada muestra, estaban a 4°C, en tubos de 2 ml y se añade un 1 ml del reactivo *Sircol Dye Reagent*. \*
4. Se mezcla durante 30 min en el agitador orbital a 120 revoluciones por minuto (rpm).
5. Se centrifugan las muestras a 15.000 g durante 10 min.
6. Se retira con cuidado el sobrenadante de las muestras sin eliminar el pellet (Se puede utilizar un papel o bastoncillo).
7. Se añaden 750 µl del reactivo *Acid-Salt Wash Reagent\** a las muestras (no se debe agitar y/o resuspender).
8. Se centrifuga a 15.000 g durante 10 min.
9. Se retira con cuidado el sobrenadante de las muestras sin eliminar el pellet (Se puede utilizar un papel o bastoncillo).

10. Se añaden 250  $\mu\text{l}$  del reactivo *Alkali-Reagent*\* a las muestras.
11. Se agita en el vórtex hasta su completa disolución, (el proceso tarda unos 2 min aproximadamente).
12. Se añaden 200  $\mu\text{l}$  en la placa de absorbancia y se mide en el espectrofotómetro (Multiskan EX, Labsystems) a 550 nm.

\*Estos componentes vienen suministrados en el kit.

---

## PROTOCOLO XI: REALIZACIÓN DEL ENSAYO BIOQUÍMICO FASTIN

---

1. Se prepara la extracción de la elastina insoluble:

Para ello se introducen las muestras en tubos de 1.5 ml y se añaden 750 µl de ácido oxálico\* 0,25 M.

NOTA: El ácido oxálico, suministrado con el kit, se encuentra a una concentración de 1 M, se diluye 1:4 en agua destilada para alcanzar una concentración final de 0,25 M.

2. Se introducen las muestras en el agitador térmico a 100°C durante 60 minutos. A los 30 minutos se agitan las muestras en el vórtex durante 1 minuto.
3. Se centrifugan las muestras a 12.000 g durante 10 minutos.

NOTA: Estos pasos se repetirán tantas veces sea necesario hasta que no se detecte pellet tras la centrifugación. Se ha establecido un total de dos extracciones para los tejidos a estudiar. Los datos obtenidos en la segunda extracción se suman a los de la primera para obtener el contenido total de elastina.

4. Se recoge un volumen de entre 10 y 100 µl de sobrenadante (se recomiendan 50 µl) y se añade a un nuevo tubo de 1,5 ml.
5. Se añade un volumen equivalente de *Elastin Precipitating Reagent\** al volumen de muestra recogida.
6. Se agita en el vórtex durante unos segundos y se deja reposar a T<sup>a</sup> A durante 15 min.
7. Se centrifuga a 12.000 g durante 10 min.
8. Se retira el sobrenadante invirtiendo los tubos, se trata de eliminar la mayor cantidad de líquido con ayuda de un papel o bastoncillo.
9. Se añade 1 ml de *Dye Reagent\** (se almacena a 4°C) y se introduce en el agitador térmico a 1.400 rpm durante 90 minutos.
10. Se centrifuga a 12.000 g durante 10 min.
11. Se retira el sobrenadante invirtiendo los tubos y se trata de eliminar la mayor cantidad de líquido con ayuda de un papel o bastoncillo.
12. Se añaden 250 µl de *Dye Dissociation Reagent.\**

13. Se mezclan durante 1 min a 1.400 rpm en el agitador térmico y se deja reposar durante 10 min.
14. Se pasa por el vórtex unos minutos.
15. Se añaden 250  $\mu$ l de muestra en una placa de 96 pocillos y se mide la absorbancia con el filtro de 550 nm.

\*Estos componentes vienen suministrados en el kit.

---

## PROTOCOLO XII: REALIZACIÓN DEL ENSAYO BIOQUÍMICO BLYSCAN

---

1. Se prepara la solución de digestión:
  - Solución stock de papaína. 80 µl de solución de papaína dan lugar a una solución de 15 a 20 mg de papaína por 100 ml de PBS.
  - 0,1 M de acetato sódico (0,82 g /100 ml).
  - 0,01 M de ácido etilen-diamino-tetraacético disodio (Na<sub>2</sub>EDTA) (0,37 g/ 100 ml).
  - 0,005M Clorhidrato de cisteína (80 mg/ 100 ml).
  - 0,2 M de PBS a pH 6,4.
2. Se introducen las muestras desecadas en tubos de 2 ml y se añaden 1,5 ml de la solución de digestión. Se mantiene la digestión durante 3 horas a 65°C en el agitador térmico.
3. Se centrifugan los tubos de la digestión a 10.000 g durante 10 min.
4. Se recogen 50 µl del sobrenadante resultante y se añaden a un nuevo tubo de 2 ml.
5. Se enrasa a 100 µl con agua destilada y se añade 1 ml de *Blyscan Dye Reagent*.\* Se mezcla por inversión.
6. Se mezcla durante 30 min a 120 rpm en un agitador orbital (Rocker 25, Labnet).
7. Se centrifuga a 15.000 g durante 10 min.
8. Se retira el sobrenadante por inversión, con cuidado de no arrastrar el pellet, ayudarse de un bastoncillo o papel para retirar la mayor cantidad de líquido.
9. Se añaden 500 µl del *Dissociation Reagent*.\*
10. Se agita en el agitador térmico durante 1-2 min hasta su completa disolución.
11. Se centrifuga a 15.000 g durante 5 min para eliminar la espuma.
12. Se añaden 200 µl de cada muestra en una placa de 96 pocillos y se mide la absorbancia a 656 nm.

\*Estos componentes vienen suministrados en el kit.

---

### PROTOCOLO XIII: PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN HIPOTÓNICA

---

En primer lugar, se llena un vaso de precipitados, hasta un poco menos del volumen a preparar, con agua destilada. En segundo lugar se añaden los componentes de la solución hipotónica, bajo agitación magnética continuada (10-515 Bioblock Scientific), en el siguiente orden:

- Tampón Trizma® hidrocloreuro (TRIS) 10 mM.
- Ácido etilendiaminotetraacético (*Ethylenediaminetetraacetic Acid*, EDTA) 5 mM\*.
- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (*Phenylmethylsulfonyl Fluoride*, PMSF) 0,1 mM.
- Penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 µg/ml (P/E).

Una vez disueltos todos los componentes se ajusta el pH (KI 2211, Hanna Instruments) y se enrasa hasta el volumen necesario con agua destilada.

\*Para que se disuelva el EDTA es necesario subir el pH a 7 y se requieren unos 20 minutos para su completa disolución.

Para determinar la osmolaridad se toma una alícuota de 2 ml de la solución preparada y se mantiene a 4°C hasta la medición en el osmómetro crioscópico (Osmomat 030, Gonotec). El osmómetro se calibra con agua destilada a "0" osmol/kg mientras la muestra se atempera. Para la cuantificación se añaden 50 µl de muestra en un microtubo de 0,5 ml que se introduce en el osmómetro hasta alcanzar el punto de congelación. Una vez finalizado el proceso se recoge el valor resultante.

---

## PROTOCOLO XIV: PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN HIPERTÓNICA

---

En primer lugar, se llena un vaso de precipitados hasta un poco menos del volumen a preparar con agua destilada. En segundo lugar, se añaden los componentes de la solución hipertónica, bajo agitación magnética continuada, en el siguiente orden:

- TRIS 50 mM.
- EDTA 5 mM.\*
- Cloruro sódico (NaCl) 150 mM.
- PMSF 0,1 mM.
- (100 U/ml- 100 µg/ml-P/E).

Una vez disueltos todos los componentes se ajusta el pH y se enrasa hasta el volumen necesario con agua destilada.

\*Para que se disuelva el EDTA es necesario subir el pH a 7 y se necesitan unos 20 minutos para su completa disolución.

Para determinar la osmolaridad se toma una alícuota de 2 ml de la solución preparada y se mantiene a 4°C hasta la medición en el osmómetro crioscópico (Osmomat 030, Gonotec). El osmómetro se calibra con agua destilada a "0" osmol/kg mientras la muestra se atempera. Para la cuantificación se añaden 50 µl de muestra en un microtubo de 0,5 ml que se introduce en el osmómetro hasta alcanzar el punto de congelación. Una vez finalizado el proceso se recoge el valor resultante.

---

## PROTOCOLO XV: PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN PARA EL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO

---

Primero se preparan las soluciones stock de DNAsa I y RNAsa A para luego preparar la solución de utilización con ambas enzimas.

Solución *stock* de RNAsa A:\*

- TRIS 10 mM.
- NaCl 15 mM.
- Enzima ribonucleasa A (RNAsa A) 10 mg/ml.

Solución stock de DNAsa I:\*

- Glicerol 50% v/v.
- TRIS 20 mM.
- Cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) 1 mM.
- Enzima desoxirribonucleasa I (DNAsa I) 10 mg/ml.

\*Una vez preparadas se almacenan a 4°C.

Solución de utilización:

- TRIS 50 mM.
- MgCl<sub>2</sub> 20 mM.
- Albúmina humana 50 µg/ml.
- Solución stock de RNAsa A 40 µg/ml.
- Solución stock de DNAsa I 50 µg/ml.



