



Universidad de Valladolid



PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA VISION

TESIS DOCTORAL:

**EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE LA SEGURIDAD Y LA EFICACIA DE LA
TERAPIA CON CELULAS MADRE MESENQUIMALES PARA SU
UTILIZACIÓN EN UN ENSAYO CLÍNICO EN PACIENTES CON
NEUROPATÍA ÓPTICA ISQUÉMICA ANTERIOR NO ARTERÍTICA**

Presentada por SONIA LABRADOR VELANDIA para optar al grado de Doctora por la
Universidad de Valladolid

Dirigida por:

PROF. JOSÉ CARLOS PASTOR JIMENO

DR. IVÁN FERNÁNDEZ BUENO

2017



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR/A DE TESIS

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

D. **José Carlos Pastor Jimeno**, con D.N.I. 15771327C, Catedrático del departamento de Cirugía, Oftalmología, Otorrinolaringología y Fisioterapia, Facultad de Medicina, con dirección a efecto de notificaciones en el Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada, Paseo de Belén 17, 47011 Valladolid, pastor@ioba.med.uva.es

D. **Iván Fernández Bueno**, con D.N.I. 09438653M, Director de Investigación del Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada, con dirección a efecto de notificaciones en el Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada, Paseo de Belén 17, 47011 Valladolid, ifernandezb@ioba.med.uva.es

Como Directores de la Tesis Doctoral titulada: "Evaluación preclínica de la seguridad y la eficacia de la terapia con células madre mesenquimales para su utilización en un ensayo clínico en pacientes con neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica".

Realizada por D^a **Sonia Cecilia Labrador Velandia**, alumna del Programa de Doctorado en Ciencias de la Visión autorizan su presentación, considerando que es **APTA** para su defensa.

Valladolid, 20 de abril de 2017

Los Directores de la Tesis,

Fdo.: Dr. José Carlos Pastor Jimeno

Fdo.: Dr. Iván Fernández Bueno

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor José Carlos Pastor Jimeno, director de esta tesis doctoral, por animarme a investigar y por apoyarme en la obtención de mi beca predoctoral, por ser un ejemplo de dedicación, trabajo y perseverancia, por ser una fuente de inagotables ideas, y sobre todo, por darme la oportunidad de desarrollar esta interesante idea para mi tesis.

Al Dr. Iván Fernández Bueno, director de esta tesis doctoral, por su excelente labor como tutor, por estar pendiente de cada una de las actividades relacionadas con mi tesis, cuidando los detalles y mi manera de redactar.

A Francisco Blázquez Araúzo, por la gran ayuda que has brindado para poder llevar a cabo la autorización del ensayo clínico. Sin tu experiencia y conocimiento en el campo de los ensayos clínicos y la normativa correspondiente, todo hubiese sido más complicado.

A Gloria González Fernández, por escucharme, por aconsejarme y por contribuir en mi formación como oftalmóloga.

A la Dra. Ana Sánchez, a la Dra. Soraya Tabera y a la UPC del IBGM por aportarnos las células MSV, y por brindarnos la información necesaria para la consecución de este proyecto.

Al Dr. Girish Kumar Srivastava, por darme la oportunidad de escribir el artículo tipo *Review* y publicarlo.

A Salvatore y a Mariluz, por ayudarme con la revisión y manipulación de los conejos, por enseñarme los procedimientos necesarios para llevar a cabo los cultivos celulares con retinas. Con vuestra compañía la experiencia fue amena y divertida. Sois unos excelentes compañeros.

Al Dr. José Carlos López y a Nieves por ayudarme con el procesamiento de las muestras en el laboratorio de anatomía patológica.

A Maite, por su inestimable ayuda en la realización de las inmunofluorescencias y los ELISAS, sin tu ayuda no hubiese podido finalizar el estudio *in vitro*.

A la Dra. Itziar Fernández por el asesoramiento estadístico.

A todos los integrantes del grupo de Retina del IOBA, por poner su granito de arena durante el desarrollo de mi tesis.

A mis compañeros pre y postdoctorales, que de una u otra forma me brindaron ayuda y me orientaron en relación con los cultivos celulares, dudas del análisis estadístico, y todo lo relacionado con los papeles para el depósito de la tesis.

A todos los trabajadores del IOBA, por la hermosa labor que realizan día a día, para ofrecer un servicio de calidad a los pacientes y para fortalecer las líneas de investigación del instituto.

A mis amigas y amigos, gracias por estar y por existir, con ustedes he podido tener momentos de desconexión y disfrute necesarios para volver al trabajo con más energía.

A mi familia, que aunque lejos están, siempre me dan palabras de aliento y apoyo para continuar con las metas que me propongo. Mis padres y mis hermanos son el mejor ejemplo que tengo de constancia, responsabilidad, trabajo y perseverancia.

A mi esposo, Renier, por su amor, compañía, respeto y por ser mi compañero perfecto. Gracias por apoyarme y por la paciencia que has tenido en mis momentos difíciles.

A mi hijo, Diego, que me ha acompañado durante estos últimos 9 meses en mi vientre, y se ha currado junto a mí la recta final de esta tesis. Gracias por llenarme de alegría, amor y mucha energía para finalizar este proyecto.

En biología es donde tiene su mejor aplicación la bella frase de Saint – Hilaire:

“Delante de nosotros está siempre el infinito”

Los tónicos de la voluntad

Santiago Ramón y Cajal

Premio Nobel de Medicina

A mis padres y a mis hermanos

A mi esposo y a mi hijo

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	18
FINANCIACIÓN.....	20
DIFUSIÓN CIENTÍFICA.....	22
1 INTRODUCCIÓN.....	26
1.1 Justificación.....	26
1.2 Hipótesis.....	29
1.3 Objetivos.....	29
2 ESTADO ACTUAL DEL TEMA.....	34
2.1 Neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica.....	34
2.1.1 Patogenia.....	34
2.1.2 Etiología.....	35
2.1.3 Histopatología.....	36
2.1.4 Tratamiento.....	36
2.2 Ventana terapéutica.....	38
2.3 Células madre mesenquimales (MSC).....	39
2.3.1 Propiedades paracrinas.....	40
2.4 Mesenchymal stem from Valladolid (MSV, PEI 15-007).....	41
3 MATERIAL Y MÉTODOS.....	46
3.1 Diseño del estudio.....	46
3.2 Fase preclínica.....	46
3.2.1 Estudio in vivo: Evaluación de la biocompatibilidad de la inyección intravítrea de MSV en conejos.....	46

3.2.1.1	Animales.....	46
3.2.1.2	Células madre mesenquimales (MSV, PEI 15-007)	47
3.2.1.3	Posología y forma de administración.....	47
3.2.1.4	Grupos experimentales.....	48
3.2.1.5	Preparación prequirúrgica, sedación y anestesia	48
3.2.1.6	Procedimiento de inyección intravítrea.....	49
3.2.1.7	Seguimiento y evaluación in vivo.....	49
3.2.1.8	Punto final y recogida de muestras	52
3.2.1.9	Procesamiento de las muestras	52
3.2.1.10	Evaluación histológica e inmunohistoquímica.....	52
3.2.1.11	Análisis estadístico	53
3.2.2	Fase in vitro: determinación de la supervivencia de las células ganglionares de la retina (RGC) en un modelo organotípico de retina de cerdo en co-cultivo con células madre mesenquimales (MSV, PEI 15-007)	54
3.2.2.1	Células madre mesenquimales (MSV, PEI 15-007)	54
3.2.2.2	Preparación de los explantes de neuroretinas porcinas.....	54
3.2.2.3	Preparación de las placas de cultivo	57
3.2.2.4	Cuantificación de los factores neurotróficos	58
3.2.2.5	Procesamiento de las muestras	59
3.2.2.6	Técnicas de tinción y de inmunohistoquímica.....	60
3.2.2.7	Microscopía.....	64
3.2.2.8	Evaluación del espesor retiniano	64
3.2.2.9	Evaluación de las células gliales.....	64
3.2.2.10	Evaluación de la capa de células ganglionares	65

3.2.2.11	Análisis estadístico	65
3.2.3	Diseño del ensayo clínico.....	66
4	RESULTADOS	70
4.1	Fase preclínica in vivo	70
4.1.1	Animales	70
4.1.2	Resultados clínicos en el grupo de conejos hembra	70
4.1.2.1	Polo anterior	71
4.1.2.2	Polo posterior	72
4.1.2.3	Presión intraocular (PIO).....	73
4.1.3	Resultados histológicos en el grupo de conejos hembra	74
4.1.3.1	Tejidos oculares	74
4.1.3.2	Tejidos sistémicos	75
4.1.4	Resultados clínicos en el grupo de conejos machos.....	77
4.1.4.1	Polo anterior	77
4.1.4.2	Polo posterior	78
4.1.4.3	Presión intraocular.....	78
4.1.5	Resultados histológicos en el grupo de conejos machos	79
4.1.5.1	Tejidos oculares y sistémicos	79
4.1.6	Evaluación de la supervivencia y la migración de las MSV tras la inyección intravítrea en los animales de experimentación	80
4.2	Fase preclínica in vitro	81
4.2.1	Caracterización de las MSV.....	81
4.2.2	Cuantificación de los factores neurotróficos BDNF, CNTF Y GDNF	81

4.2.3	Evaluación histológica y análisis del espesor de las neuroretinas porcinas.....	83
4.2.4	Estudio de las células gliales.....	86
4.2.5	Estudio de las células ganglionares de la retina.....	88
4.3	Protocolo de ensayo clínico.....	92
4.3.1	Resumen del protocolo.....	92
4.3.2	Justificación.....	94
4.3.3	Objetivo general.....	94
4.3.3.1	Variable principal de valoración.....	94
4.3.3.2	Variables secundarias.....	94
4.3.4	Selección de pacientes.....	95
4.3.4.1	Tipo de pacientes.....	95
4.3.4.2	Número de sujetos previstos y justificación del mismo.....	95
4.3.4.3	Criterios de inclusión y exclusión.....	96
4.3.4.4	Criterios diagnósticos para la patología en estudio.....	97
4.3.4.5	Enfermedades asociadas.....	97
4.3.4.6	Criterios previstos para la retirada del estudio.....	98
4.3.4.7	Interrupción prematura del estudio.....	99
4.3.5	Descripción del tratamiento o plan y métodos de tratamiento.....	99
4.3.5.1	Descripción de la dosis, forma de administración y duración del seguimiento post-tratamiento.....	99
4.3.5.2	Normas especiales para el manejo de los fármacos del estudio.....	101
4.3.5.3	Tratamientos concomitantes.....	101
4.3.5.4	Medicación de rescate.....	101

4.3.5.5	Reacciones relacionadas con las inyecciones intravítreas.....	102
4.3.6	Desarrollo del estudio y evaluación de la respuesta	103
4.3.6.1	Visita de selección y evaluación oftalmológica.....	103
4.3.6.2	Desarrollo o secuencia del estudio	104
4.3.7	Acontecimientos adversos.....	109
4.3.7.1	Acontecimientos adversos graves	110
4.3.7.2	Acontecimiento adverso no grave	110
4.3.7.3	Clasificación de la gravedad y relación con el tratamiento	110
4.3.7.4	Monitorización, notificación y documentación de los acontecimientos adversos... ..	112
4.3.8	Consideraciones éticas y legales.....	112
4.3.8.1	Comité Ético (Helsinki).....	112
4.3.8.2	Consentimiento informado.....	113
4.3.8.3	Confidencialidad	113
4.3.9	Consideraciones Prácticas	114
4.3.9.1	Responsabilidades según las normas de buenas prácticas clínicas.	114
4.3.9.2	Responsabilidades del Monitor	115
4.3.9.3	Responsabilidades del Investigador.....	116
4.3.9.4	Informe del estudio clínico / Publicación.....	116
4.3.9.5	Monitorización y Auditoria	117
4.3.9.6	Enmiendas al protocolo	118
4.3.10	Análisis estadístico y tratamiento de datos.....	118
4.3.10.1	Tamaño muestral	118
4.3.10.2	Análisis estadístico	118

5	LIMITACIONES	122
6	DISCUSIÓN	126
6.1	Estudio in vivo	126
6.2	Estudio in vitro	133
6.3	Protocolo de ensayo clínico	140
7	CONCLUSIONES	148
8	CONTINUACIÓN DE LA LINEA DE INVESTIGACIÓN	150
9	BIBLIOGRAFÍA	152
	ANEXO 1.....	168
	ANEXO 2.....	172
	ANEXO 3.....	176
	ANEXO 4.....	186

ABREVIATURAS

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

ANOVA: (*ANalysis Of Variance*) Análisis de la varianza

BDNF: (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) Factor neurotrófico derivado del cerebro

bFGF: (*basic Fibroblast Growth Factor*) Factor de crecimiento de fibroblastos básico

CD: (*Cluster of Differentiation*) Cúmulo de diferenciación

CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica

CNTF: (*Ciliary neurotrophic factor*) Factor neurotrófico ciliar

DMEM: (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) Medio eagle modificado por Dulbecco

EECC: Ensayo Clínico

EPR: Epitelio Pigmentario de la Retina

FISH: (*Fluorescence In Situ Hybridization*) Hibridación fluorescente in situ

GFAP: (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) Proteína glial fibrilar ácida

GMP: (*Good Manufacturing Practice*) Buenas prácticas de fabricación

H-E: Hematoxilina – Eosina

HLA-DR: (*Human leucocyte Antigen Haplotype DR*) Antígeno leucocitario humano haplotipo DR

IBGM: Instituto de Biología y Genética Molecular

IGF1: (*Insulin-like Growth Factor 1*) Factor de crecimiento insulínico tipo 1

INL: (*Inner Nuclear Layer*) Capa nuclear interna

IOBA: Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada

IPL: (*Inner Plexiform Layer*) Capa plexiforme interna

ABREVIATURAS

ISCT: (*International Society for Cellular Therapy*) Sociedad internacional para la terapia celular

MHC: (*Major Histocompatibility Complex*) Complejo mayor de histocompatibilidad

MSC: (*Mesenchymal Stem Cels*) Células madre mesenquimales

MSV: (*Mesenchymal Stem from Valladolid*) Células madre mesenquimales de Valladolid

NGF: (*Nerve Growth Factor*) Factor de crecimiento neural

NO: Nervio Óptico

NOIA: Neuropatía Óptica Isquémica Anterior

NOIAA: Neuropatía Óptica Isquémica Anterior Arterítica

NOIANA: Neuropatía Óptica Isquémica anterior No Arterítica

NT3: (*NeuroTrophin 3*) Neurotrofina 3

PBS: (*Phosphate Buffer Saline*) Tampón fosfato salino

PEI: Producto En Investigación

PF: ParaFormaldehido

PIO: Presión IntraOcular

RGC: (*Retinal Gaglion Cells*) Células Ganglionares de la Retina

SEM: (*Standard Error of the Mean*) Error estándar de la media

SNC: Sistema Nervioso Central

FINANCIACIÓN

Parte de este trabajo de investigación ha sido financiado por el siguiente proyecto de investigación:

“Evaluación de la seguridad de la inyección intravítrea de células madre mesenquimales como posible tratamiento para pacientes con neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica aguda”. Consejería de Educación – Junta de Castilla y León. Orden EDU/956/2014, VA118U14. 2014 – 2016. IP: José carlos Pastor Jimeno

La financiación personal durante el desarrollo de este trabajo ha sido posible gracias a la concesión del siguiente contrato predoctoral:

“Ayudas destinadas a financiar la contratación predoctoral de personal investigador de reciente titulación, cofinanciadas por el Fondo Social Europeo”, ayudas concedidas para el desarrollo de tesis doctorales. Consejería de Educación – Junta de Castilla y León. Orden EDU/310/2015. Actividad investigadora desarrollada en el IOBA, Universidad de Valladolid.

DIFUSIÓN CIENTÍFICA

La presente tesis doctoral ha dado lugar, hasta el momento, a la siguiente publicación científica:

Labrador-Velandia S, Alonso-Alonso ML, Alvarez-Sanchez S, González-Zamora J, Carretero-Barrío I, Pastor JC, Fernandez-Bueno I, Srivastava GK. *Mesenchymal stem cell therapy in retinal and optic nerve diseases: An update of clinical trials*. World J Stem Cells. 2016;8:376-383. Review.

Además, las siguientes publicaciones se encuentran en fase de revisión / preparación respectivamente:

Labrador-Velandia S, Di Lauro S, Alonso-Alonso ML, Tabera Bartolome S, Srivastava GK, Pastor JC, Fernandez-Bueno I. *Biocompatibility of intravitreal injection of human mesenchymal stem cells in immunocompetent rabbits*. Revista Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology. En revisión

Labrador-Velandia S, Srivastava GK, Garcia-Gutierrez MT, Tabera-Bartolome S, Pastor JC, Fernandez-Bueno I. *Neuroprotection of retinal ganglion cells by neurotrophic factors secreted by mesenchymal stem cells in co-culture with porcine neuroretinas*. En preparación

Parte de este trabajo de tesis doctoral ha sido presentado en las siguientes reuniones científicas nacionales e internacionales:

Labrador Velandia S, Di Lauro S, Tabera Bartolome S, Srivastava GK, Pastor JC, Fernandez-Bueno I. *Intravitreal mesenchymal stem cells are safe and well-tolerated in pigmented-rabbit eyes*. Póster. Annual meeting of the Association for research in Vision and Ophthalmology (ARVO). Denver, EE.UU. Mayo de 2015. Invest Ophthalmol Vis Sci 2015, 56, 1829.

Fernandez-Bueno I, **Labrador-Velandia S**, Di Lauro S, Alonso-Alonso ML, Tabera-Bartolome S, Srivastava GK, Pastor JC. *Safety and tolerance of intravitreal mesenchymal stem cells in*

DIFUSIÓN CIENTÍFICA

pigmented rabbit eyes. Póster. European College of Veterinary Ophthalmologists (ECVO). Helsinki, Finlandia. Mayo de 2015.

Fernandez-Bueno I, **Labrador-Velandia S**, Di Lauro S, Alonso-Alonso ML, Tabera-Bartolome S, Srivastava GK, Pastor JC. *Seguridad y tolerancia de la inyección intravítrea de células madre mesenquimales en conejos*. Comunicación oral. XX Congreso internacional de la Sociedad Española de Cirugía Veterinaria (SECIVE). León, España. Junio de 2015.

Labrador Velandia S, Di Lauro S, Alonso-Alonso ML, Tabera Bartolome S, Srivastava GK, Pastor JC, Fernandez-Bueno I. *Preclinical safety and feasibility of intraocular injection of human mesenchymal stem cells in immunocompetent pigmented-rabbit*. Póster. Congreso de la European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT) y de la International Society for Stem Cell Research (ISSCR). Florencia, Italia. Octubre de 2016. Human Gene Therapy 2016, 27:a2–a185. DOI: 10.1089/hum.2016.29035.abstracts

Labrador-Velandia S, Srivastava GK, Garcia-Gutierrez MT, Tabera-Bartolome S, Pastor JC, Fernandez-Bueno I. *Evaluation of neurotrophic factors secreted by mesenchymal stem cells in co-culture with porcine neuroretinas*. Póster. Annual meeting of the Association for research in Vision and Ophthalmology (ARVO). Baltimore, EE.UU. Mayo de 2017.

1. INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Justificación

Las neuropatías ópticas isquémicas anteriores (NOIAs) representan un grupo de desórdenes isquémicos de la cabeza del nervio óptico (NO) que afectan de forma grave e irreversible la visión,¹ de los cuales, la NOIA no arterítica (NOIANA) constituye la forma más prevalente en pacientes mayores de 50 años de edad representando el 96% de las NOIA.¹ Esta patología está causada por un infarto a nivel de la cabeza del nervio óptico, y clínicamente se caracteriza por la pérdida de agudeza visual monocular aguda/subaguda e indolora, la existencia de un defecto pupilar aferente relativo, defectos en el campo visual, una discromatopsia, y edema de papila,² que en un período aproximado de 6 a 8 semanas suele evolucionar hacia la atrofia del NO.³

Su incidencia oscila entre 2 y 10 casos por cada 100.000 habitantes/año,⁴⁻⁶ lo que representa alrededor de 1.500 a 6.000 casos nuevos cada año en Estados Unidos.^{4, 5} Además, existe un riesgo alto de presentar NOIANA en el ojo contralateral (del 15 al 25% a los 5 años), debido probablemente a la presencia de características similares en la estructura de la cabeza del NO (pequeño y con compresión axonal) así como también a la presencia de factores de riesgo sistémicos, fundamentalmente cardiovasculares.^{7, 8} Debido a su mecanismo fisiopatológico multifactorial, los tratamientos que se han empleado no han sido eficaces en la recuperación de la función visual de los pacientes afectados, ni tampoco han logrado prevenir la afectación del ojo contralateral, de manera que, actualmente, la actuación sobre estos pacientes se orienta hacia el control de los factores de riesgo cardiovascular.

Tomando en cuenta que el NO se considera parte del sistema nervioso central (SNC), se puede establecer una similitud entre el infarto cerebral (ictus) y el infarto del NO. En este sentido, se conoce que, minutos después de instaurado un ictus, las neuronas mueren formando una zona de tejido infartado denominada “core” o núcleo.⁹ Esta zona infartada se encuentra rodeada por una región denominada “zona de penumbra”, la cual está compuesta por tejido cerebral lesionado con riesgo de infartarse, pero a su vez potencialmente viable y que podría beneficiarse de una acción terapéutica oportuna.¹⁰ Por su parte, en la fase aguda de la NOIANA,

1. INTRODUCCIÓN

el infarto del nervio óptico suele ser sectorial, generalmente afecta a uno o dos cuadrantes de la cabeza del NO, no obstante, el edema ocasionado por la isquemia termina dañando por compresión a las fibras de los cuadrantes inicialmente no afectados por la isquemia. Por ello, las terapias encaminadas al tratamiento de estas patologías de origen isquémico, tienen como objetivo actuar rápidamente durante la fase aguda o inicial, con la intención de promover la recuperación de los tejidos con capacidad de recuperación o al menos evitar que el daño progrese.

Tomando en cuenta que la NOIANA es una entidad clínica que afecta gravemente la visión, tiene un riesgo alto de afectación del ojo contralateral y además no dispone de ningún tratamiento eficaz, parece justificada la evaluación de nuevas terapias que mantengan o mejoren la función visual de los pacientes afectados. En este sentido, las terapias avanzadas, en concreto la terapia celular, mediante el uso de células madre mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés) ofrece un nuevo enfoque terapéutico basado en la neuroprotección¹¹ a través de la secreción de factores neurotróficos que actúan a nivel paracrino y promueven la recuperación de los tejidos afectados.¹²

En este contexto, la Unidad de Producción Celular (UPC) del Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM) de la Universidad de Valladolid produce MSC las cuales están aprobadas por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) para su uso clínico en investigación, con el nombre de *Mesenchymal Stem from Valladolid* (MSV) y bajo el número de producto en investigación (PEI) 15-007. Estas células son obtenidas de la médula ósea de adultos donantes sanos y, por lo tanto, su utilización no presenta los problemas éticos que conlleva el uso de células madre embrionarias.¹³ Por otra parte, las MSC (MSV, PEI 15-007) no son inmunogénicas, y por lo tanto, su uso alogénico no requiere de la inmunosupresión del individuo receptor.¹⁴ Así, las MSV están siendo utilizadas en ensayos clínicos (EECC) en el ámbito de la traumatología y la oftalmología, aunque no se han aplicado todavía en la patología del presente estudio. Por esta razón, surgió la idea de diseñar un EECC piloto fase II de terapia celular para pacientes con NOIANA mediante la inyección intravítrea de MSV en la fase aguda de la patología. Con el diseño inicial de EECC se solicitó a la AEMPS una evaluación previa a su solicitud formal en la que recomendaron que, al tratarse de una nueva indicación clínica y una

nueva vía de administración, se probara la seguridad preclínica del PEI previo a su utilización en humanos con NOIANA.

Por todo ello, este trabajo lleva a cabo la evaluación de la biocompatibilidad de las MSV por vía intravítrea in vivo (en animales de experimentación), así como también su potencial eficacia in vitro, mediante la evaluación del efecto neuroprotector y de regeneración que ofrecen estas células mediante la secreción de factores neurotróficos en un modelo de cultivo organotípico de neurorretina. Así, los resultados de este proyecto permitirían sentar las bases para aplicar esta nueva opción terapéutica en el EECC anteriormente mencionado, lo que sería altamente innovador, ya que a día de hoy existen pocos EECC en los que se utilice MSC en patologías retinianas y del nervio óptico, y ninguno de ellos está orientado hacia el tratamiento de la patología de estudio en este trabajo.

1. INTRODUCCIÓN

1.2 Hipótesis

La terapia celular con células madre mesenquimales procedentes de médula ósea (MSV, PEI 15-007) inyectadas por vía intravítrea constituye una opción de tratamiento en pacientes con neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica (NOIANA) aguda, ya que a través de las propiedades paracrinas de estas células (secreción de factores neurotróficos, inmunomoduladores y antiapoptóticos) se puede prevenir o reducir la progresión de la degeneración axonal que se produce en esta patología del nervio óptico, en las zonas no directamente afectadas por el proceso isquémico inicial.

1.3 Objetivos

El objetivo general de este trabajo ha sido evaluar la seguridad y la potencial eficacia preclínica de las células madre mesenquimales (MSV, PEI 15-007) mediante el estudio de la biocompatibilidad de estas células tras la inyección intravítrea en animales inmunocompetentes, y el estudio del efecto neuroprotector de las MSV en un modelo organotípico de neurorretina porcina; así como proponer un protocolo de ensayo clínico en pacientes con NOIANA en su fase aguda. Para ello, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. In vivo: Evaluar la biocompatibilidad de la inyección intravítrea de las células madre mesenquimales (MSV, PEI 15-007) en conejos pigmentados inmunocompetentes.
 - Evaluar la seguridad y la tolerancia de la administración intravítrea de MSV mediante la observación de los efectos adversos a nivel ocular (exploración oftalmológica) y mediante el estudio histológico de los tejidos oculares tras la inyección intravítrea.
 - Evaluar la persistencia, la distribución y la migración de las MSV tras la inyección intravítrea en tejidos oculares y otros órganos sistémicos, como los hematopoyéticos (bazo e hígado) y gonadales (ovarios y testículos).

2. In vitro: Evaluar la supervivencia de las células ganglionares de la retina (RGC) en un modelo de cultivo organotípico de neurorretina porcina en cocultivo con células madre mesenquimales (MSV, PEI 15-007).

- Evaluar y caracterizar las modificaciones tisulares y celulares, concretamente de la capa de fibras nerviosas y de las RGC, que se producen a lo largo del cultivo con y sin MSV, mediante tinciones convencionales y técnicas de inmunohistoquímica.
- Evaluar la secreción de los factores neurotróficos *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF), *Ciliary Neurotrophic Factor* (CNTF) y *Glial-Derived Neurotrophic Factor* (GDGF) por parte de las MSV en co-cultivo con las retinas porcinas.

3. Diseñar un ensayo clínico piloto para la evaluación de la seguridad y la tolerancia de la inyección intravítrea de las MSV (PEI 15-007) en pacientes con NOIANA en su fase aguda.

- Diseñar un protocolo de ensayo clínico fase II para la evaluación de la seguridad de la inyección intravítrea de las MSV en pacientes con NOIANA en su fase aguda.
- Obtener la aprobación del EECC por parte del Comité de Ética de Investigación Clínica (CEIC) y de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), para poder llevarlo a cabo.

2. ESTADO ACTUAL DEL TEMA

2 ESTADO ACTUAL DEL TEMA

2.1 Neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica

La neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica (NOIANA), denominada también arteriosclerótica, constituye la neuropatía óptica isquémica más prevalente en pacientes mayores de 50 años de edad (61.0 ± 12.3 años) y representa el 96% de las NOIA.¹ Esta patología está causada por un infarto a nivel de la cabeza del nervio óptico, y clínicamente se caracteriza por la pérdida de agudeza visual monocular aguda/subaguda e indolora, la presencia de un defecto pupilar aferente relativo, defectos en el campo visual, una discromatopsia y edema de papila,² que en un período aproximado de 6 a 8 semanas suele evolucionar hacia la atrofia del nervio óptico.³ La incidencia anual de la NOIANA estimada en los Estados Unidos es de 2,3 a 10,2 casos por cada 100.000 habitantes,⁴⁻⁶ lo que representa alrededor de 1.500 a 6.000 casos nuevos al año.^{4,5}

2.1.1 Patogenia

La NOIANA se produce por una insuficiencia circulatoria en la cabeza del NO,¹⁵ que genera isquemia a nivel de la porción prelaminar/laminar del NO. La cabeza del NO recibe su irrigación por arteriolas procedentes del anillo de Zinn-Haller (círculo anastomótico arterial derivado de las arterias ciliares posteriores cortas), por lo tanto, la NOIANA es un proceso isquémico debido a la afectación de los vasos de pequeño calibre, tales como arteriolas o capilares, y no debido a la afectación de vasos de gran calibre.¹⁵

Las hipótesis más aceptadas que intentan explicar la patogenia de la NOIANA se basan en la hipoperfusión nocturna de la cabeza del NO ¹⁶ o en la disrupción de la autorregulación de la perfusión sanguínea del NO.¹⁵ En este sentido, a diferencia de la NOIAA, que se caracteriza por la trombosis inflamatoria de las arterias ciliares posteriores secundaria a una arteritis de células gigantes (Enfermedad de Horton), la NOIANA es debida a una hipoperfusión transitoria de la microcirculación de la cabeza del NO asociada a factores de riesgo cardiovascular.⁷ De esta manera, la severidad del daño isquémico y la posible recuperación de la función visual tras un

2. ESTADO ACTUAL DEL TEMA

episodio de NOIANA está directamente asociada con la extensión del tejido afectado y la duración de la hipoperfusión circulatoria de la cabeza del NO.¹⁷

2.1.2 Etiología

Diversos estudios indican que la NOIANA tiene un origen multifactorial.¹⁷ Los factores que predisponen a su desarrollo se pueden agrupar en dos categorías, oculares o sistémicos; sin embargo, no todos los pacientes que presentan estos factores de riesgo desarrollan una NOIANA.¹⁷

Un factor de riesgo ocular fuertemente relacionado es la presencia de un canal escleral estrecho lo que origina un excesivo empaquetamiento de las estructuras de la cabeza del NO sobre todo de los axones de las células ganglionares de la retina (RGC).¹⁸ Como es bien conocido, la cabeza del NO representa la confluencia de aproximadamente 1 a 1,2 millones de axones procedentes de las RGC, que atraviesan la esclera a través de las fenestraciones de la lámina cribosa y que, posteriormente constituyen el NO. En este sentido, se ha descrito que el 97% de los pacientes que presentan una NOIANA presentan discos ópticos pequeños (menores de 1,2 mm de diámetro) con una excavación fisiológica pequeña o ausente (relación excavación del disco/radio del disco $\leq 0,2$) lo que se denomina “papila de riesgo” (*disk at risk*). Otros factores de riesgo ocular incluyen la presencia de drusas en el NO y la existencia de hipertensión ocular o glaucoma.¹⁵

Entre los factores de riesgo sistémicos se encuentran la edad avanzada, la hipotensión arterial nocturna, la diabetes mellitus, la hipertensión arterial, la hipercolesterolemia, el síndrome de apnea del sueño, el uso de ciertos fármacos (vasodilatadores periféricos), y posiblemente un número de secuencias genéticas o polimorfismos específicos tanto del ácido desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial como de los genes asociados con la función vascular, que han sido objeto de estudio en diversos trabajos.¹⁹⁻²⁵

2.1.3 Histopatología

Histopatológicamente la NOIANA se caracteriza por edema isquémico, y la posterior aparición de una degeneración cavernosa y una atrofia de los axones del nervio óptico, revelados tanto en estudios *post-mortem* en humanos como en modelos experimentales animales de NOIANA.^{19-22, 26-32} El daño axonal isquémico tiene como consecuencia un daño metabólico secundario de las RGC, lo que a su vez induce la apoptosis de las mismas por degeneración retrógrada. Estudios realizados en modelos murinos de NOIANA han revelado que una semana tras la isquemia inicial, las RGC comienzan a morir vía apoptosis, detectando una pérdida de hasta el 50% de las RGC a las dos semanas del daño isquémico.^{28, 33} Además, otros estudios apuntan que la isquemia/hipoxia de los axones de las RGC en el NO produce un estasis del flujo axoplásmico lo que afecta a la secreción de factores de crecimiento por parte de las RGC, tales como el *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF), el *Ciliary Neurotrophic Factor* (CNTF), el *Glial-Derived Neurotrophic Factor* (GDGF) y la NeuroTrofina 3 (NT3), entre otros, los cuales son esenciales para la nutrición y la supervivencia de las RGC.³⁴

Complementariamente, la muerte celular por isquemia provoca un aumento de las concentraciones de glutamato, que a su vez incrementa el daño celular y la apoptosis por excitotoxicidad.³⁰ Por otra parte, la inflamación local aumenta el daño celular no solo en el área afectada sino también en la zona de penumbra adyacente al infarto, similar a lo que ocurre en el SNC debido a un daño isquémico, probablemente por la inhibición de la regeneración y la remielinización axonal, así como también, debido a la formación de tejido cicatricial glial.³⁵

2.1.4 Tratamiento

Actualmente no hay ninguna terapia que haya demostrado ser eficaz para la recuperación de la función del NO tras un episodio de NOIANA. Se han utilizado diversos tratamientos en pacientes afectados de NOIANA, como la administración de ácido acetilsalicílico,^{36, 37} la fenestración de la cabeza del NO,^{38, 39} los corticosteroides,^{40, 41} la levodopa,^{42, 43} la difenilhidantoína, los estrógenos,⁴⁴ la eritropoyetina,⁴⁵ la brimonidina⁴⁶ y el ranibizumab,⁴⁷ sin embargo, ninguno de ellos ha logrado prevenir la afectación del ojo contralateral ni tampoco han demostrado mejorar la función visual de los pacientes afectados, evaluada mediante la

2. ESTADO ACTUAL DEL TEMA

exploración oftalmológica y la realización de diferentes pruebas complementarias (campimetría, test de colores, tomografía de coherencia del nervio óptico, entre otras).

Ácido acetilsalicílico (Aspirina®, Bayer): existe una clara controversia con respecto a su acción terapéutica en las NOIANA. Así, en un estudio retrospectivo realizado por Kupersmith y cols. (1997), los cuales revisaron 131 pacientes con NOIANA durante 2 años, encontraron que el uso de Aspirina® 300 mg de 2 a 3 veces a la semana, reducía el riesgo de NOIANA en el ojo contralateral;³⁶ mientras que en otro estudio retrospectivo de larga duración realizado por Beck y cols. (1997), en una cohorte de 431 pacientes con NOIANA, observaron que la Aspirina® no ofrecía beneficio a largo plazo en la reducción del riesgo de NOIANA en el ojo contralateral a los 5 años.³⁷

Fenestración de la cabeza del NO: este procedimiento quirúrgico se llevó a cabo en un ensayo clínico denominado "*the ischemic optic neuropathy decompression trial*" realizado en 25 centros de Estados Unidos (1995), en el que randomizaron a 125 pacientes con NOIANA como grupo control y a 119 pacientes con NOIANA para cirugía. El procedimiento consistía en fenestrar las vainas del NO, realizando al menos dos agujeros. El seguimiento de 12 meses tras la cirugía no demostró ningún beneficio en la función visual, por el contrario, demostró ser perjudicial ya que el 24% de los ojos tratados sufrieron mayor pérdida visual, en comparación con el 12% de los ojos no tratados.^{38, 39}

Corticosteroides: Hayreh y Zimmerman (2008), en un estudio realizado en 613 pacientes con NOIANA (312 tratados con corticoides vs. 301 no tratados), sugieren que una dosis estándar de corticoides vía oral durante la fase aguda de la NOIANA puede mejorar la agudeza visual en aproximadamente un 69,8%. Sin embargo, los resultados de este estudio no han sido corroborados por el estudio prospectivo realizado por Rebolleda y cols. (2012), en el que se utilizó la misma dosis estándar por vía oral. Actualmente, los corticoides no están reconocidos como tratamiento para la NOIANA.^{40, 41, 48, 49}

Levodopa: fue utilizada en un estudio clínico retrospectivo no randomizado en 37 pacientes con NOIANA (18 tratados con 100 mg levodopa/25 mg carbidopa vs. 19 no tratados) realizado por Johnson y cols. (2000). A pesar de que los resultados apoyaban la eficacia de la levodopa en la

fase aguda de la NOIANA, este fármaco no fue aceptado como tratamiento, debido a que los resultados se basaban en el análisis retrospectivo de una cohorte con un escaso número de pacientes y con muchos factores de confusión que pudieron influir en los resultados.^{42, 43}

Agentes neuroprotectores: los estrógenos se han utilizado como fármacos neuroprotectores en procesos isquémicos del SNC. Por ello Bernstein y cols. (2007), probaron este fármaco en un modelo murino de NOIA y demostraron que no mejoraba la supervivencia de las RGC tras el proceso isquémico.⁴⁴

La eritropoyetina también ha sido evaluada como fármaco neuroprotector. Modarres y cols. (2011) realizaron un ensayo clínico en 31 pacientes con NOIANA, a los cuales se les aplicó una inyección intravítrea de eritropoyetina (2000 UI) durante el primer mes tras el inicio de los síntomas de la enfermedad y se realizó un seguimiento de seis meses tras la inyección. Los resultados mostraron mejoría de la agudeza visual (AV) durante los tres primeros meses tras la inyección. Tras este corto período, la visión empezaba a deteriorarse. Actualmente no se han publicado más estudios con este fármaco.⁴⁵

La brimonidina fue utilizada en un EECC multicéntrico, doble enmascarado, en 36 pacientes con NOIANA randomizados para recibir tratamiento placebo vs. brimonidina 0,2% (Alphagan®, Allergan). Este estudio se detuvo después del primer análisis interno debido a que el uso de Alphagan® en pacientes con NOIANA no mostró ningún efecto beneficioso.⁴⁶

Por todo ello, puede asegurarse que ninguno de los tratamientos potenciales previamente descritos en la literatura ha logrado mejorar la función visual de los pacientes, ni tan siquiera prevenir la afectación del ojo contralateral.

2.2 Ventana terapéutica

Como se ha comentado (apartado 2.1.3), estudios realizados en modelos murinos de NOIANA sugieren la existencia de una ventana terapéutica de entre 2 y 3 semanas, ya que tras el daño isquémico inicial, las RGC comienzan a morir por apoptosis a los 7 días, fenómeno que se prolonga a lo largo del tiempo y que se traduce en una pérdida de hasta el 50% de las RGC a las

2. ESTADO ACTUAL DEL TEMA

dos semanas del accidente vascular.^{28, 33} Así, este retraso en la iniciación de la muerte de las RGC sugiere una potencial “ventana terapéutica” al menos en estos modelos animales. Si se asume que este fenómeno ocurre de manera similar en los seres humanos, se podría aceptar que también existe un período con posibilidades de actuación terapéutica en los pacientes afectados por esta patología y parece lógico pensar que un tratamiento precoz reduciría considerablemente el daño axonal final.

2.3 Células madre mesenquimales (MSC)

Las MSC son células multipotentes, con capacidad de autorenovación, que pueden ser aisladas de distintas fuentes celulares tales como la médula ósea, el tejido adiposo, la sangre del cordón umbilical y la placenta.⁵⁰ Estas células se pueden aislar fácilmente y se expanden rápidamente *in vitro* después de un corto período de latencia.⁵¹ Las MSC constituyen una población celular muy heterogénea, por ello, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, por sus siglas en inglés) estableció, en 2006, tres criterios principales para caracterizar y definir a las MSC, como son: la capacidad de adherencia al plástico, la expresión de ciertos antígenos de superficie (CD105, CD73 y CD90) en ausencia de antígenos hematopoyéticos (CD45, CD34, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B), y la capacidad de diferenciación *in vitro* a osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de cultivo.⁵² Además, estas células pueden diferenciarse hacia otros linajes celulares como células hematopoyéticas, células miocárdicas, células gliales y neuronas.^{50, 53-57}

En los últimos años ha crecido exponencialmente el interés sobre las MSC por su capacidad de influir sobre el sistema inmune. Así, se ha descrito que las MSC ejercen un efecto inhibitorio profundo tanto *in vivo* como *in vitro* sobre la proliferación de los linfocitos T, y muestran efectos similares sobre las células B, las células dendríticas y las células *natural killer*. A su vez, se considera que las MSC son “inmunoprivilegiadas” ya que no expresan en su superficie el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II, por sus siglas en inglés), así como tampoco moléculas coestimuladoras (CD40, CD80, y CD86) implicadas en el rechazo de los trasplantes. Debido a estas características, las MSC no son susceptibles a la lisis mediada por

los linfocitos T citotóxicos y las *natural killer*, por lo que los trasplantes alogénicos de estas células no requieren de la inmunosupresión del individuo receptor.^{14, 58}

2.3.1 Propiedades paracrinas

La posible aplicación clínica de las MSC en patologías retinianas y del nervio óptico se basa en dos enfoques terapéuticos principales, como son el reemplazo celular y la neuroprotección (a través de su acción paracrina). El reemplazo celular tiene sus limitaciones, debido a que la diferenciación de las MSC hacia células retinianas funcionales aún es un campo que requiere un largo camino por explorar y en el que se avanza muy lentamente. Sin embargo, el uso de las MSC como terapia neuroprotectora, para promover la recuperación del nervio óptico y de las células retinianas, se está aplicando actualmente en modelos animales y en EECC en humanos.^{56, 59}

Una de las principales características de las MSC es la capacidad paracrina para la secreción de factores tróficos, citoquinas y moléculas de señalización que promueven la angiogénesis y la regeneración tisular, inhiben la fibrosis y la apoptosis, y modulan el sistema inmune y la inflamación, lo que permite mejorar la supervivencia de las células vecinas (Tabla 1).⁶⁰ Así, de acuerdo con estas propiedades, la eficacia de las MSC se puede atribuir a la producción de factores que promueven el crecimiento neuronal endógeno y la angiogénesis, estimulan la conexión sináptica y la remielinización de los axones dañados, disminuyen la apoptosis, y regulan la inflamación.⁶¹

Dentro de los factores secretados por las MSC, donde destacan los factores neurotróficos que pertenecen a la familia de las neurotrofinas (moléculas que intervienen en el trofismo y la plasticidad neuronal) se encuentran el BDNF, el *Nerve growth factor* (NGF) y la NT3, así como otros factores neurotróficos como el CNTF, el GDNF, el *Insulin-like Growth Factor 1* (IGF1), y el *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF), los cuales han demostrado ser efectivos en la protección de las células retinianas y del nervio óptico tras un daño agudo al menos en estudios preclínicos.^{62, 63}

2. ESTADO ACTUAL DEL TEMA

Tabla 1. Factores secretados por las células madre mesenquimales

Factores secretados	Función
Neurotróficos	
<i>Brain-derived neurotrophic factor</i> (BDNF) ^{64, 65}	Mejora la supervivencia de las RGC (supresión de la caspasa-2) y tras el daño por glutamato y H ₂ O ₂ .
<i>Ciliary neurotrophic factor</i> (CNTF) ^{66, 67}	Incrementa la supervivencia de las RGC (activación de la STAT3)
<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i> (GDNF) ^{68, 69}	Mejora la supervivencia de las RGC y disminuye la activación de las células gliales en la retina y en el nervio óptico.
<i>Nerve growth factor</i> (NGF)	Promueve la regeneración neural
<i>Neurotrophin-3</i> (NT3)	Interviene en el trofismo y la plasticidad neuronal
Pro-angiogénesis	
<i>Fibroblast growth factor – 2</i> (FGF-2) ^{70, 71}	Induce la proliferación de células endoteliales y del músculo liso
<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i> (MCP-1) ⁷²	Induce angiogénesis; recluta monocitos
<i>Platelet-derived growth factor</i> (PDGF) ⁷¹	Induce la proliferación de células del músculo liso
<i>Placental growth factor</i> (PIGF) ^{71, 72}	Promueve la angiogénesis
<i>Vascular endothelial growth factor</i> (VEGF) ^{70, 72}	Induce la proliferación y migración de células endoteliales
<i>Transforming growth factor – β</i> (TGF- β) ⁷¹	Promueve la maduración de los vasos
Remodeladores de la matriz extracelular	
<i>Metalloproteinase – 1,2,9</i> (MMP-1, MMP2 y MMP9) ⁷¹	Degradan la matriz extracelular
<i>Plasminogen activator</i> (PA) ⁷¹	Degrada moléculas de la matriz extracelular
<i>Tumor necrosis factor – α</i> (TNF-α) ⁷¹	Degrada la matriz extracelular; promueve la apoptosis
Proliferación, reclutamiento, y supervivencia de células madre	
<i>Basic fibroblast growth factor</i> (bFGF) ⁷²	Mejora la proliferación de células endoteliales y del músculo liso
<i>Insulin-like growth factor-1</i> (IGF-1) ⁷⁰	Regula el crecimiento y la proliferación celular e inhibe la apoptosis
<i>Secreted frizzled-related protein-1 y 2</i> (SFRP 1 y 2) ⁷³	Inhibe la apoptosis y mejora el desarrollo celular
<i>Granulocyte colony stimulating factor</i> (G-CSF) ⁷⁴	Incrementa la proliferación y la diferenciación de los neutrófilos
<i>Macrophage colony stimulating factor</i> (M-CSF) ⁷⁴	Incrementa la proliferación y la diferenciación de los monocitos
<i>Stem cell-derived factor</i> (SDF) ⁷¹	Promueve la migración celular
Inmunomoduladores	
<i>Heme oxygenase-1</i> (HO1) ⁷⁵	Inhibe la proliferación de células T
<i>Hepatocyte growth factor</i> (HGF) ⁷⁰	Inhibe la proliferación de células T CD4+
<i>Indoleamine 2,3-dioxygenase</i> (IDO) ⁷⁶	Inhibe la proliferación de células de la inmunidad innata y adaptativa
<i>Inducible nitric oxide synthase</i> (iNOS) ⁷⁷	Inhibe la inflamación
<i>Interleukin-6</i> (IL-6) ⁷⁴	Regula la inflamación e induce la producción de VEGF
<i>Prostaglandin E2</i> (PGE2) ⁷⁸	Inhibe la inflamación

Tomado de Williams and Hare (2011)⁷⁹ y modificado por los autores del presente estudio

2.4 Mesenchymal stem from Valladolid (MSV, PEI 15-007)

Las MSV (PEI 15-007) son células producidas por la Unidad de Producción Celular (UPC) del Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM) de la Universidad de Valladolid, que fueron obtenidas a partir de células mesenquimales procedentes de médula ósea de donantes adultos

y reexpandidas *ex vivo* en una sala blanca bajo estricta normativa de buenas prácticas de fabricación (GMP, por sus siglas en inglés) y de acuerdo al Real Decreto-ley 9/2014, de 4 de julio, por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos.

Se trata de células que poseen características propias de célula madre, es decir, capacidad de autorrenovación, elevado potencial proliferativo y de diferenciación hacia diferentes tejidos. Sus características inmunofenotípicas son inespecíficas, puesto que comparten marcadores fenotípicos propios de células endoteliales, epiteliales y musculares. Aunque carecen de marcadores fenotípicos propios de células hematopoyéticas y secretan gran variedad de citoquinas que actúan sobre el desarrollo y la regulación del microambiente celular. Así, el panel de expresión inmunofenotípico de estas células se basa en marcadores tanto hematopoyéticos como de moléculas de adhesión y de histocompatibilidad: CD14, CD34, CD45, HLA-DR, CD105, CD90, CD73, y CD166.

Las células MSV son positivas para los antígenos establecidos por la ISCT (CD105, CD90, CD73, y CD166) y negativas para marcadores propios de células hematopoyéticas (CD14, CD34, CD45 y HLA-DR) (Tabla 2). Entre los marcadores inmunofenotípicos negativos se encuentra el marcador Antígeno Leucocitario Humano haplotipo DR (HLA-DR, por sus siglas en inglés) que se corresponde con el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II.⁵⁸ Al resultar negativo, confiere a estas células inmunotolerancia, aún siendo trasplantes alogénicos pero impidiendo la alorreactividad frente al receptor.¹⁴

Tabla 2. Inmunofenotipo de las células MSV

Negativos	CD14	CD34	CD45	HLA-DR
Positivos	CD105	CD90	CD73	CD166

Las MSV están aprobadas por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS) como producto en fase de investigación clínica (PEI N°15-007) en diversos EECC de cardiología, traumatología y oftalmología (superficie ocular), que se muestran a continuación:

2. ESTADO ACTUAL DEL TEMA

- Ensayo clínico EUDRA-CT: 2005-005498-36. "Estudio fase I para valorar la eficacia y seguridad de la inyección transendocárdica de células mesenquimales autólogas derivadas de médula ósea guiado por mapeo electromecánico como angiogénesis terapéutica".
- Ensayo clínico EUDRA-CT: 2008-001191-68. "Regeneración del disco intervertebral lumbar mediante MSV". Promotor: Fundación Teknon, Barcelona.
- Ensayo clínico EUDRA-CT: 2009-0170450-11. "Regeneración del cartílago Articular en Gonartrosis de IIº, IIIº y IVº grados mediante infiltración articular de MSV". Promotor: Fundación Teknon, Barcelona.
- Ensayo Clínico EUDRA-CT: 2010-023535-42. "Terapias Avanzadas para la reconstrucción de la superficie ocular. Trasplante alogénico de células madre epiteliales limbares (TACM-LE) frente a mesenquimales de médula ósea (TAC-MO), ensayo clínico randomizado y doble enmascarado". Promotor: Universidad de Valladolid. Unidad de Terapias Avanzadas IOBA/IBGM.
- Ensayo clínico EUDRA-CT: 2011-005321-51. "Tratamiento de la gonartrosis con células mesenquimales alogénicas (MSV)". Promotor: Fundación Parque Científico de la Uva, Valladolid.
- Ensayo clínico EUDRA-CT: 2012-004441-32. "Ensayo clínico piloto para determinar la viabilidad y seguridad de las MSV criopreservadas en el tratamiento de la gonartrosis". Promotor: Fundación Teknon, Barcelona.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Diseño del estudio

En el presente proyecto se pueden diferenciar dos partes. Una fase preclínica y una fase clínica. La fase preclínica está compuesta por experimentos *in vivo* (inyecciones intravítreas de MSV en conejos) y experimentos *in vitro* (MSV en co-cultivo con neurorretinas porcinas). La fase clínica comprende el diseño de un ensayo clínico piloto fase II para la utilización de las MSV por vía intravítrea en pacientes afectados de NOIANA aguda, y la obtención de la aprobación del EECC por parte de los organismos competentes (CEIC y AEMPS).

3.2 Fase preclínica

3.2.1 Estudio *in vivo*: Evaluación de la biocompatibilidad de la inyección intravítrea de MSV en conejos

La utilización de animales de experimentación en este estudio siguió el *Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Visual Research* de la *Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO) y fue aprobado, previamente a su inicio, por el Organismo Encargado del Bienestar de los Animales (OEBA) de la Universidad de Valladolid y por la Consejería de Ganadería y Agricultura de la Junta de Castilla y León (conforme a lo dispuesto en el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero).

3.2.1.1 Animales

Se emplearon conejos pigmentados e inmunocompetentes con las siguientes características:

- Especie: *Oryctolagus cuniculus*
- Raza: Rex Chinchilla – New Zealand White (NZW)
- Genotipo: XX (nº=24, fenotipo hembra) y XY (nº=8, fenotipo macho)
- Peso: 2,8-3,5 Kg aproximadamente

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1.2 Células madre mesenquimales (MSV, PEI 15-007)

Las células madre que se han utilizado en el presente proyecto se denominan MSV (Mesenchymal Stem from Valladolid). Se trata de células mesenquimales procedentes de médula ósea (MO) de donantes humanos, criopreservadas y reexpandidas y están aprobadas por la AEMPS bajo el número de PEI 15-007 para su uso autólogo y alogénico.

Las fases que se llevan a cabo para la obtención de las MSV son las siguientes: Aislamiento de células mononucleadas procedentes de MO – Expansión *in vitro* – Pases (tripsinización) – Criopreservación – Descongelación – Expansión *in vitro* – Proceso final (recuento celular, evaluación de la viabilidad celular) – Envasado

Todo el proceso de producción de MSV se llevó a cabo por especialistas altamente cualificados en cultivos celulares en las instalaciones de la Unidad de Producción Celular (UPC) del IBGM cumpliendo normas GMP. Durante la expansión, se realizaron pruebas para garantizar la asepsia del proceso. Estos controles de calidad confirmaron la ausencia de contaminación y la buena marcha del proceso.

La UPC donde se fabricaron las células MSV, cumple con todos los requisitos exigidos por la Directiva Europea 2003/94/EC, del 8 de octubre de 2003, que establece los principios y las guías para las normas de correcta fabricación en relación a los medicamentos de uso humano y a los medicamentos en investigación de uso humano. Asimismo, estas instalaciones fueron autorizadas por la AEMPS en enero de 2007 para la fabricación de medicamentos de terapia celular para uso humano.

Los equipos utilizados para la fabricación de las células MSV han sido correctamente validados y los elementos calibrables calibrados siguiendo la correspondiente cualificación del diseño (DQ, por sus siglas en inglés), cualificación de la instalación (IQ, por sus siglas en inglés) y cualificación de operaciones (OQ, por sus siglas en inglés).

3.2.1.3 Posología y forma de administración

El PEI se presentó en jeringas de 1ml luer lock con 110 µl de medio isotónico compuesto por Ringer-lactato (Grupo B. Braun, Barcelona, España) con Albúmina Humana al 0.1% (CSL Behring,

S.A. Barcelona, España) y Glucosa 5 mM (Grupo B. Braun, Barcelona, España) con una concentración celular alta de 30×10^6 y una baja de 15×10^6 células/ml.

La forma de administración fue mediante inyección intravítrea de 50 μ l (0.05ml) en dosis única. Estas inyecciones intravítreas fueron administradas en el ojo derecho mediante jeringa precargada para un solo uso por el doctorando (oftalmólogo con experiencia en la administración de inyecciones intravítreas y homologado por la autoridad competente para trabajar con animales de experimentación – categoría B). El procedimiento de inyección se realizó en uno de los quirófanos experimentales del servicio de investigación y bienestar animal (SIBA) de la Universidad de Valladolid.

3.2.1.4 Grupos experimentales

En una primera fase se utilizaron 24 conejos hembra, divididos en 6 grupos (n=4 por grupo) con la intención de determinar la mejor dosis tolerada. Se consideró como dosis mejor tolerada la que menos efectos adversos generó en la exploración oftalmológica y en la evaluación histológica de este grupo de conejos. En la segunda fase, se utilizó la dosis mejor tolerada y se aplicó a 8 conejos machos divididos en 2 grupos experimentales (n=4 por grupo) (tabla 3).

Tabla 3. Grupos de animales, dosis celulares y tiempos de seguimiento

Sexo	Grupo (n=4)	Inyección intravítrea	Seguimiento
Hembras	1. Control	Medio Isotónico *	6 semanas
	2. Experimental	Dosis baja de MSV ^o †	
	3. Experimental	Dosis alta de MSV ^o †	
	4. Control	Medio Isotónico *	2 semanas
	5. Experimental	Dosis baja de MSV ^o †	
	6. Experimental	Dosis alta de MSV ^o †	
Machos	7 Experimental	Dosis mejor tolerada **	6 semanas
	8 Experimental	Dosis mejor tolerada **	2 semanas

* Ringer-lactato + Albúmina Humana al 0.1% + Glucosa 5 mM † 15×10^6 cells/ml (750,000 cells/50 μ l) ‡ 30×10^6 cells/ml (1,500,000 cells/50 μ l) ** Determinada en función de los resultados de la primera fase

3.2.1.5 Preparación prequirúrgica, sedación y anestesia

Los animales fueron anestesiados mediante la administración intramuscular de ketamina (30 mg/Kg; Imalgene 1000, Merial, Lyon, Francia) y xilacina (6 mg/Kg; Rompún 2%, Bayer

3. MATERIAL Y MÉTODOS

HealthCare, Kiel, Alemania). La ausencia de reflejos podal y palpebral se utilizó para monitorizar el nivel de anestesia. Como analgésico se administró en inyección subcutánea butorfanol (0.1 mg/kg; Torbugesic® Vet, Fort Dodge Animal Health, IA, USA). Antes de realizar el procedimiento quirúrgico, se asepticizó la zona periorbitaria con povidona yodada al 5% (Betadine®; Meda Manufacturing, Burdeos, Francia). Posteriormente, se instiló una gota de anestésico tópico en el ojo derecho (Colicusí Anestésico Doble®; Alcon Cusí S.A., Barcelona, España).

3.2.1.6 Procedimiento de inyección intravítrea

El día de inicio del estudio se llevó a cabo la inyección intravítrea de la formulación correspondiente a cada grupo de estudio. Antes de cada inyección se provocó la proptosis del globo ocular con ayuda de unas pinzas de Castroviejo. Las inyecciones intravítreas se realizaron con una aguja de 25G (Becton Dickson Company, San Agustín de Guadalix, España), a 4 mm del limbo esclero-corneal, en el cuadrante temporal inferior y con el bisel de la aguja hacia arriba. Las inyecciones se llevaron a cabo con un ángulo y una profundidad suficientes para evitar tocar el cristalino (teniendo en cuenta su gran volumen relativo en esta especie animal) y para introducir la aguja hasta el tercio medio de la cavidad vítrea. El PEI en estudio se inyectó sin variar la posición de la aguja dentro del ojo y, antes de retirarla, se presionó con una hemosteta la conjuntiva y la esclera durante un minuto, para minimizar el potencial reflujo de la solución inyectada. Tras el procedimiento quirúrgico se administró una antibioterapia tópica mediante la aplicación de tobramicina ungüento (Tobrex®, Alcon) dosis única, en el ojo derecho del animal.

3.2.1.7 Seguimiento y evaluación *in vivo*

Las evaluaciones *in vivo* se llevaron a cabo durante 2 semanas en los grupos 4, 5, 6 y 8 y durante 6 semanas en los grupos 1, 2, 3 y 7 tras la inyección intravítrea. Se realizó un examen físico general y oftalmológico de los animales, antes y después de la inyección intravítrea, al día siguiente y luego semanalmente (Figura 1).

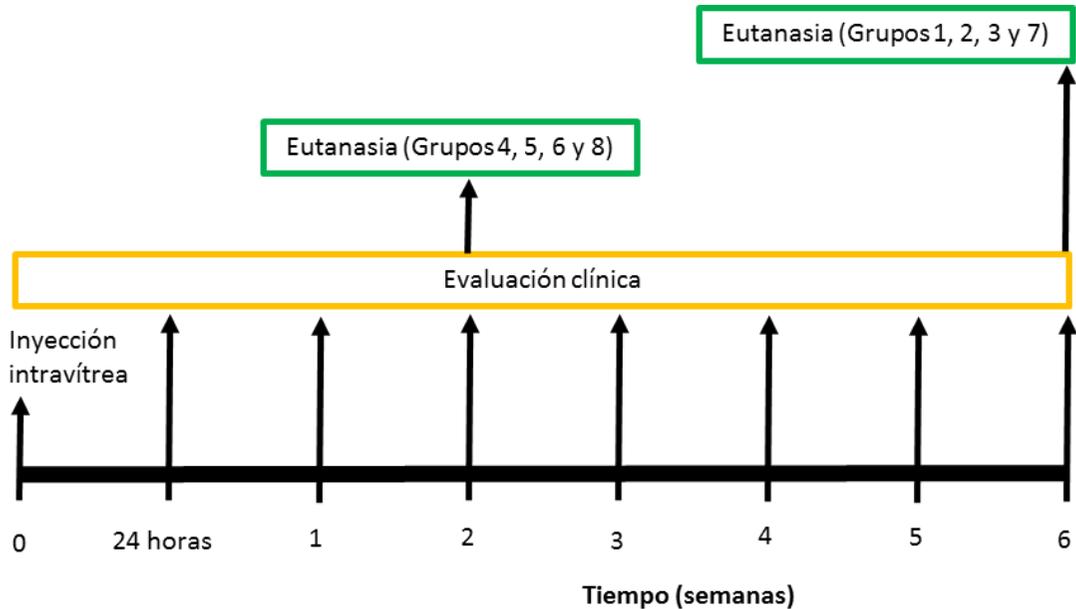


Figura 1. Cronograma de los procedimientos realizados en los diferentes grupos de animales

El examen físico comprendió la determinación del peso, la valoración del comportamiento y la exploración general de los animales llevada a cabo por un veterinario cualificado para la manipulación de animales de experimentación (categoría B). El examen oftalmológico fue realizado por dos investigadores independientes y comprendió la evaluación del polo anterior mediante lámpara de hendidura portátil (Kowa SL-15; Kowa Optimed Inc., CA, EE.UU.), y se siguió el método descrito por Hackett&McDonald⁸⁰ para la gradación de los hallazgos (Tabla 4).

La evaluación del polo posterior se realizó bajo midriasis farmacológica mediante oftalmoscopia indirecta (Keeler Ltd., Reino Unido) con una lente de no contacto (Wide field, Volk Optical, OH, EE.UU) para la determinación de hallazgos en el fondo de ojo (Tabla 5). La presión intraocular (PIO) se cuantificó mediante tonometría de contacto (Tono-Pen Vet™ Tonometer; Reichert Inc. Depew, NY, EE.UU) y se consideró como PIO normal la media \pm el error estándar de la media (SEM, por sus siglas en inglés) de los ojos izquierdos (ojos no tratados).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 4. Signos clínicos del polo anterior evaluados en los conejos

Conjuntiva			
Valoración	Congestión	Secreción	Edema
0 = Normal	Ausencia	Ausencia	Ausencia
1 = Leve	Perilímbica superior e inferior	Fondo de saco inferior	Fondo de saco inferior
2 = Moderada	>75% perilímbica + conjuntiva palpebral	1 + borde palpebral	fondo de saco superior e inferior
3 = Severa	100% perilímbica + palpebral y bulbar	Por fuera del borde palpebral	1 y 2 + eversión parcial del párpado
4 = Muy severa	-	Sobre las pestañas, cejas y piel	Eversión completa de los párpados

Cornea y Cristalino		
Valoración	Opacidad corneal	Opacidad del cristalino
0 = Normal	Ausencia	Ausencia
1 = Leve	Área <25%	Capsular anterior
2 = Moderada	Área 25 - 50%	Nuclear
3 = Severa	Área 50-75%	Capsular posterior
4 = Muy severa	Área > 50%	-

Cámara anterior e Iris		
Valoración	Flare	Iris
0 = Normal	Ausencia	Normal
1 = Leve	Leve turbidez en cámara anterior (CA)	Leve hiperemia y congestión de vasos
2 = Moderada	Moderada turbidez en CA	Moderada hiperemia y congestión de vasos
3 = Severa	Severa turbidez en CA	Severa hiperemia y congestión de vasos
4 = Muy severa	-	Edema estromal

Flare: presencia de proteínas inflamatorias en el humor acuoso. Tabla basada en el método de gradación descrito por Hackett&McDonald⁸⁰

Tabla 5. Signos clínicos del polo posterior evaluados en los conejos

Vítreo	Retina	Nervio óptico
Células inflamatorias	Desprendimiento de retina	Palidez de la papila
Hemorragias	Hemorragias	Hemorragias
Opacidades vítreas	Edema, exudados	Edema, exudados

3.2.1.8 Punto final y recogida de muestras

Los animales fueron sedados y anestesiados, según el protocolo descrito previamente, y sacrificados mediante la inyección intravenosa de 200 mg/Kg de pentobarbital sódico (Dolethal®, Vetoquinol, Cedex, Francia), a las 2 semanas (grupos 4, 5, 6 y 8) y a las 6 semanas (grupos 1, 2, 3 y 7) del procedimiento quirúrgico (Figura 1).

Tras confirmar la muerte de los animales mediante la pérdida de reflejos y por el cese de la actividad respiratoria y cardiovascular, se practicó una exenteración para la obtención de los tejidos oculares. Complementariamente, a dos animales de cada grupo se les realizó una necropsia para la toma de muestras de órganos hematopoyéticos (bazo e hígado) y gonadales (ovario o testículo) para evaluar la potencial migración sistémica de las células inyectadas. Cualquier signo de irritación/toxicidad potencial observado durante este procedimiento fue valorado y registrado. Se realizó un examen macroscópico de cada globo ocular para determinar el lugar de la inyección y las posibles reacciones adversas en esa región.

Las muestras se introdujeron en una solución de formalina al 10% para su fijación y fueron derivadas al Laboratorio de Patología Ocular del Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA) para su procesamiento y evaluación por un especialista en anatomía patológica.

3.2.1.9 Procesamiento de las muestras

Después de la fijación en formalina al 10%, un mínimo de 24 horas, los globos oculares se seccionaron a la mitad a lo largo del eje horizontal, y junto con las muestras de hígado, bazo y gónadas se procesaron para su inclusión en parafina y se obtuvieron secciones seriadas de 3 µm, paralelas y a diferentes niveles de cada uno de los tejidos.

3.2.1.10 Evaluación histológica e inmunohistoquímica

Para la descripción de los hallazgos histológicos se realizó la evaluación de las muestras teñidas con H-E mediante un microscopio óptico Elipse TS100 (Nikon, Tokio, Japón) y se obtuvieron imágenes representativas de cada uno de los tejidos mediante una cámara digital Leica DFC490 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

La identificación, localización y supervivencia de las MSV inyectadas intravítreas en tejidos oculares, así como la potencial migración de estas células a órganos extraoculares (hígado, bazo y gónadas) se realizó mediante la técnica de Hibridación Fluorescente *In Situ* (FISH, por sus siglas en inglés). Ésta técnica, basada en la hibridación *in situ* (HIS) permitió la detección de secuencias concretas de ácidos nucleicos y/o cromosomas humanos mediante el empleo de sondas específicas marcadas con fluorocromos. Se utilizaron sondas de marcaje específicas para la región centromérica del cromosoma X humano y la región de heterocromatina del cromosoma Y humano (Vysis CEP X /Y DNA Probe Kit, Abbott Molecular, Inc., Lake Forrest, IL, USA). Las sondas fueron marcadas directamente con un fluorocromo de espectro rojo para el cromosoma X y un fluorocromo de espectro verde para el cromosoma Y. De este modo se pudo identificar y diferenciar las células humanas inyectadas (MSV, PEI 15-007) de las células propias de conejo. Para este estudio, las muestras fueron derivadas al laboratorio de la Unidad de Citogenética Oncológica de la Universidad de Salamanca donde fueron procesadas de acuerdo a los protocolos recomendados por la casa comercial.

3.2.1.11 Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos en este estudio *in vivo* fueron recogidos en un cuaderno de laboratorio en papel y trasladados a una hoja Excel (Microsoft Excel 2016®, Microsoft Corporation, Redmond, WA, EE. UU.). Los datos fueron analizados con el programa estadístico SPSS (version 24.0, SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Las comparaciones pareadas entre medias \pm SEM se realizaron mediante el test t de Student para muestras dependientes. Para la comparación de medias entre los diferentes tiempos de seguimiento se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) para medidas repetidas con corrección de Bonferroni, una vez confirmada su distribución normal y la similitud de sus varianzas, y se estableció el límite significativo en un valor <0.05 . Las variables cualitativas fueron expresadas en porcentajes de frecuencia (%).

3.2.2 Fase *in vitro*: determinación de la supervivencia de las células ganglionares de la retina (RGC) en un modelo organotípico de retina de cerdo en co-cultivo con células madre mesenquimales (MSV, PEI 15-007)

Para determinar la supervivencia de las RGC y los factores neurotróficos potencialmente secretados por las MSV (PEI 15-007), en concreto el BDNF, el CNTF y el GDNF,⁶⁴⁻⁶⁷ se realizó un cultivo organotípico de neurorretina porcina puesto a punto previamente por el Grupo de Retina del IOBA,^{81, 82} en co-cultivo con las MSV (PEI 15-007).

3.2.2.1 Células madre mesenquimales (MSV, PEI 15-007)

El proceso de producción de las MSV ha sido comentado previamente en el **apartado 3.2.1.2**. Para este experimento la UPC del IBGM proporcionó MSV frescas 1×10^6 cels/ml, las cuales fueron utilizadas de la siguiente manera:

- a. Se recibieron 1×10^6 cels contenidas en 1ml de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco®, Paysley, Reino Unido) suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina y 10% de SFB.
- b. Se procedió a su contaje y se determinó su viabilidad mediante el empleo del ensayo de azul Tripán (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) en una cámara de Neubauer.
- c. Bajo una campana de flujo laminar (Faster-BHN, 2004, Cultek, Madrid, España) se resuspendieron las células en 10 ml de medio DMEM suplementado con 1% de antibiótico y 10% de SFB.
- d. Se sembraron 30.000 células/pocillo (que corresponde con 3.125 células por cm^2 , P1) en 3 pocillos de cada una de las placas de cultivo Transwell® de 6 pocillos (Corning Inc, Corning, NY, E.E.U.U) con medio DMEM suplementado con 10 % de SFB, 1% de Antibiótico y 1% de L-Glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y se mantuvieron en incubadora a 37°C y 5% de CO_2 durante 72 horas antes del inicio del cocultivo con las neurorretinas.

3.2.2.2 Preparación de los explantes de neuroretinas porcinas

Para el desarrollo de este estudio se utilizaron 6 ojos de cerdo ($n=6$), entre 6 y 8 meses de edad, procedentes del matadero Justino Gutiérrez S.L. (Laguna de Duero, Valladolid, España). Los ojos

3. MATERIAL Y MÉTODOS

se recogieron en medio DMEM suplementado con 10% de antibiótico/antimicótico (100 U/ml de Penicilina, 100 µg/ml de Estreptomicina y 2,5 µg/ml de Anfotericina B, Gibco®, Invitrogen, Paisley, UK), con el fin de reducir el riesgo de contaminación. Los ojos fueron trasladados refrigerados hasta el laboratorio de cultivos celulares del IOBA donde se procedió con el protocolo de preparación de los explantes de neuroretina y la preparación del cultivo. El tiempo transcurrido entre la muerte del animal/enucleación de los ojos hasta su procesamiento en el laboratorio se limitó a un máximo de 2 horas, con el fin de reducir la degeneración precoz de las células retinianas por falta de soporte nutricional tras la muerte del animal.

El protocolo para el aislamiento de la neuroretina que se empleó fue el siguiente:

- a. Bajo una campana de flujo laminar (Faster-BHN) se colocó el globo ocular en una placa de Petri (90 mm; Corning, NY, EE. UU.) y se retiraron los restos de tejidos extraoculares (parpados, conjuntiva, cápsula de Tenon, músculos y grasa orbitaria) (Figura 2A).
- b. Se lavó cada globo ocular en Betadine® (MEDA Pharma S.A., Madrid, España) (2 minutos), etanol 70% (2 minutos) y DMEM suplementado con 10% de antibiótico/antimicótico (3 lavados de 5 minutos).
- c. Se colocó el globo ocular en una placa de Petri con medio DMEM suplementado con un 10% de antibiótico/antimicótico y se perforó el globo ocular con una aguja estéril de 22G a través de la esclera y a la altura de la *ora serrata*, para realizar un ojal por el que poder introducir unas tijeras de Vannas que permitiesen hacer la disección del globo ocular en segmento anterior y posterior.
- d. Se retiró por tracción el segmento anterior y se arrastró con él al vítreo. En algunos casos se usó un pincel estéril para eliminar restos de vítreo fuertemente adheridos a la retina periférica (Figura 2B).
- e. Se colocó el segmento posterior en una placa de Petri con medio DMEM suplementado con 10% de antibiótico/antimicótico.
- f. Se realizó un desprendimiento mecánico de la retina neural con la ayuda de un pincel y mediante el paso de medio de cultivo DMEM entre la neuroretina y el epitelio pigmentario de la retina (EPR), para reducir los tiempos de manipulación retiniana y el posible daño mecánico resultante de la manipulación directa de la retina (Figura 2C y

D). En algunos casos la retina se desprendió parcialmente del EPR durante el proceso de separación vítrea.

- g. Se identificó el área centralis (porción localizada superiormente al nervio óptico que atraviesa horizontalmente la retina, que contiene la máxima densidad de conos y que no es atravesada por grandes vasos)⁸³ y se recortaron 2 explantes adyacentes (5x5 mm) aproximadamente 1 mm por encima del nervio óptico, evitando la presencia de vasos visibles y de bordes irregulares (Figura 2E). Para ello se empleó una tijera de Vannas (John Weiss International, Milton Keynes, Reino Unido), unos pinceles y una espátula metálica de bordes romos (4x4 mm).
- h. Se colocaron los explantes sobre la espátula metálica con ayuda de unos pinceles y se depositaron sobre la membrana de los pocillos de la placa de cultivo Transwell® (Pore polycarbonate insert, 0,4 µm de poro, 24 mm de diámetro; Corning Inc, Corning, NY, E.E.U.U) de modo que la capa de fibras nerviosas de las RGC quedara en contacto con ésta y sin formar pliegues en los explantes, con el objetivo de conseguir un contacto apropiado con la membrana. (Figura 2F)

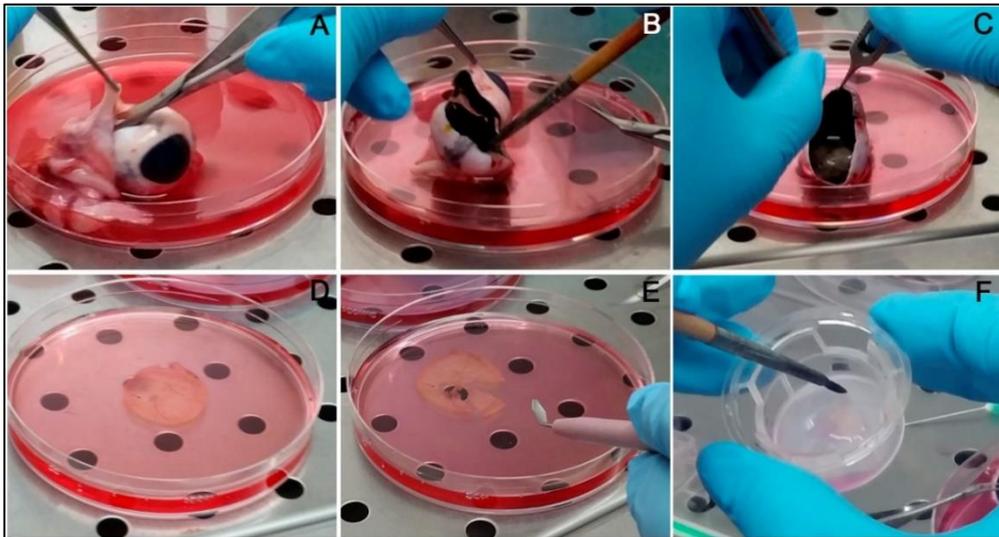


Figura 2. Protocolo de preparación de los explantes de neuroretina porcina. A) Retirada de los restos de tejidos extraoculares B) Separación de segmento anterior del posterior; B) separación del vítreo; C) Separación de la neuroretina del epitelio pigmentario de la retina con la ayuda de un pincel; D) Detalle de la retina completamente desprendida; E) identificación del área centralis y corte de los explantes de neuroretina; F) Colocación de los explantes con el ayuda de un pincel y de una espátula de metal sobre la membrana Transwell®.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Paralelamente se prepararon dos explantes, ambos procedentes del área centralis de un mismo ojo, que fueron directamente procesados para su análisis morfológico, de modo que se utilizaron como controles (a tiempo 0) para evaluar el estado de las neurorretinas (NR) previamente a la iniciación del cultivo.

3.2.2.3 Preparación de las placas de cultivo

Las condiciones experimentales se distribuyeron de la siguiente manera:

En los pocillos 1, 2 y 3 de la placa 1 y en los pocillos 7, 8 y 9 de la placa 2 se sembraron 30.000 células/pocillo (MSV, PEI 15-007) contenidas en 1,6 mL de medio DMEM/HAM F12 (Gibco®, Paysley, Reino Unido) suplementado con 10 % de FBS, 1% de Antibiótico y 1% de L-Glutamina 72 horas previamente a la obtención de los explantes retinianos. En el resto de los pocillos se depositaron 1,6 ml de medio. Una vez obtenidos los explantes, se colocaron sobre las membranas transwell de los pocillos 1 a 6 (Figura 3). Las placas de cultivo se mantuvieron en una incubadora a 37°C con una atmósfera enriquecida al 5% de CO₂ durante el tiempo de duración del experimento (3 días). De esta manera, los sobrenadantes de cultivo celular procedentes de los pocillos 1, 2 y 3 (NR + MSV + medio) se definieron como condición experimental 1, los sobrenadantes de los pocillos 4, 5 y 6 (NR + medio) condición experimental 2, los sobrenadantes de los pocillos 7, 8 y 9 (MSV+ medio) como condición experimental 3 y los medios de los pocillos 10, 11 y 12 como controles (Figura 3).



Figura 3. Organización de los explantes de retina y de las células mesenquimales en las placas de cultivo transwell®. (NR: Neurorretina; MSV: Mesenchymal stem from Valladolid)

El medio se renovó diariamente hasta la conclusión del experimento, añadiendo siempre 1.6 mL de medio recién elaborado y atemperado. Este volumen de medio predeterminado por el fabricante permitió su contacto con la membrana del pocillo, pero sin sobrepasarla, lo que, a su vez, permitió la adhesión de la retina a la membrana del pocillo, evitando que flotara sobre el medio. Los explantes retinianos cocultivados con MSV en los pocillos 1, 2 y 3 se definieron como NR experimento y los explantes retinianos cultivados sin MSV en los pocillos 4, 5 y 6 se definieron como NR control.

3.2.2.4 Cuantificación de los factores neurotróficos

Los sobrenadantes de cultivo de cada una de las condiciones experimentales se retiraron en los días 1, 2 y 3, se recogieron en tubos de 1,5 ml (Eppendorf, Corning, NY, EE. UU.) y se guardaron en ultracongelación a -80°C hasta su procesamiento, para evaluar la posible presencia de factores de crecimiento secretados por las células MSV (PEI 15-007) durante el cultivo. Para ello se emplearon técnicas de inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) cuantitativo tipo sándwich para BDNF (RayBio® Human BDNF ELISA Kit; RayBiotech, Norcross, GA, USA) con un rango de detección desde 0,1 a 16ng/ml, CNTF (Human CNTF kit; Cloud-Clone Corp., Houston, TX, USA) con un rango de detección desde 7,8 a 500 pg/ml y GDNF (RayBio® Human GDNF ELISA Kit; RayBiotech, Norcross, GA, USA) con un rango de detección desde 3,0 a 2000 pg/ml (Figura 4).

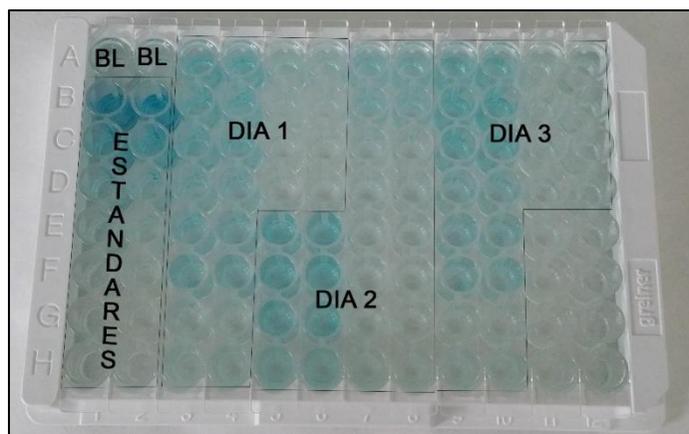


Figura 4. Placa de ELISA para la determinación de las concentraciones de factores neurotróficos en los medios de cultivo. BL: Blanco. Día 1, 2 y 3: medios recogidos a las 24, 48 y 72 horas tras el inicio del cocultivo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.2.5 Procesamiento de las muestras

Al finalizar el experimento se retiraron los pocillos de cultivo junto con el explante de neurorretina adherido a la membrana porosa, y se recortó la membrana delimitando el explante. Todos los explantes de retina, fueron cortados en dos partes, de modo que una mitad fue procesada para su inclusión en parafina, mientras que la otra fue procesada para criopreservación y posteriormente fueron evaluadas mediante tinción con H-E y técnicas de inmunohistoquímica. Por otra parte, las MSV cultivadas en los pocillos fueron fijadas con metanol frío (Panreac Química S.A.U., Barcelona, España) durante 15 minutos a 4°C para su caracterización inmunofenotípica.

Protocolo de inclusión en parafina:

- a. Se introdujo el explante de retina en un tubo de 1,5 ml (Eppendorf, Corning, NY, EE. UU.) con paraformaldehído al 4% (PF; PANREAC Química S.A.U., Barcelona, España) durante 2 horas a 4°C.
- b. Se retiró el PF y se lavó 2 veces con 1,5 ml de Phosphate Buffer Saline (PBS, Gibco, Invitrogen, Paisley, UK) y se realizó la inclusión de las muestras en parafina (Paraplast Plus®, Leica Biosystems, Nussloch, Alemania), durante 90 minutos en un procesador de tejidos (ASP300; LEICA, Nussloch, Alemania).
- c. Se realizó el bloque de parafina en un sistema de consolas (TISSUE TEK® Olympus Iberia, Barcelona, España).
- d. Una vez obtenido el bloque, se realizaron cortes no seriados de 4µm en un microtomo (RM2145; LEICA, Minnesota, EE.UU.).

Protocolo de criopreservación:

- a. Se introdujo el explante de retina en un tubo de 1,5 ml (Eppendorf, Corning, NY, EE. UU.) con paraformaldehído al 4% (PF; PANREAC Química S.A.U., Barcelona, España) durante 2 horas a 4°C.
- b. Se retiró el PF y se lavó 2 veces con 1,5 ml de PBS.
- c. Se añadió sacarosa al 15% (PANREAC Química S.A.U., Barcelona, España) durante 2 horas a 4°C.
- d. Se retiró la sacarosa al 15% y se añadió sacarosa al 20% durante 2 horas a 4°C.

- e. Se retiró la sacarosa al 20% y se añadió sacarosa al 30% durante un mínimo de 12 horas a 4°C.
- f. Se congelaron las muestras retinianas a -80°C en Tissue-Tek® (O.C.T.™ Compound; Sakura Finetek Europe B.V., Alphen, Holanda), evitando la formación de burbujas y de pliegues en la retina.
- g. Se almacenaron las muestras en un ultra congelador a -80°C.
- h. Se realizaron secciones de 4 µm con un criostato (CM 1900; Leica, Nussloch, Alemania) que fueron recogidas en portaobjetos comerciales tratados (SuperFrost® Plus; Menzel-Gläser, Braunschweig, Alemania) y se conservaron a -20°C hasta la realización de las técnicas de inmunohistoquímica.

3.2.2.6 Técnicas de tinción y de inmunohistoquímica

Protocolo de tinción con H – E en explantes retinianos incluidos en parafina:

Para el estudio histológico y la evaluación de las modificaciones de los explantes de neurorretina tras la finalización del experimento, se llevó a cabo la tinción con H – E mediante el siguiente protocolo:

- a. Se desparafinaron los cortes retinianos con Xilol (Sigma-Aldrich) (3 x 5 minutos).
- b. Se hidrataron con concentraciones decrecientes de alcohol 100º (5 minutos), alcohol 96º (5 minutos), alcohol 80º (5 minutos) y agua destilada (2 x 5 minutos).
- c. Se tiñeron los portas con Hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU) 5 minutos
- d. Se lavaron los portas con agua durante 5 minutos.
- e. Se tiñeron los portas con Eosina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU) durante 5 minutos
- f. Se lavaron los portas con agua durante 5 minutos.
- g. Se deshidrataron los portas con concentraciones crecientes de alcohol 80º (2 minutos), alcohol 96º (2 minutos) y alcohol 100º (5 minutos)
- h. Se aclararon con xilol (3x5 minutos).
- i. Se cubrieron los portas con un cubreobjetos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Protocolo de inmunofluorescencia para GFAP en explantes retinianos incluidos en parafina:

Para el estudio de las modificaciones de la glía y de las células de Müller se evaluó la proteína GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*), presente en los filamentos intermedios de las células gliales retinianas (astrocitos y células de Müller) e implicada en los procesos de gliosis reactiva.⁸⁴⁻⁸⁶ Se llevó a cabo el siguiente protocolo:

- a. Se desparafinaron los cortes retinianos con Xilol (Sigma-Aldrich®) (3 x 5 minutos).
- b. Se hidrataron con concentraciones decrecientes de alcohol 100º (5 minutos), alcohol 96º (5 minutos), alcohol 80º (5 minutos) y agua destilada (2 x 5 minutos).
- c. Se secaron los portas y se enmarcaron los cortes rodeándolos con una sustancia hidrófoba (Liquid Bloquer Super Pap Pen; Daido Sangyo Co. Ltd., Tokio, Japón).
- d. Se trataron los cortes con tripsina 0,01% en PBS a 37°C durante 1 hora en una cámara húmeda.
- e. Se incubaron los cortes durante 2 horas a temperatura ambiente en PBS con 5% de suero de cabra (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, EE.UU.).
- f. Se incubó el anticuerpo primario anti-GFAP (1:250, polyclonal rabbit anti-cow GFAP; DakoCytomation Inc., Carpinteria, CA, EE.UU.), diluyendo el anticuerpo en PBS con 5% de suero de cabra, a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- g. Se lavaron las muestras 3 veces con PBS durante 15 minutos.
- h. Se incubó el anticuerpo secundario diluido en PBS (1:200; Alexa Fluor® 568 goat anti-rabbit Ig-G; Molecular Probes™, Eugene, EE.UU.) durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad.
- i. Se lavaron los portas con PBS en oscuridad (3 x 5 minutos).
- j. Se secaron los portas y se tiñeron los núcleos con DAPI (10 µg/mL, 4',6-diamino-2-phenilindole dihydrochloride; Molecular Probes™) que se incubó 5 minutos en oscuridad.
- k. Se lavaron los portas con PBS en oscuridad (3 lavados de 5 minutos).
- l. Se montaron los portas con un medio específico para muestras de inmunofluorescencia (Fluorescent Mounting Médium, Dako Cytomation Inc.)

Protocolo de inmunofluorescencia para Tubulina beta III, NeuN y TUNEL en explantes retinianos criopreservados:

Para el estudio de las RGC (localización, cuantificación de núcleos y apoptosis), se utilizaron dos anticuerpos específicos para RGC, la Tubulina beta III y el NeuN (Neuronal Nuclei) y el TUNEL como marcador de apoptosis celular. La Tubulina beta III es una proteína que se encuentra presente en altas concentraciones en el citoesqueleto de las RGC⁸⁷ y el NeuN es una proteína predominantemente nuclear que se utiliza para identificar neuronas y al estar presente en altas cantidades en las RGC, también es útil para identificar estas células.⁸⁸

Para la inmunofluorescencia de la Tubulina beta III y el NeuN se siguió el siguiente protocolo:

- a. Se descongelaron las muestras a temperatura ambiente (5 minutos).
- b. Se lavaron en agua durante 30 minutos, para eliminar los restos de Tissue-Tek®.
- c. Se secaron los portas, y se enmarcaron los cortes con Liquid Bloquer Super Pap Pen.
- d. Se incubaron en PBS con 5% de suero de cabra y 0.1 % triton durante 2 horas a temperatura ambiente.
- e. Se incubaron los anticuerpos primarios anti-Tubulin beta III (1:500, *monoclonal mouse III beta-tubulin protein*; EMD Millipore Corporation, CA, EE.UU.) y anti-NeuN (1:250, *polyclonal rabbit Neuronal Nuclei*; EMD Millipore Corporation, CA, EE.UU.) diluidos en PBS con 5% de suero de cabra y 0.1 % triton durante 1 hora a temperatura ambiente.
- f. Se lavaron los cortes en PBS (3 x 5 minutos).
- g. Se incubaron los anticuerpos secundarios diluidos en PBS (1:200, Alexa Fluor® 488 (verde) *goat anti—mouse IgG*; Alexa Fluor® 568 (rojo) *goat anti—rabbit IgG*; Molecular Probes™, Eugene, EE.UU.) durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad.
- h. Se lavaron los cortes en PBS (3 x 5 minutos).
- i. Se tiñeron los núcleos con DAPI durante 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
- j. Se lavaron los cortes en PBS (3 x 5 minutos).
- k. Se montaron con cubreobjetos utilizando *fluorescent mounting medium*.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la inmunofluorescencia del TUNEL se siguió el siguiente protocolo:

- a. Se descongelaron las muestras (5 minutos).
- b. Se lavaron en PBS durante 30 minutos, para eliminar los restos de Tissue-Tek®.
- c. Se secaron los portas y se enmarcaron los cortes con Liquid Bloquer Super Pap Pen.
- d. Se incubaron con 50 µl de TUNEL (*Fluorescein in situ cell death detection kit*, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda y oscuridad.
- e. Se lavaron con PBS (3 x 5 min).
- f. Los núcleos se tiñeron con DAPI durante 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
- g. Se lavaron los cortes en PBS (3 x 5 minutos).
- h. Se montaron con cubreobjetos utilizando *fluorescent mounting médium*.

Protocolo de caracterización de las MSV:

Para determinar si las MSV mantuvieron el inmunofenotipo que caracteriza a una célula madre mesenquimal tras la finalización del experimento, se utilizó un Kit de caracterización para MSC humanas (Human Mesenchymal Stem Cell Characterization Kit, Millipore, Billerica, EE.UU.). Este kit contiene una selección de anticuerpos que actúan como marcadores positivos para moléculas de superficie presentes en las MSC (CD44, CD90, STRO-1 y CD146)⁸⁹ y dos marcadores hematopoyéticos de superficie que no deben estar presentes (CD14 y CD19).⁹⁰

El proceso de inmunofluorescencia se llevó a cabo de la siguiente manera:

- a. Se atemperaron las placas con MSV previamente fijadas.
- b. Se aplicaron en cada pocillo 750 µl de solución buffer de bloqueo (5% de suero de cabra en PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente.
- c. Se incubaron 750 µl de cada anticuerpo primario por pocillo (1:500, monoclonal mouse antibodies: anti-H-CAM IgG2a; anti-THY-1 IgG1 [CD90]; anti-STRO-1 IgM; anti-M-CAM [CD146]; anti-CD19 IgG2a y anti-CD14 IgG1; Molecular Probes™, Millipore, Billerica, EE.UU.) durante toda la noche a 4°C.
- d. Se lavaron con PBS (2 x 5 minutos).
- e. Se lavaron con solución de bloqueo (2 x 5 minutos y 1 x 30 minutos).

- f. Se incubaron los anticuerpos secundarios (1:200, Alexa Fluor® 568 [rojo] goat anti—mouse IgG) durante 2 horas a temperatura ambiente.
- g. Se lavaron con PBS (3 x 10 minutos).
- h. Se tiñeron los núcleos con DAPI durante 8 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
- i. Se lavaron los pocillos con PBS (3 x 5 minutos). En cada pocillo se dejaron 400 µl de PBS para evitar el secado de las muestras hasta su evaluación.

3.2.2.7 Microscopía

Para el estudio morfológico de los explantes de retina se utilizó un microscopio óptico Elipse TS100 (Nikon, Tokio, Japón). Para los estudios de inmunofluorescencia se utilizó un microscopio DM4000B (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Las imágenes se obtuvieron mediante la cámara digital Leica DFC490 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Los estudios comparativos basados en la expresión de los marcadores inmunofluorescentes se llevaron a cabo en imágenes adquiridas con los mismos niveles de exposición, intensidad y ganancia. El brillo y el contraste de las imágenes se ajustaron mediante el software Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems, San Jose, EE.UU).

3.2.2.8 Evaluación del espesor retiniano

El espesor retiniano se evaluó con el programa ImageJ (versión 1.47v, NIH Image, National Institute of Health, EE.UU.) a partir de 5 imágenes por muestra obtenidas con una magnificación de 20x. Se evaluó la distancia entre la membrana limitante externa (OLM, por sus siglas en inglés) y la ILM. Se tomaron tres medidas en la parte central de cada corte no seriado. También se evaluó el grosor de cada una de las capas retinianas por separado.

3.2.2.9 Evaluación de las células gliales

La reactividad de la glía determinada mediante la inmunexpresión de la proteína GFAP por parte de las células de Müller y astrocitos, se evaluó mediante la cuantificación de la intensidad de la GFAP dividida entre la intensidad del DAPI con el programa ImageJ a partir de 5 imágenes por muestra obtenidas con una magnificación de 20x y fue expresada en unidades arbitrarias (A.U., por sus siglas en inglés). Para evaluar el grado de activación glial se ha empleado un

3. MATERIAL Y MÉTODOS

sistema de gradación basado en la extensión de la inmunoexpresión de la GFAP a lo largo del citoplasma y prolongaciones de las células de Müller⁹¹ en concreto:

Grado 1: inmunoexpresión en los pies de las células de Müller a nivel de la GCL.

Grado 2: inmunoexpresión en los pies de las células de Müller a nivel de la GCL y algunas prolongaciones que alcanzan la IPL.

Grado 3: inmunoexpresión en los pies de las células de Müller a nivel de la GCL y prolongaciones hasta la INL.

Grado 4: inmunoexpresión en los pies de las células de Müller a nivel de la GCL y prolongaciones hasta la ONL.

Grado 5: inmunoexpresión en los pies de las células de Müller a nivel de la GCL y prolongaciones que sobrepasan la ONL.

3.2.2.10 Evaluación de la capa de células ganglionares

Se realizó una descripción de la inmunoexpresión de la Tubulina beta III en las muestras de NR frescas, en los controles de 3 días y en las NR cocultivadas con MSV y se cuantificó la proporción de la intensidad de la Tubulina beta III dividida entre la intensidad del DAPI con el programa ImageJ a partir de 5 imágenes por muestra obtenidas con una magnificación de 20x y fue expresada en unidades arbitrarias (A.U). Además, se cuantificó el número de núcleos teñidos con DAPI en cada una de las capas retinianas y el número de núcleos NeuN positivos correspondientes a las células ganglionares de la retina con el programa ImageJ y el plugin RetFM-J (*ImageJ-based module for automated counting and quantifying features of nuclei in retinal whole-mounts*)⁹² a partir de 12 imágenes por muestra obtenidas con una magnificación de 20x. Al mismo tiempo, se cuantificaron de forma manual los núcleos TUNEL positivos en cada una de las capas retinianas. En todos los casos, el conteo fue realizado por un investigador de forma enmascarada. Las imágenes mostradas se han obtenido a partir de la superposición de zonas retinianas correspondientes marcadas con NeuN, DAPI y TUNEL.

3.2.2.11 Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos fueron recogidos en un cuaderno de laboratorio en papel y trasladados a una hoja Excel (Microsoft Excel 2016®). Los datos representados en esta parte del

trabajo corresponden con la media de los resultados obtenidos en los diferentes experimentos realizados \pm SEM y fueron analizados con el programa SPSS (version 24.0, SPSS, Inc., Chicago, IL, EE.UU.). Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Para el estudio de la inmunofluorescencia cuantificada mediante análisis de imagen se realizó un ANOVA de 1 factor con *post hoc* de Tukey para muestras de distribución normal y similitud de sus varianzas, y se aplicaron test no paramétricos de Kruskal Wallis (para comparaciones de más de dos grupos) y el test de U de Mann Whitney (para comparaciones de dos grupos) para muestras que no cumplieron con una distribución normal. Los datos obtenidos del sistema de gradación de la GFAP fueron expresados en porcentajes (%).

3.2.3 Diseño del ensayo clínico

La presente parte del proyecto consistió en la revisión bibliográfica de todos los ensayos clínicos en terapia celular para el tratamiento de patologías retinianas y del nervio óptico que se encuentran inscritos en el sistema de *ClinicalTrials.gov* y en la *International Clinical Trials Registry Platform* que sirvieron de base para el diseño y la elaboración del protocolo de ensayo clínico piloto titulado: “Estudio de Fase II de la seguridad de las células madre mesenquimales (MSV, PEI 15-007) en inyección intravítrea para el tratamiento de pacientes con neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica aguda”.

Una vez diseñado el protocolo, se procedió a realizar los trámites correspondientes para el registro y la aprobación del ensayo clínico por parte del CEIC correspondiente y de la AEMPS. El protocolo elaborado ha seguido las directrices establecidas por la AEMPS para la realización de ensayos clínicos en terapia celular.

4. RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Fase preclínica in vivo

4.1.1 Animales

Dos conejos (n=2) del grupo control (grupo 4) murieron previamente a la inyección intravítrea por razones ajenas al experimento. La media del peso de los conejos de cada uno de los grupos de estudio osciló entre 2,71 y 3,89 Kg al inicio del estudio y entre 2,76 y 4,46 kg al final del estudio, de manera que hubo un aumento progresivo del peso inicial con respecto al peso final en todos los grupos (Tabla 6). No se detectaron hallazgos patológicos con respecto al comportamiento y al estado físico general de los animales.

Tabla 6. Comparación de las medias \pm error estándar de la media (SEM) del peso inicial y final en cada uno de los grupos

Grupo	Peso inicial	Peso final	Sig. (p)	Seguimiento	
HEMBRAS	1	3,36 \pm 0,39	3,88 \pm 0,29	0,00	6 semanas
	2	3,79 \pm 0,12	4,14 \pm 0,18	0,00	
	3	3,48 \pm 0,23	3,55 \pm 0,20	0,06	
	4	3,89 \pm 0,06	3,94 \pm 0,07	0,00	2 semanas
	5	3,73 \pm 0,58	4,46 \pm 0,21	0,04	
	6	2,71 \pm 0,20	2,94 \pm 0,15	0,20	
MACHOS	7	2,75 \pm 0,09	2,76 \pm 0,15	0,02	6 semanas
	8	3,37 \pm 0,12	3,66 \pm 0,12	0,65	2 semanas

Sig.: significancia estadística $p < 0,05$. (Prueba t de Student para muestras pareadas)

4.1.2 Resultados clínicos en el grupo de conejos hembra

La similitud entre los pesos y las edades de los grupos de conejos permitió reunir los grupos 1 y 4 como control, 2 y 5 como dosis baja y 3 y 6 como dosis alta para facilitar la representación de los resultados.

4. RESULTADOS

4.1.2.1 Polo anterior

Se observó una leve congestión conjuntival en los conejos 1 y 2 (control, n=2), en los conejos 5 y 6 (dosis baja, n=2) y en el conejo 24 (dosis alta, n=1) que apareció en la zona de la inyección durante la primera semana de seguimiento y cedió espontáneamente en la semana 2. Solamente el conejo 11 (dosis baja, n=1) presentó congestión conjuntival moderada en la semana 3, la cual remitió sin tratamiento en la semana 4. No se observaron hallazgos clínicos significativos en la conjuntiva ni en la córnea, y tampoco se detectó la presencia de proteínas inflamatorias en la cámara anterior (flare) en ninguno de los grupos de estudio durante el período de seguimiento.

Se observó la presencia de una inflamación del iris en algunos de los conejos de los grupos experimentales. El conejo 10 (dosis baja) presentó una inflamación leve del iris en la semana 4 que remitió espontáneamente. El conejo 12 (dosis baja) presentó una inflamación moderada del iris en la semana 2 y 3 que remitió espontáneamente. El conejo 18 (dosis alta) presentó una inflamación leve del iris en la semana 4 que remitió espontáneamente. En el conejo 19 (dosis alta) se observó inflamación leve del iris en la semana 2 que aumentó progresivamente hasta llegar a ser severa en la semana 4 y luego desapareció sin tratamiento. El conejo 20 (dosis alta) presentó inflamación moderada en la semana 2 y 3 que luego remitió espontáneamente. El conejo 24 (dosis alta) presentó una inflamación severa del iris en la semana 1 que remitió espontáneamente. Solamente se han representado los hallazgos positivos encontrados durante la exploración oftalmológica (Figura 5).

Con respecto al cristalino, solamente el conejo 3 del grupo control (n=1) desarrolló una catarata subcapsular posterior que se observó desde la semana 1 sin modificaciones durante el período de seguimiento. En algunos conejos de los grupos experimentales se observó la presencia de opacidades vítreas retrolentales (detrás del cristalino) que simulaban una catarata posterior (Figura 6). Estas opacidades variaban de posición de una semana a otra y se observaron principalmente entre la semana 1 y 4 de seguimiento en los conejos 10 y 11 (dosis baja, n=2) y en los conejos 17, 20 y 21 (dosis alta, n=3) sin otros hallazgos asociados.

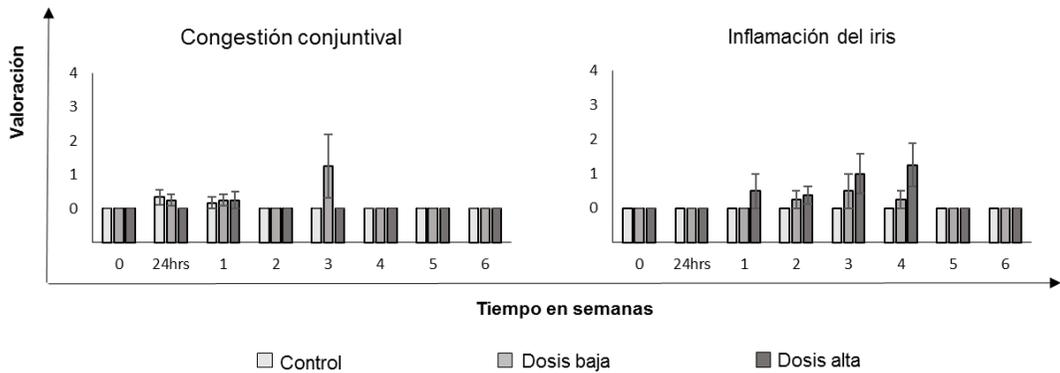


Figura 5. Evolución de los signos clínicos positivos en los conejos tras la inyección intravítrea. Durante la mayor parte del tiempo de seguimiento, la mayoría de los conejos presentaron ausencia o cambios inflamatorios leves que desaparecieron espontáneamente. El tiempo 0 corresponde al momento inmediatamente posterior a la inyección intravítrea. Datos obtenidos de la media aritmética \pm SEM de 6 animales (control) y de 8 animales para cada uno de los grupos experimentales (dosis baja y dosis alta). Test estadísticos: test no paramétrico U de Mann Whitney. Sig. Estadística: $p < 0,05$.

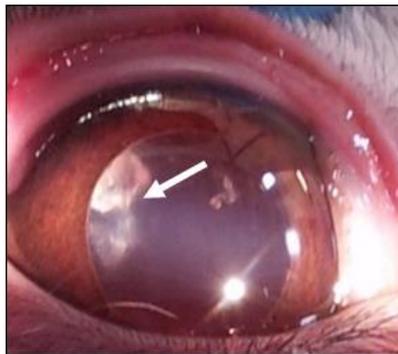


Figura 6. Opacidad retrocristaliniana (flecha) observada mediante lámpara de hendidura en el conejo 21 (dosis alta) en la semana 3 de seguimiento.

4.1.2.2 Polo posterior

No se observaron células inflamatorias en el vítreo, no obstante, se observaron acúmulos celulares en los conejos 10 y 11 (dosis baja, $n=2$) y en los conejos 17, 20 y 21 (dosis alta, $n=3$) que se localizaron en la zona posterior al cristalino y en la zona anterior a la cabeza del NO. No se observaron hemorragias retinianas ni desprendimientos de retina en ninguno de los grupos. La cabeza del NO conservó una configuración normal a lo largo del seguimiento en todos los grupos.

4. RESULTADOS

4.1.2.3 Presión intraocular (PIO)

La PIO inicial de los ojos izquierdos (ojos no tratados) fue de $9,17 \pm 1,42$ mmHg (rango: 6,0–12,0 mmHg) y no hubo variaciones significativas a lo largo del seguimiento. En los ojos derechos (ojos tratados) la PIO aumentó en todos los grupos inmediatamente después de la inyección intravítrea ($p < 0,05$, ANOVA de 1 factor). A las 24 horas tras la inyección, la PIO disminuyó a valores considerados dentro de la normalidad, con variaciones a lo largo del seguimiento que no fueron estadísticamente significativas (Figura 7).

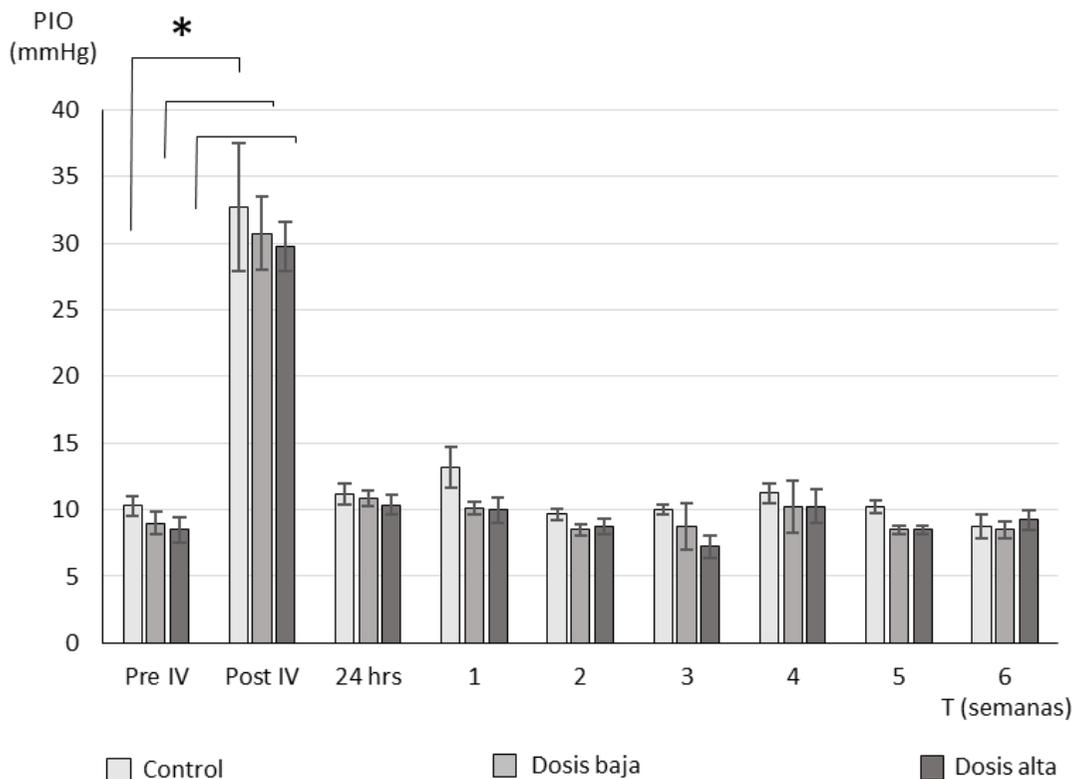


Figura 7. Evolución de la presión intraocular (PIO) en los ojos derechos de los conejos hembras tras la inyección intravítrea. La PIO aumentó en todos los grupos inmediatamente después de la inyección intravítrea ($p < 0,05$). A las 24 horas tras la inyección, la PIO disminuyó a valores dentro de la normalidad, con variaciones a lo largo del seguimiento que no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Datos obtenidos de la media aritmética \pm SEM de 6 animales (control) y de 8 animales para cada uno de los grupos experimentales (dosis baja y dosis alta). Test estadísticos: ANOVA de 1 factor, Test de Bonferroni para varianzas iguales y Test de Games-Howell para varianzas desiguales)

4.1.3 Resultados histológicos en el grupo de conejos hembra

4.1.3.1 Tejidos oculares

Se evaluaron secciones de córnea, ángulo iridocorneal, cristalino, retina y nervio óptico, en las cuales no se observaron alteraciones a nivel histológico en ninguno de los grupos de estudio a las 2 y 6 semanas tras la inyección intravítrea de las MSV (Figura 8).

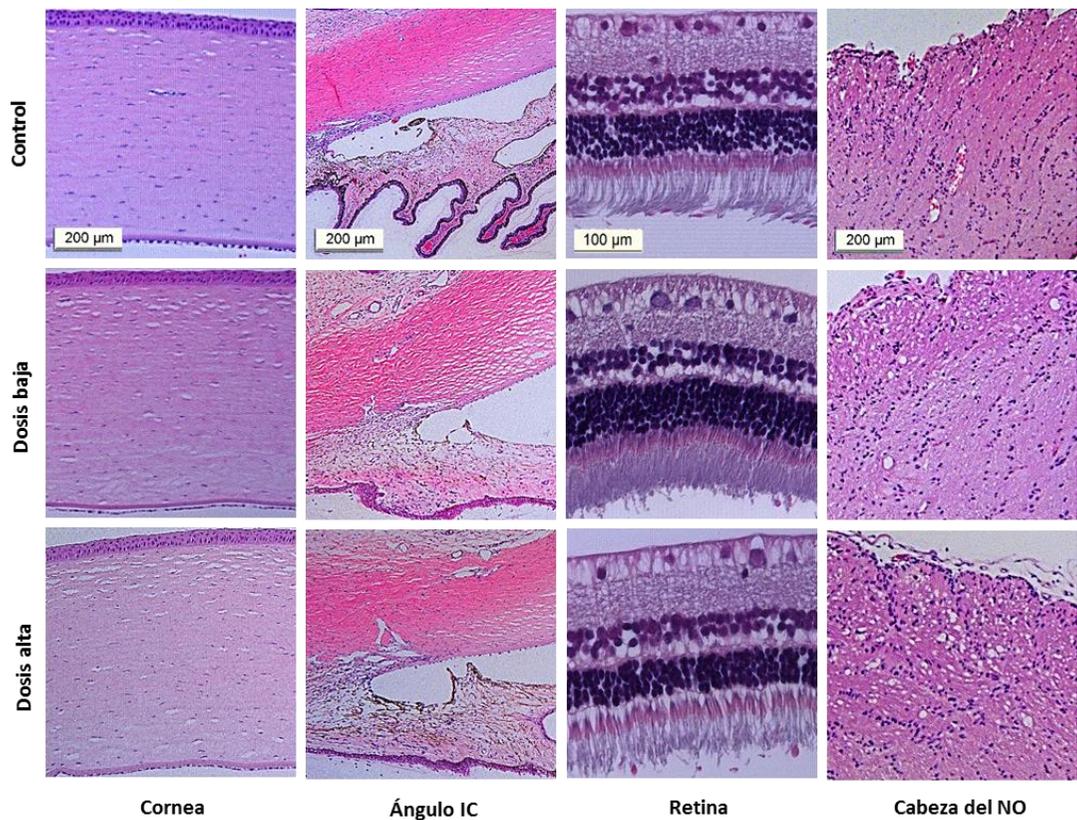


Figura 8. Representación histológica (H-E) de la córnea, el ángulo iridocorneal, la retina y la cabeza del nervio óptico de los animales hembras. Se observa conservada la estructura de los tejidos evaluados en cada uno de los grupos. Muestras obtenidas 6 semanas tras la inyección (IC: iridocorneal; H-E: hematoxilina – eosina).

Se observaron acúmulos celulares en el vítreo retrolental y delante de la cabeza del NO en los grupos experimentales (dosis baja y dosis alta) (Figura 9). De acuerdo con las características histológicas de estas células (aspecto redondeado, con núcleos grandes y poco citoplasma) se

4. RESULTADOS

consideró que correspondían morfológicamente con las MSV inyectadas, que es el aspecto que adoptan cuando se encuentran en suspensión.

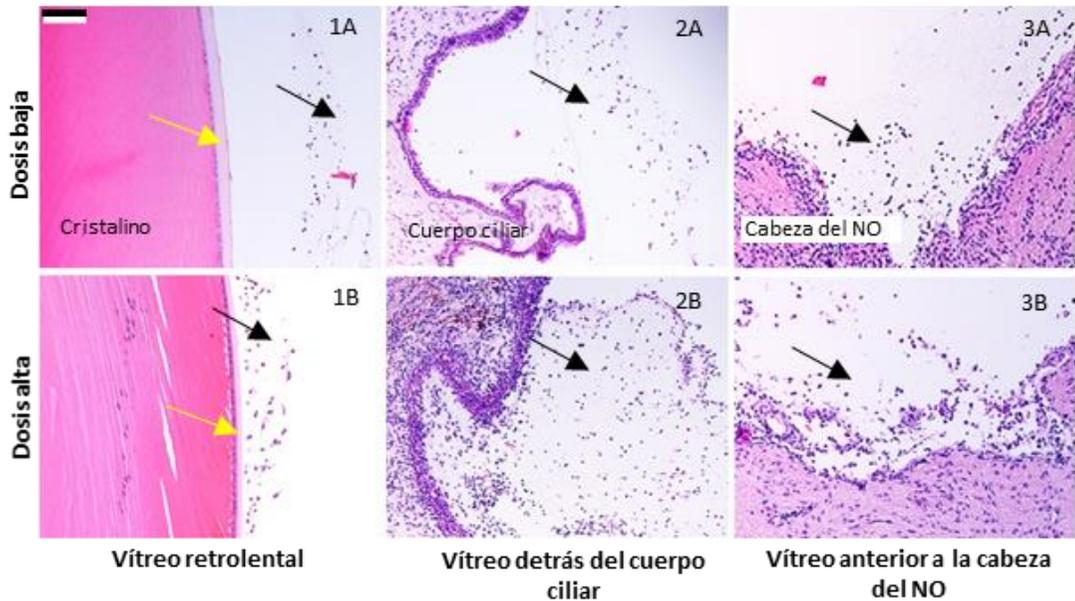


Figura 9. Hallazgos histológicos en diferentes zonas del vítreo dos semanas después de la inyección intravítrea de MSV (dosis baja y dosis alta) en conejos hembras. Se observan acúmulos celulares (flechas negras) en mayor concentración en las figuras 1 – 3B (dosis alta) en comparación con los observados en las figuras 1 – 3A (Dosis baja). De las tres zonas del vítreo representadas, se observa la presencia de un acúmulo de células detrás del cristalino con preservación de su cápsula posterior (1A y 1B, flechas amarillas: cápsula posterior del cristalino), el gran acúmulo celular a nivel del cuerpo ciliar que corresponde al sitio más cercano donde se administró la inyección (2A y 2B) y la zona del vítreo anterior a la cabeza del NO donde se disponen las células (3A y 3B). Barra de escala 100µm

4.1.3.2 Tejidos sistémicos

Se evaluaron secciones de bazo, hígado y ovario, en las cuales tampoco se observaron alteraciones a nivel histológico en ninguno de los grupos de estudio a las 2 y 6 semanas tras la inyección intravítrea de las MSV. Se muestran las imágenes correspondientes al grupo de 6 semanas por ser el de mayor seguimiento del estudio (Figura 10).

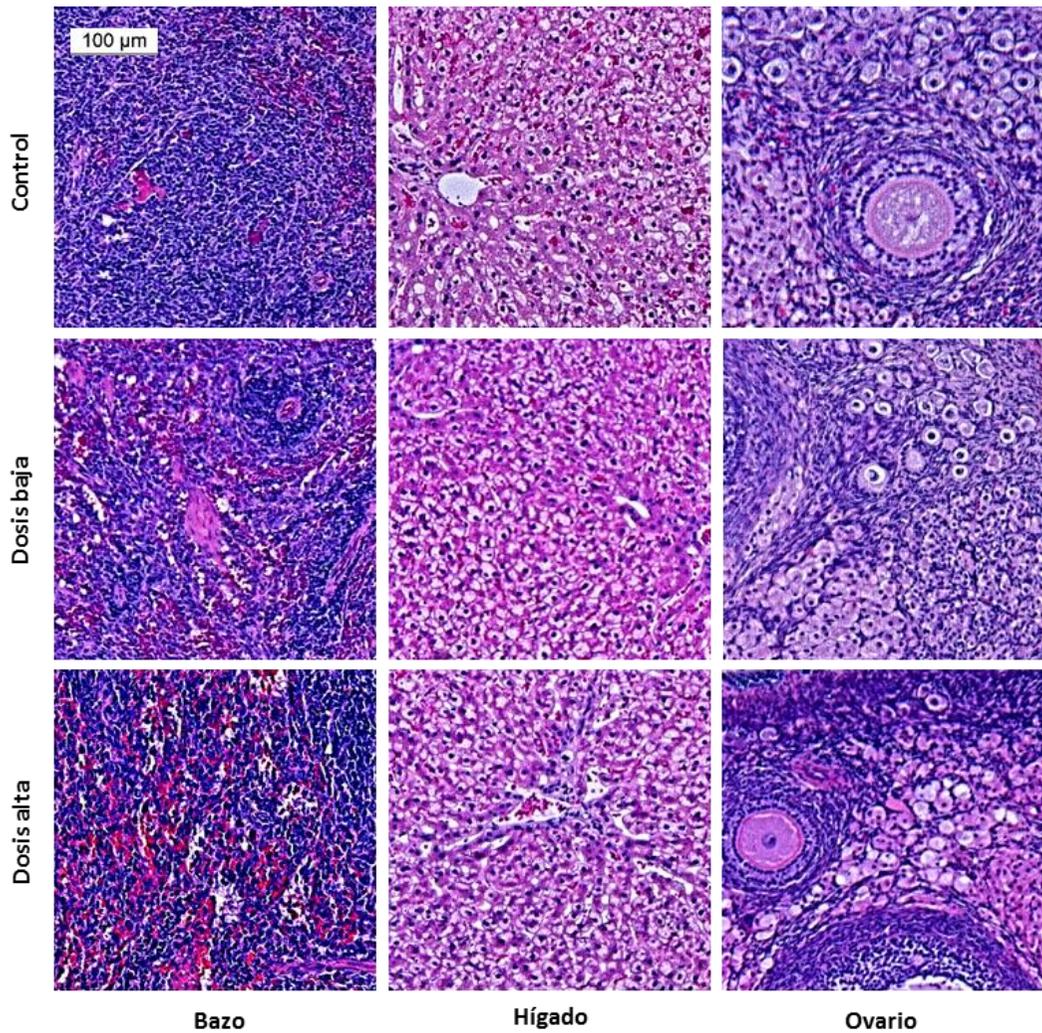


Figura 10. Representación histológica (H-E) del bazo, del hígado y del ovario de los conejos hembras. NO se observaron alteraciones en la estructura de los tejidos evaluados en cada uno de los grupos. Muestras obtenidas 6 semanas tras la inyección intravítrea. (H-E: hematoxilina – eosina).

4. RESULTADOS

4.1.4 Resultados clínicos en el grupo de conejos machos

Una vez obtenidos los resultados clínicos e histológicos de las hembras, se decidió utilizar en la segunda fase (machos) la dosis baja como “dosis mejor tolerada”. La similitud de los pesos y edades de los grupos 7 (2 semanas de seguimiento) y 8 (6 semanas) permitió combinar los grupos para una mejor representación de los resultados.

4.1.4.1 Polo anterior

Con respecto a la conjuntiva, se observó la presencia de secreción conjuntival leve y moderada (conejo1 y 2 respectivamente, pertenecientes al grupo 7) 24 horas después de la inyección intravítrea. Esta secreción se resolvió espontáneamente. En relación a la córnea, cámara anterior e iris, no se observaron hallazgos anormales durante el seguimiento. El cristalino fue normal en todos los ojos excepto en el conejo 3 (grupo 7), que presentó opacidad leve de la cápsula posterior en la semana 2 de seguimiento. Al igual que se ha descrito en el experimento con animales hembra, estas opacidades detectadas en la oftalmoscopia, se corresponden con la presencia de células en vítreo, como se observa en la evaluación histológica (Figura 11).

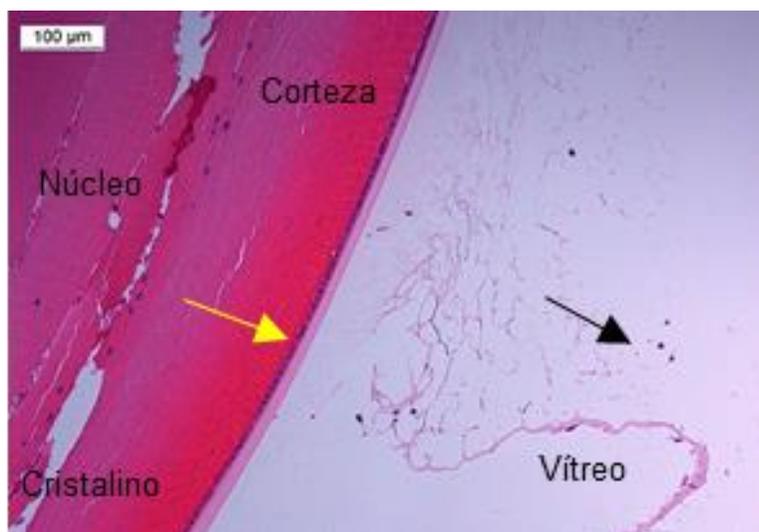


Figura 11. Hallazgos histológicos del cristalino y el vítreo retrolental 2 semanas después de la inyección intravítrea de MSV (dosis mejor tolerada). Se observa la cápsula posterior del cristalino preservada (flecha amarilla) y escasas células en el vítreo retrolental (flecha negra) compatibles con MSV.

4.1.4.2 Polo posterior

Los acúmulos celulares en vítreo se observaron en el conejo 3 (n=1) 24 horas después de la inyección y en la semana 2 de seguimiento. No se observaron células inflamatorias en vítreo, ni hemorragias retinianas, ni tampoco desprendimientos de retina. El nervio óptico conservó un aspecto fisiológico en todos los animales.

4.1.4.3 Presión intraocular

La PIO de los ojos izquierdos (ojos no tratados) fue de $12,89 \pm 0,35$ mmHg (rango de 9,0 a 21,0 mmHg) con ligeras variaciones no significativas a lo largo del seguimiento. En los ojos derechos (ojos tratados) la PIO aumentó de forma significativa inmediatamente después de la inyección intravítrea en comparación con los ojos izquierdos ($p < 0,05$). A las 24 horas tras la inyección, la PIO disminuyó a valores dentro de la normalidad, con variaciones a lo largo del seguimiento que no fueron estadísticamente significativas (Figura 12).

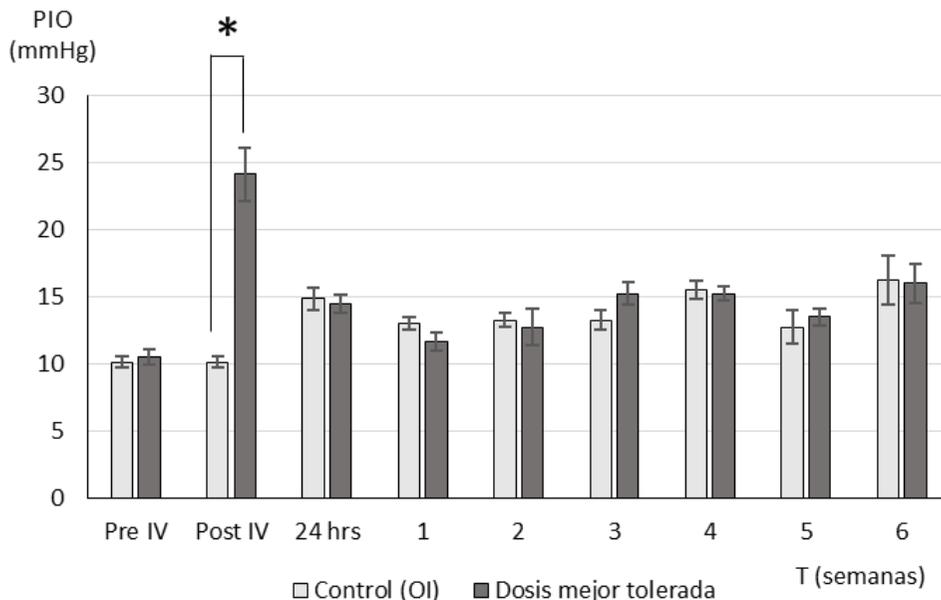


Figura 12. Evolución de la presión intraocular en los conejos machos tras la inyección intravítrea de la dosis mejor tolerada. La PIO del OD (ojo tratado) en comparación con el OI (ojo control) aumentó significativamente después de la inyección intravítrea ($p < 0,05$). A las 24 horas tras la inyección, la PIO disminuyó a valores dentro de la normalidad, con variaciones a lo largo del seguimiento que no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Datos obtenidos de la media aritmética \pm SEM de 8 animales (dosis mejor tolerada). La PIO de los ojos izquierdos (ojos no tratados) fue considerada como control. Test estadístico: t de student para muestras independientes.

4. RESULTADOS

4.1.5 Resultados histológicos en el grupo de conejos machos

4.1.5.1 Tejidos oculares y sistémicos

Al igual que en el grupo de conejos hembras, no se observaron alteraciones histológicas de los tejidos oculares (cornea, ángulo iridocorneal, retina y nervio óptico) y sistémicos (bazo, hígado y testículo) evaluados a las dos y seis semanas tras la inyección intravítrea “de la dosis mejor tolerada” de MSV. Se muestran imágenes del grupo de seis semanas por ser el de mayor seguimiento de estudio (Figura 13 y 14).

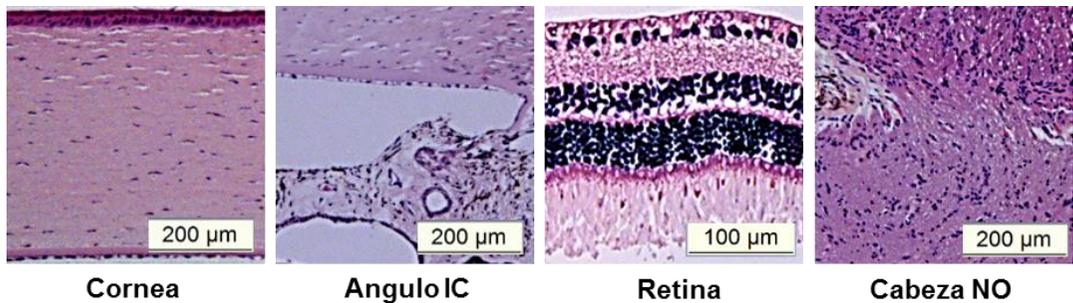


Figura 13. Representación histológica (H-E) de la cornea, el ángulo iridocorneal, la retina y la cabeza del nervio óptico de los conejos machos. No se observaron alteraciones en la estructura de los tejidos evaluados. Muestras obtenidas 6 semanas tras la inyección intravítrea de la dosis mejor tolerada. (IC: iridocorneal; H-E: hematoxilina – eosina).

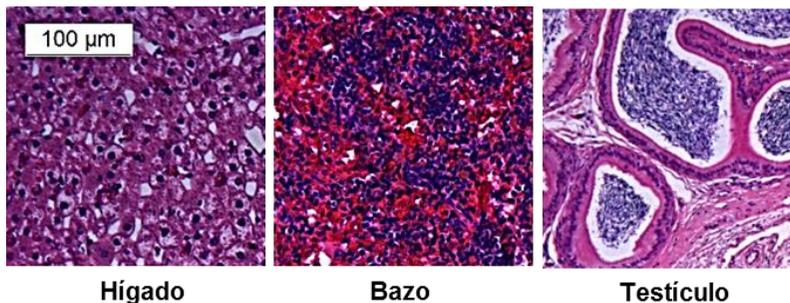


Figura 14. Representación histológica (H-E) del bazo, del hígado y del testículo de los conejos. No se observaron alteraciones en la estructura de los tejidos evaluados 6 semanas tras la inyección intravítrea de la dosis mejor tolerada. (H-E: hematoxilina – eosina).

4.1.6 Evaluación de la supervivencia y la migración de las MSV tras la inyección intravítrea en los animales de experimentación

Los resultados del FISH mostraron que, a las 2 semanas tras la inyección, en los grupos de dosis baja, dosis mejor tolerada y dosis alta, las células inyectadas fueron identificadas en la cavidad vítrea adyacente a la cabeza del nervio óptico y a la retina, sin atravesar la membrana limitante interna (Figura 15).

Estas células no fueron detectadas en otros tejidos oculares, así como tampoco, en los tejidos hematopoyéticos (bazo e hígado) y gónadas (ovario y testículo) evaluados. En las muestras procedentes de los animales sacrificados 6 semanas tras la inyección, no se detectó la presencia de las células MSV en ninguno de los tejidos oculares ni sistémicos evaluados.

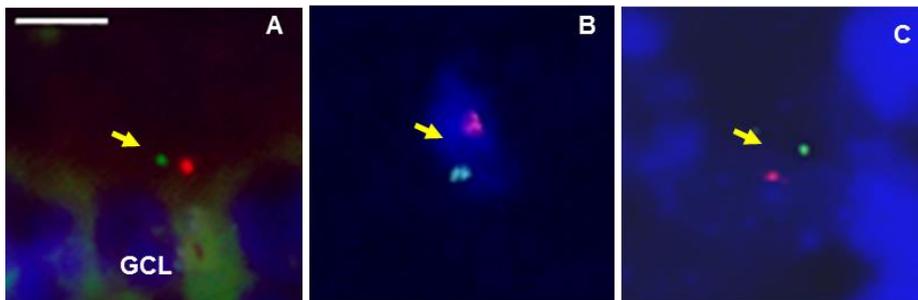


Figura 15. Localización intraocular de las MSV identificadas mediante técnica de hibridación in situ fluorescente (FISH) en el grupo de dosis baja transcurridas dos semanas post-inyección. A. MSV localizada en el vítreo adyacente a la retina periférica. **B.** MSV localizada en la cavidad vítrea retrolental. **C.** MSV localizada en el vítreo anterior al nervio óptico. Imágenes representativas procedentes de 12 animales. Flecha amarilla: células MSV. Rojo: fluorescencia del cromosoma humano X. Verde: fluorescencia del cromosoma humano Y. Azul: fluorescencia de los núcleos celulares contrateñidos con DAPI. (GCL: capa de células ganglionares. Barra de escala 10µm)

4. RESULTADOS

4.2 Fase preclínica in vitro

4.2.1 Caracterización de las MSV

Tras la finalización del experimento, la evaluación del inmunofenotipo de las MSV mostró que, las MSV que estuvieron en co-cultivo con las neuroretinas porcinas, así como también las MSV control, fueron positivas para los marcadores CD44, CD90, STRO-1, CD146 y negativas para los marcadores de superficie de células hematopoyéticas CD14 y CD19 (Figura 16).

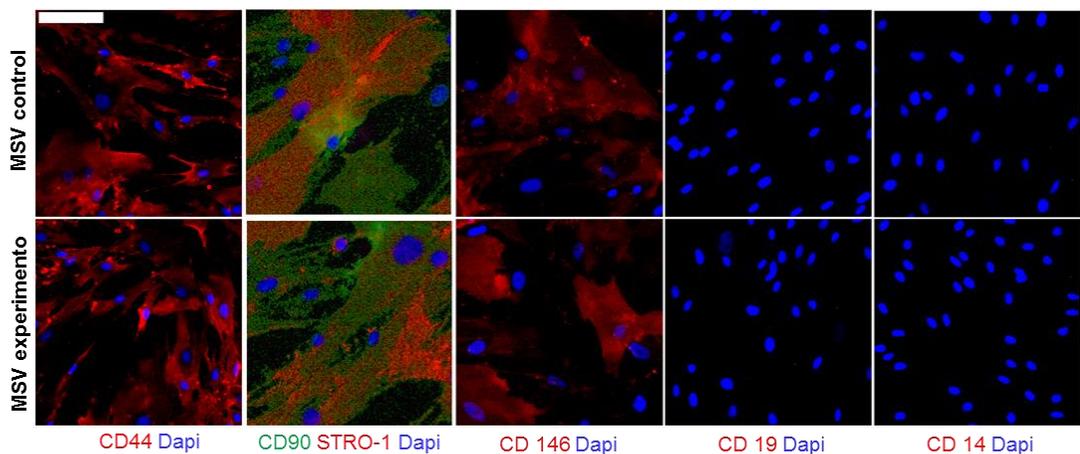


Figura 16. Análisis mediante inmunofluorescencia de la expresión del fenotipo de las MSV tras la finalización del experimento. Se observa que tanto las MSV control, así como las MSV que estuvieron durante tres días en co-cultivo con neuroretinas porcinas fueron positivas para los marcadores CD44, CD90, STRO-1 y CD146 y negativas para los marcadores CD19 y CD14. (Rojo: anticuerpo para CD44, STRO-1 y CD146. Verde: CD90. Azul: tinción de los núcleos con DAPI). Escala de Barra: 100µm

4.2.2 Cuantificación de los factores neurotróficos BDNF, CNTF Y GDNF

La determinación mediante ELISA de los 3 factores de interés potencialmente secretados por las MSV permitió determinar la presencia de BDNF y CNTF en los sobrenadantes de cultivo celular en las diferentes condiciones experimentales. El GDNF no se detectó en ninguno de los sobrenadantes de los cultivos celulares.

Las concentraciones de BDNF detectadas en los sobrenadantes de la condición experimental 1 (cocultivo de NR con MSV y medio) fueron de 3822 (± 127), 3906 (± 115) y 3778 (± 182) pg/ml a

las 24, 48 y 72 horas respectivamente y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo. En los sobrenadantes procedentes de la condición experimental 2 (cultivo de MSV y medio) también se encontraron concentraciones de BDNF que disminuyeron de forma significativa ($p < 0,05$) a lo largo del tiempo (Figura 17). La concentración de BDNF hallada en la condición experimental 2 fue estadísticamente menor en comparación con la hallada en la condición experimental 1 en los tres tiempos estudiados ($p < 0,05$, Figura 17). Los sobrenadantes procedentes de la condición experimental 3 (NR y medio) presentó una concentración muy baja de BDNF la cual disminuyó a las 72 horas ($p < 0,05$). El medio utilizado para el mantenimiento de los cultivos (control) presentó una concentración baja de BDNF que se mantuvo sin cambios a lo largo del tiempo (Figura 17).

En relación con el CNTF, se observó que las concentraciones de este factor en los sobrenadantes procedentes de la condición experimental 1 (cocultivo de NR con MSV y medio) fue de 140 ($\pm 5,77$), 150 ($\pm 30,56$) y 220 ($\pm 15,28$) pg/ml a las 24, 48 y 72 horas respectivamente. Hubo un aumento progresivo en la concentración diaria que fue estadísticamente significativa a las 72 horas ($p < 0,05$, Figura 17). En los sobrenadantes obtenidos de la condición experimental 2 (cultivo de MSV y medio) la concentración de CNTF fue similar en todos los tiempos de estudio y osciló entre 143,33 ($\pm 2,27$) y 160 ($\pm 11,54$) pg/ml. La concentración hallada en la condición experimental 2 fue estadísticamente menor en comparación con la hallada en la condición experimental 1 a las 72 horas de estudio ($p < 0,05$, Figura 17). Los sobrenadantes derivados de la condición experimental 3 (NR y medio) mostraron concentraciones muy bajas de CNTF que descendieron significativamente ($p < 0,05$) a las 72 horas. El medio utilizado para el mantenimiento de los cultivos (control) mostró una concentración muy baja de CNTF que se mantuvo sin cambios a lo largo del tiempo (Figura 17).

4. RESULTADOS

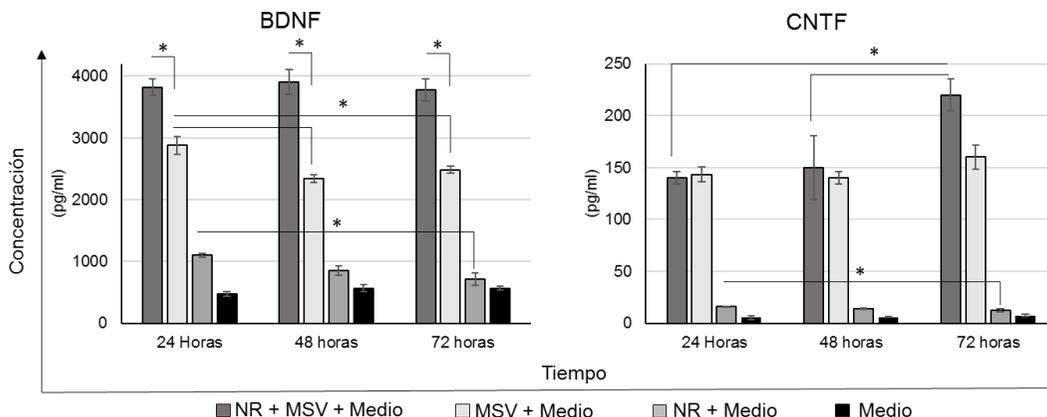


Figura 17. Medias (\pm SEM) de las concentraciones de los factores neurotróficos BDNF y CNTF halladas en los sobrenadantes del cultivo en las diferentes condiciones experimentales a las 24, 48 y 72 horas. NR: Neuroretina, MSV: *Mesenchymal Stem from Valladolid* (PEI 15-007), Medio: Ham/F12. Significancia estadística: * $p < 0,05$. (Test estadísticos: ANOVA de 1 factor, Post-Hoc DMS)

4.2.3 Evaluación histológica y análisis del espesor de las neuroretinas porcinas

Las muestras frescas de NR porcina (control de 0 días) revelaron una adecuada preservación de la estructura retiniana tras la preparación de los explantes y previamente al inicio del cultivo (Figura 18A). Así, se observó una adecuada conservación de los segmentos externos (OS, por sus siglas en inglés) e internos (IS, por sus siglas en inglés) de los fotorreceptores y se diferenciaron claramente las capas neuroretinianas, en particular la capa nuclear externa (ONL, por sus siglas en inglés), la capa plexiforme externa (OPL, por sus siglas en inglés), la capa nuclear interna (INL, por sus siglas en inglés), la capa plexiforme interna (IPL, por sus siglas en inglés) y la capa de las células ganglionares (GCL, por sus siglas en inglés) (Figura 18A), con un grosor retiniano total de $140,92 \pm 2,99 \mu\text{m}$ (Tabla 7, figura 19).

En las NR cultivadas sin MSV (control 3 días), se observó una preservación de la mayor parte de la arquitectura retiniana, pero en los fotorreceptores se observó una pérdida de la mayor parte de los IS y OS (Figura 18B). El grosor retiniano total fue de $81,07 \pm 1,84 \mu\text{m}$ que fue menor en comparación con las NR frescas y las NR cocultivadas con MSV. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$, tabla 7 y figura 19). La ONL, la INL y la GCL mostraron una disminución de su grosor ($21,34 \pm 0,07$; $20,98 \pm 0,97$ y $7,48 \pm 0,87 \mu\text{m}$ respectivamente)

que fue estadísticamente significativo en comparación con las NR frescas y solamente en la ONL con respecto a las NR cocultivadas con MSV (Tabla 7, figura 19).

En las NR cocultivadas con MSV (experimento 3 días), se observó preservada la mayor parte de la estructura retiniana y los fotorreceptores presentaron una pérdida de la mayor parte de los IS y OS similar a lo observado en las NR cultivadas sin MSV (Figura 18C). Con respecto al grosor retiniano total ($96,65 \pm 3,17 \mu\text{m}$) fue menor en comparación con el observado en las NR frescas, pero mayor que el observado en las NR cultivadas sin MSV. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$, tabla 7). El grosor de la ONL, INL y la GCL fue de $27,41 \pm 0,33$; $21,40 \pm 0,90$ y $10,58 \pm 0,96 \mu\text{m}$ respectivamente, los cuales fueron mayores que los observados en las NR cultivadas sin MSV. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas en la ONL (Tabla 7, figura 19).

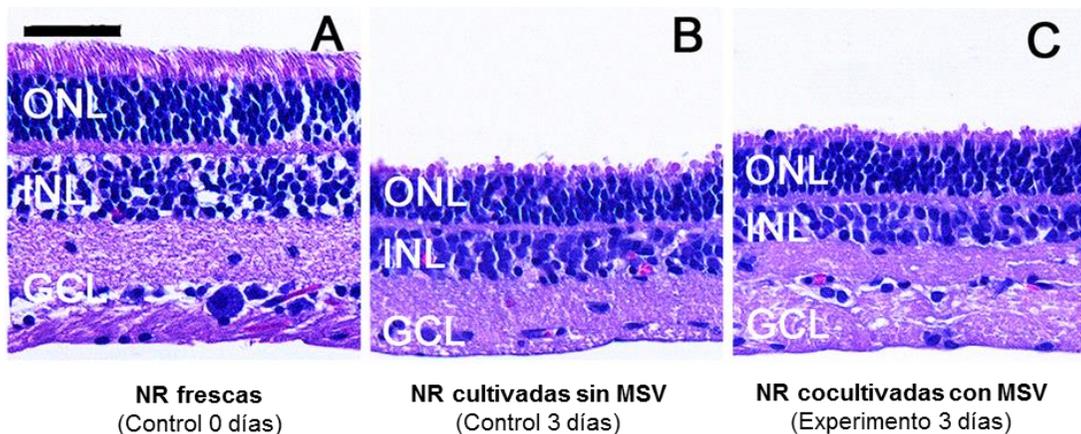


Figura 18. Representación histológica (H – E) de las neurorretinas control y en cocultivo con MSV. A. Explante retiniano en fresco (0 días) donde se observan las capas y el grosor retiniano previo al inicio del cultivo. B. Explante retiniano control (3 días) donde se observa una pérdida de la mayor parte de los IS y OS de los fotorreceptores, una disminución del grosor de la ONL y la INL y una disminución en el número de núcleos de la GCL. C. Explante retiniano experimento (3 días) que muestra la estructura de la retina tras 3 días de cocultivo con MSV, donde se observa también una pérdida de los IS y OS de los fotorreceptores, con una estructura conservada de las ONL e INL, pero con disminución de su grosor. NR: neurorretina. ONL: Outer nuclear layer; INL: Inner nuclear layer; GCL: Ganglion cell layer. Imágenes representativas de 7 neurorretinas porcinas (1 de control de 0 días, 3 de control de 3 días y 3 de experimento de 3 días). Barra de escala: $50\mu\text{m}$.

4. RESULTADOS

Tabla 7. Comparación de medias (\pm SEM) del grosor del grosor retiniano total y por capas

	Neurorretinas porcinas			Sig. Estadística		
	Frescas (Control 0 días)	Cultivadas sin MSV (Control 3 días)	Cocultivadas con MSV (Experimento 3 días)	C0d – C3d	C0d – E0d	C3d – E3d
ONL	31,63 \pm 0,35	21,34 \pm 0,07	27,41 \pm 0,33	0,00	0,00	0,00
OPL	6,82 \pm 0,20	3,56 \pm 0,19	6,72 \pm 0,15	0,00	0,91	0,00
INL	30,81 \pm 1,03	20,98 \pm 0,97	21,40 \pm 0,90	0,00	0,00	0,95
IPL	37,16 \pm 1,41	21,60 \pm 1,15	20,93 \pm 1,39	0,00	0,00	0,93
GCL	19,17 \pm 0,51	7,48 \pm 0,87	10,58 \pm 0,96	0,00	0,00	0,04
TOTAL	140,92 \pm 2,99	81,07 \pm 1,84	96,65 \pm 3,17	0,00	0,00	0,04

MSV: Mesenchymal stem from Valladolid; OLM: Outer limiting membrane; ILM: Inner limiting membrane; ONL: Outer nuclear layer; OPL: Outer plexiform layer; INL: Inner nuclear layer; IPL: Inner plexiform layer; GCL: Ganglion cell layer. Significancia estadística: $p < 0,05$, Test estadísticos: ANOVA de 1 factor, Bonferroni y Tukey.

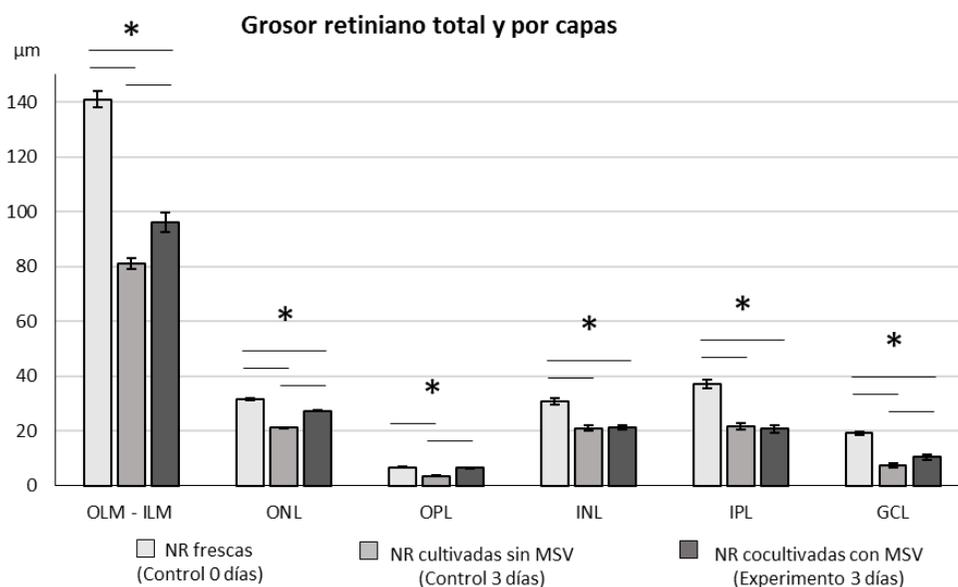


Figura 19. Grosor retiniano total y por capas de los explantes retinianos control (0 y 3 días) y experimento (co-cultivo con MSV 3 días). Se observó que, las NR control de 3 días y experimento de 3 días presentaron una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) del grosor retiniano total en comparación con las NR frescas. También se observó que, el grosor retiniano total de las NR cocultivadas con MSV, fue estadísticamente mayor ($p < 0,05$) al observado en las NR cultivadas sin MSV. El espesor total retiniano fue obtenido de la media \pm SEM de la longitud entre la OLM y la ILM de cada uno de los grupos. Con respecto al grosor por capas, hubo una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) del grosor de la ONL, la OPL y la GCL de las NR cultivadas sin MSV en comparación con las NR cocultivadas con MSV. Significancia estadística: $p < 0,05$ *. Test estadísticos: ANOVA de 1 factor y Tukey.

4.2.4 Estudio de las células gliales

En las muestras de NR frescas (control 0 días) se observó la inmunexpresión de la proteína GFAP en las capas retinianas más internas ($0,37 \pm 0,02$ A.U), correspondiente con las células de Müller y los astrocitos, sin sobrepasar la GCL (Grado 1, tabla 8). Las capas nucleares (INL y ONL) se apreciaron marcadas con DAPI, con una organización y localización adecuado en el parénquima retiniano (Figura 20A,D).

En las NR cultivadas sin MSV (control de 3 días), se observó un aumento en la inmunexpresión de la proteína GFAP ($1,10 \pm 0,17$ A.U) (Figura 20B,D), que se extendió a lo largo del tejido retiniano y sobrepasó la GCL, hasta llegar a la INL y en algunos puntos a la ONL (Grado 3 y 4, tabla 8). Este aumento fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en comparación con las NR frescas y con las NR cocultivadas con MSV (Figura 20D).

En el caso de las NR cocultivadas con MSV (Experimento 3 días) se observó la inmunexpresión de la proteína GFAP a nivel de la GCL, sin sobrepasar la IPL (Grado 2, tabla 8). Así, la expresión de GFAP en estas muestras ($0,59 \pm 0,09$ A.U) fue estadísticamente mayor que en las NR control de 0 días, pero menor que en las NR control de 3 días (Figura 20C,D).

Tabla 8. Gradación de la inmunexpresión de GFAP (%) en los explantes de retina de cerdo

Grado	NR frescas (Control 0 días)	NR cultivadas sin MSV (Control 3 días)	NR cocultivadas con MSV (Experimento 3 días)
1	90	-	10
2	10	-	80
3	-	80	-
4	-	20	-
5	-	-	-

NR: Neuroretina

4. RESULTADOS

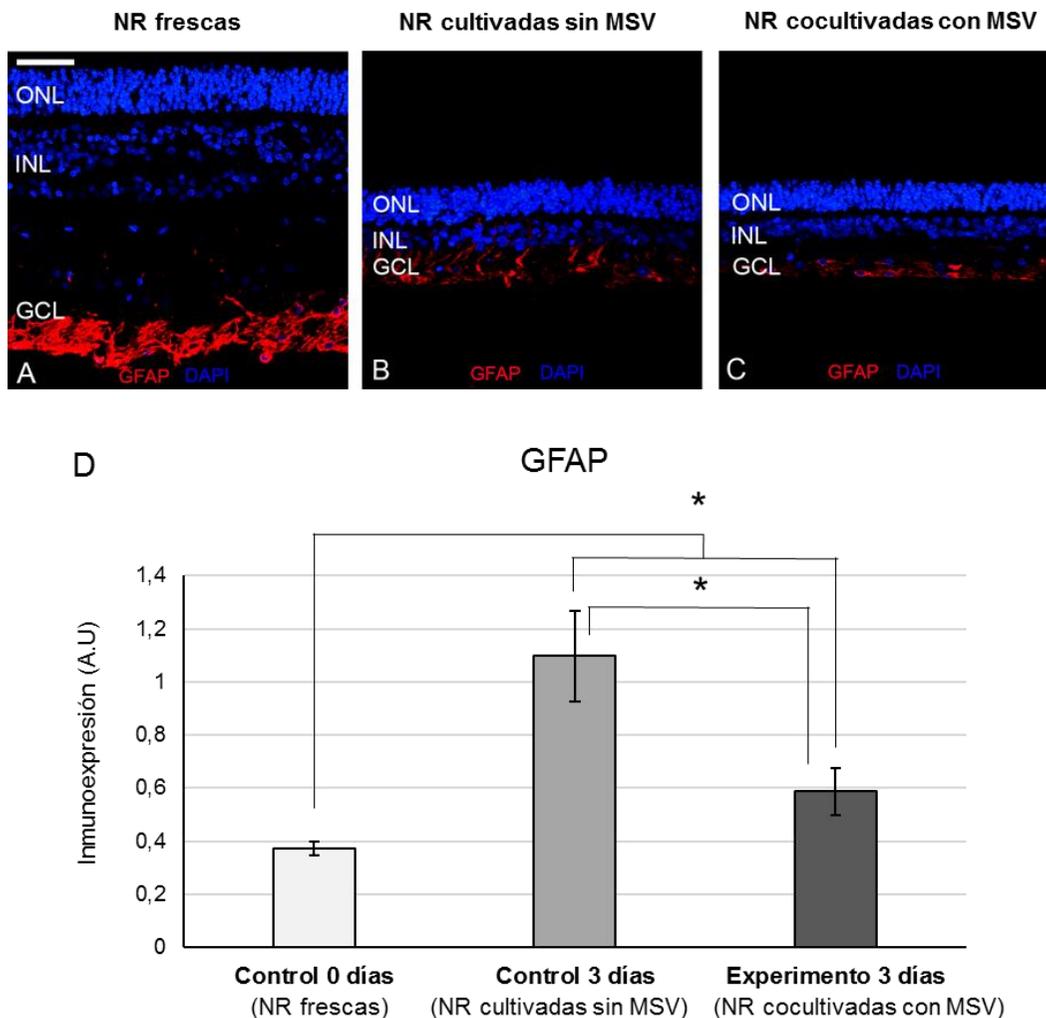


Figura 20. Inmunoexpresión de la GFAP en los explantes retinianos. **A.** NR control (0 días). Se observó la expresión de la proteína GFAP (rojo) en la GCL. Las capas nucleares (INL y ONL) se apreciaron marcadas con DAPI (azul), con una organización y localización adecuada en el parénquima retiniano **B.** NR control (3 días). Se observó un aumento en la expresión de la proteína GFAP que se extendió a lo largo del tejido retiniano y sobrepasó la GCL, hasta llegar a la INL y en algunos puntos a la ONL. **C.** NR experimento. Se observó la expresión de GFAP a nivel de la GCL, sin sobrepasarla. **D.** Medias (\pm SEM) de la inmunoexpresión de la GFAP en los explantes retinianos. El aumento de la GFAP observado en las muestras control de 3 días fue estadísticamente significativo en comparación con las muestras control de 0 días y con las muestras cocultivadas con MSV (experimento). Mientras que la proporción de GFAP en las muestras experimento, fue estadísticamente mayor que en las muestras control de 0 días, pero menor que en los controles de 3 días. (Significancia estadística $*p < 0,05$, evaluada con el test estadístico de Kruskal Wallis y en parejas con la U de Mann Whitney). NR: neuroretina. ONL: Outer nuclear layer; INL: Inner nuclear layer; GCL: Ganglion cell layer. Imágenes representativas de 7 neuroretinas porcinas (1 de control de 0 días, 3 de control de 3 días y 3 de experimento de 3 días). Barra de escala: 50 μ m.

4.2.5 Estudio de las células ganglionares de la retina

En las muestras de NR frescas (0 días), la inmunoexpresión de la Tubulina beta III ($0,13 \pm 0,26$ A.U) se observó principalmente a nivel de la capa de fibras nerviosas, observándose un marcaje homogéneo, organizado, predominantemente en el soma (cuerpo neuronal) y en las prolongaciones de las RGC que no sobrepasó la GCL (Figura 21A).

En las NR cultivadas sin MSV (control 3 días) la inmunoexpresión de la Tubulina beta III fue de $0,29 \pm 0,48$ A.U y el marcaje observado fue predominantemente dendrítico, observándose numerosas fibras nerviosas a nivel de la GCL que se extendían hasta la INL (Figura 21B). En estas muestras la inmunoexpresión de la Tubulina beta III fue significativamente mayor que la observada en las NR frescas (Figura 21D).

En las NR cocultivadas con MSV (3 días) la cuantificación de la inmunoexpresión de Tubulina beta III fue de $0,11 \pm 0,23$ A.U con un marcaje similar al observado en las NR frescas en cuanto al marcaje citoplasmático de las RGC y también un marcaje de fibras nerviosas entre la GCL y la IPL significativamente menor al observado en las muestras de NR cultivadas sin MSV (Figura 21 A-D).

4. RESULTADOS

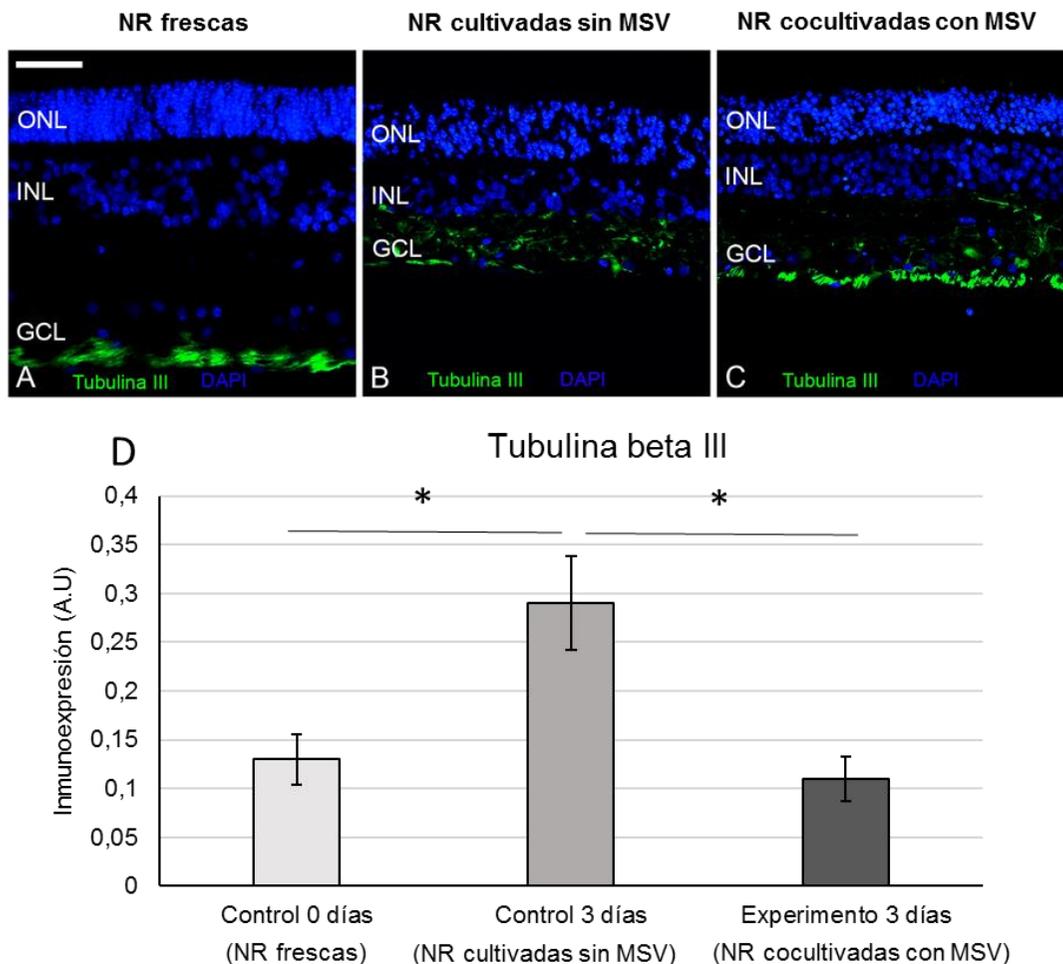


Figura 21. Inmunoexpresión de la Tubulina beta III en los explantes retinianos. **A.** Control (0 días). En estos explantes se observó la expresión de la proteína Tubulina beta III (verde) a nivel de la capa de fibras nerviosas, el marcaje fue predominantemente citoplasmático (cuerpo neuronal) y de las prolongaciones de las RGC que no sobrepasaron la GCL. Las capas nucleares se apreciaron marcadas con DAPI (azul), con una organización y localización adecuada en el parénquima retiniano **B.** Control (3 días). En las NR cultivadas sin MSV, la inmunoexpresión de la Tubulina beta III fue predominantemente dendrítica, observándose numerosas fibras nerviosas a nivel de la GCL que se extendían hasta la INL. **C.** Experimento (3 días). En las NR cocultivadas con MSV el marcaje fue similar al observado en las NR frescas en cuanto al marcaje citoplasmático de las RGC y también un marcaje de fibras nerviosas entre la GCL y la IPL. **D.** Medias (\pm SEM) de la inmunoexpresión de la Tubulina beta III en los explantes retinianos. El aumento de la Tubulina beta III observado en las muestras control de 3 días fue estadísticamente significativo en comparación con las muestras control de 0 días y con las muestras co-cultivadas con MSV (experimento). (Significancia estadística $*p < 0,05$, evaluada con el test de ANOVA de 1 factor y en parejas con el test de Games Howell). NR: neuroretina. ONL: Outer nuclear layer; INL: Inner nuclear layer; GCL: Ganglion cell layer. Imágenes representativas de 7 neuroretinas porcinas (1 de control de 0 días, 3 de control de 3 días y 3 de experimento de 3 días). Barra de escala: 50 μ m.

La inmunexpresión del anticuerpo NeuN fue principalmente nuclear con el que se pudo observar la presencia de los núcleos correspondientes a las RGC (Figura 22A-C). El conteo total de núcleos en los explantes de NR cultivadas sin MSV ($762,33 \pm 32,40$) y en los cocultivos con MSV ($871,83 \pm 39,46$) mostró una disminución en comparación con las NR frescas ($903,64 \pm 53,83$). Esta disminución fue mayor en el grupo de NR cultivadas sin MSV, pero no fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$) (Figura 22A-D).

El número de núcleos en la ONL de las NR frescas fue de $505 \pm 26,33$, en las NR cultivadas sin MSV fue de $439,38 \pm 17,78$ y en las NR cocultivos con MSV fue de $460,33 \pm 25,01$. En relación a la INL el número de núcleos en las NR frescas fue de $340,91 \pm 24,37$, en las NR cultivadas sin MSV fue de $283,38 \pm 11,45$ y en las NR cocultivos con MSV fue de $338,50 \pm 10,79$. El número de núcleos en la GCL de las NR frescas fue de $32,36 \pm 3,72$, en las NR cultivadas sin MSV fue de $12,38 \pm 1,32$ y en las NR cocultivos con MSV fue de $19,67 \pm 1,75$. El conteo de núcleos por capas mostró una disminución en el número de núcleos a nivel de la ONL, INL y GCL de las NR cultivadas sin MSV en comparación con las NR frescas y con las NR cocultivos con MSV. Esta disminución fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$) a nivel de la INL, así como también en la GCL en la comparación de todos los grupos (Figura 22D).

En relación a la apoptosis celular, no se observaron núcleos TUNEL positivos en las muestras de NR frescas (Figura 22A). En las NR cultivadas sin MSV el número total de núcleos TUNEL positivos ($43,18 \pm 7,04$) fue mayor en comparación con las NR cultivadas con MSV ($22,50 \pm 2,43$, Figura 22B-E). Este aumento en la apoptosis se observó en cada una de las capas nucleares y fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en la ONL y en el número total de núcleos de toda la retina (Figura 22E).

4. RESULTADOS

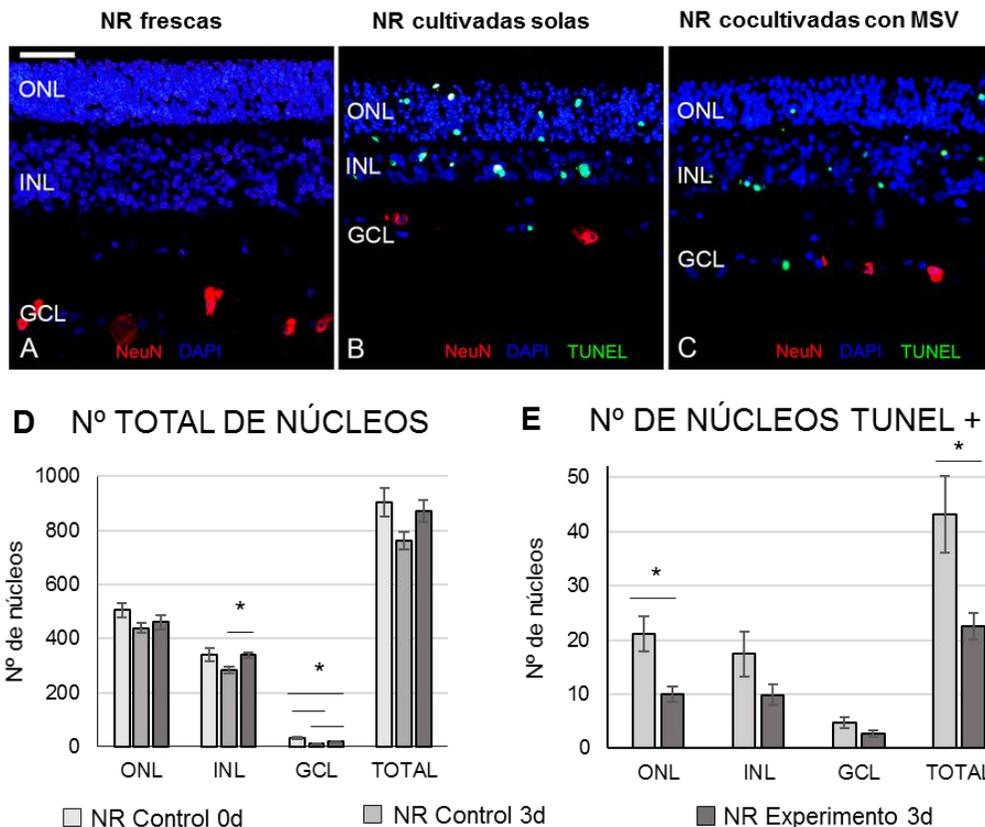


Figura 22. Inmunoexpresión de NeuN y TUNEL en los explantes retinianos. **A.** NR control de 0 días. Se observaron los núcleos de ONL y de la INL marcados con DAPI (azul) y la expresión de la proteína NeuN (rojo) en la GCL, correspondiente a los núcleos de las células ganglionares de la retina. **B** NR control 3 días. En este grupo se observó un menor número de núcleos en las diferentes capas retinianas y la presencia de núcleos en apoptosis (verde) correspondiente al marcaje del TUNEL. **C.** NR experimento de 3 días (Co-cultivo de NR con MSV). Se observó la presencia de núcleos en apoptosis en menor proporción con respecto a las NR control de 3 días. **D.** Medias (\pm SEM) del n° de núcleos DAPI totales y en cada una de las capas nucleares retinianas y de núcleos NeuN positivos en la GCL. **E.** Medias (\pm SEM) del n° de núcleos en apoptosis (TUNEL positivos) total y en cada una de las capas nucleares retinianas. Significancia estadística * $p < 0,05$, test estadísticos utilizados: ANOVA de 1 factor, test de Kruskal Wallis y U de Mann Whitney). NR: neurorretina. ONL: Outer nuclear layer; INL: Inner nuclear layer; GCL: Ganglion cell layer. Imágenes representativas de 7 neurorretinas porcinas (1 de control de 0 días, 3 de control de 3 días y 3 de experimento de 3 días). Escala de la barra: 50 μ m.

4.3 Protocolo de ensayo clínico

A continuación, se expone el protocolo de EECC en terapia celular diseñado para la patología de estudio, el cual ha sido aprobado por el CEIC del área este de Valladolid y por la AEMPS en septiembre de 2016 y en febrero de 2017, respectivamente (Anexo 1 y 2).

4.3.1 Resumen del protocolo

Título del ensayo clínico

Estudio fase II de la seguridad de las células madre mesenquimales (MSV, PEI: 15-007) en inyección intravítrea en pacientes con neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica (NOIA-NA) aguda.

Código del protocolo / Número Eudra

IOBA-01-2016 / EUDRACT - 2016-003029-40

Investigador principal

José Carlos Pastor Jimeno, MD PhD

Centro participante

Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA)

Comité ético de investigación clínica

CEIC de Referencia: CEIC Área Valladolid Este.

Producto experimental

Nombre de las células: MSV (Mesenchymal Stem from Valladolid).

PEI: 15-007 MSV®

Forma de aplicación: inyección intravítrea a través de una aguja de 25G

Volumen a administrar: 100 µl.

Concentración: $1,5 \times 10^6$ células/ml

4. RESULTADOS

Fase del ensayo clínico

Ensayo clínico Fase II

Objetivo principal

Evaluar la seguridad de la administración intravítrea de MSV (PEI 15-007) en pacientes con neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica aguda en los momentos iniciales del proceso.

Diseño

Estudio piloto, prospectivo, abierto, nacional, unicéntrico.

Enfermedad o trastorno del estudio

Neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica aguda

Variable principal de valoración

No desarrollar una reacción inflamatoria de: Gradación de células en cámara anterior >1+ y/o gradación del flare en cámara anterior > 1+ y/o gradación del flare en vítreo > 2+ según la clasificación SUN en los pacientes con neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica aguda hasta 12 meses tras el tratamiento valorable en cada visita.

Población en estudio y nº total de pacientes

Se prevé reclutar pacientes con NOIANA en un solo centro (IOBA) hasta obtener 5 pacientes que finalicen el estudio.

Duración del tratamiento

2 años.

Calendario y fecha prevista de finalización

Inicio del periodo de reclutamiento durante el tercer trimestre de 2017.

Final del periodo de reclutamiento en diciembre de 2018, prorrogable si no se alcanza el número requerido de pacientes.

Fecha prevista de finalización diciembre de 2019.

4.3.2 Justificación

Expuesta en la justificación de este trabajo.

4.3.3 Objetivo general

Evaluar la seguridad de la administración intravítrea de células madre mesenquimales MSV (PEI 15-007) en pacientes con neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica aguda (NOIANA).

4.3.3.1 Variable principal de valoración

Se considerará como seguro el tratamiento si no se desarrollan cualquiera de las siguientes:

- una reacción inflamatoria ≥ 1 cruz en el polo anterior,
- reacción fibrinoide en la cámara anterior
- reacción de ≥ 2 cruces en el polo posterior en los pacientes con neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica aguda hasta 12 meses tras el tratamiento.

4.3.3.2 Variables secundarias

- Se evaluarán efectos adversos relacionados con la técnica de inyección intravítrea tales como: la aparición de hemorragias subconjuntivales, la inflamación de la cámara anterior, los cambios en la presión intraocular, la posible aparición de una endoftalmitis infecciosa, la inflamación en cavidad vítrea (células u opacidades), el desprendimiento de retina, el desprendimiento de coroides, las opacidades corneales, la opacidad del cristalino, la neovascularización, el edema macular o cualquier otro hallazgo adverso que pudiera detectarse.
- Acontecimientos adversos.
- Se evaluarán cambios en la agudeza visual (AV) y en las pruebas de electrofisiología ocular.

4. RESULTADOS

4.3.4 Selección de pacientes

4.3.4.1 Tipo de pacientes

Pacientes que presenten una NOIANA aguda (entre las primeras dos semanas tras el inicio de los síntomas), que cumplan con los criterios de inclusión y exclusión establecidos definidos más adelante (apartado 4.3.4.3).

4.3.4.2 Número de sujetos previstos y justificación del mismo.

La NOIANA, patología objeto de estudio en este proyecto, afecta a un número de pacientes significativo, tiene un alto grado de recurrencia en el ojo contralateral y no posee un tratamiento efectivo en la actualidad. Por ello, es necesario desarrollar y evaluar nuevas terapias que mantengan o mejoren la función visual, y, por tanto, la calidad de vida de los pacientes afectados.

El número de pacientes a reclutar será el necesario hasta lograr que 5 pacientes finalicen el estudio. Dicha cifra concuerda con los requisitos de un ensayo clínico de esta fase y con la prevalencia de la enfermedad en la población que abarcan los centros médicos mencionados durante el período de duración del estudio, teniendo en cuenta las prevalencias publicadas. La incidencia de la NOIANA se estima en 2,3 -10 individuos por cada 100.000 habitantes/año en Estados Unidos. En Croacia se estima en 2,5 - 3,8 individuos por cada 100.000 habitantes /año. Dado que no existen estudios epidemiológicos publicados en España, es asumible que la incidencia en España sea similar a estos dos estudios publicados.

Para el cálculo del tamaño muestral se ha tomado en cuenta la población mayor de 50 años de Castilla y León, específicamente de Valladolid y Palencia, donde es esperable que haya entre 5 y 28 casos nuevos por año. Dichos pacientes serán identificados a su llegada al IOBA o a los servicios de urgencias del Hospital Clínico Universitario de Valladolid y del Complejo Asistencial de Palencia. El reclutamiento de estos pacientes para su inclusión en el estudio planteado se llevará a cabo en las instalaciones clínicas del IOBA, y se verá condicionado por el cumplimiento de los criterios de inclusión y de exclusión establecidos.

4.3.4.3 Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión

- Pacientes con NOIANA aguda unilateral (entre las primeras 2 semanas tras el inicio de los síntomas). Los pacientes diagnosticados de NOIANA definida por al menos dos de las siguientes características clínicas:
 - Pérdida brusca e indolora de la visión monocular.
 - Defectos del campo visual.
 - Discromatopsia.
 - Edema de la cabeza del nervio óptico.
 - Defecto pupilar aferente relativo (DPAR).
- Pacientes ≥ 50 años de edad, capaz de otorgar libremente el consentimiento informado para la participación en el estudio.
- Agudeza visual entre $\leq 0,1$ en el ojo afectado.
- Pacientes pseudofáquicos en el ojo afectado.
- Motilidad del músculo esfínter pupilar conservada.
- Pacientes que entiendan y firmen el consentimiento informado previo a cualquier prueba del estudio.
- Firma del formulario de protección de datos previo a cualquier prueba del estudio.

Criterios de exclusión generales

- Evidencia de arteritis de células gigantes (historia clínica, VSG, PCR)
- Evidencia de cualquier otra etiología que justifique la neuropatía óptica (incluso en el ojo contralateral)
- Antecedentes de vasculitis sistémica, esclerosis múltiple, colagenopatías o tratamientos para cáncer.
- Test de embarazo positivo en visita basal en mujeres fértiles. A tal efecto se considerará mujer no fértil aquella menopausia de al menos 1 año desde la visita basal, ooforectomía bilateral y/o histerectomía total con anexectomía.
- Hipersensibilidad o alergia a cualquiera de los principios activos o los excipientes de la medicación.

4. RESULTADOS

- Participación en cualquier otro estudio clínico con fármacos o instrumentos diagnósticos o terapéuticos en los dos meses anteriores a la participación en el estudio.

Criterios de exclusión oftalmológicos

- Antecedentes de uveítis o inflamación ocular activa.
- Antecedentes o evidencias de glaucoma o PIO ≥ 24 mmHg en cualquiera de los dos ojos.
- Opacidad de medios, patologías retinianas en el ojo afectado.
- Pacientes sometidos a cualquier cirugía de vítreo o glaucoma en el ojo afectado
- Cirugía de catarata previa en los 3 meses anteriores en el ojo afectado.

4.3.4.4 **Criterios diagnósticos para la patología en estudio**

Es necesario que los pacientes presenten signos y síntomas compatibles con neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica en uno de los ojos, tales como:

- Pérdida brusca e indolora de la visión monocular.
- Defectos del campo visual arcuatos, altitudinales, centrales o cecocentrales.
- Discromatopsia.
- Edema de la cabeza del nervio óptico sectorial o generalizado.
- Defecto pupilar aferente relativo (DPAR).

4.3.4.5 **Enfermedades asociadas**

Toda la patología previa, así como la presente en el momento de inclusión en el estudio serán anotadas en la visita de selección. Así mismo, se anotarán los procedimientos quirúrgicos convenientemente justificados con la patología que provocó su realización. Toda la medicación que el paciente tenga prescrita también será anotada en la historia clínica y trasladada a la parte del cuaderno de recogida de datos (CRD) correspondiente a la visita de selección.

A partir del momento de inclusión se reflejarán en la historia clínica y serán trasladadas al CRD todas aquellas enfermedades, empeoramiento de enfermedades presentes, cambios en medicación y procedimientos intercurrentes que el paciente tenga durante el periodo de

duración del estudio, con la consecuente evaluación de dichos cambios como acontecimiento adverso o reacción adversa según corresponda.

4.3.4.6 Criterios previstos para la retirada del estudio

De acuerdo con la legislación vigente y la Declaración de Helsinki, el paciente podrá retirarse del estudio en cualquier momento, por cualquier motivo, pudiéndolo expresar personalmente o a través de su representante.

El Investigador Principal del estudio podrá retirar a un paciente en las siguientes situaciones:

- Violación de los criterios de inclusión o exclusión.
- No realización de 2 visitas del estudio, consecutivas o no.
- Paciente poco cooperador o que plantee problemas para el normal transcurso del estudio.
- Acontecimiento adverso grave o inesperado bien por sus características o por el tratamiento necesario para su resolución, según el criterio del Investigador Principal. Número o gravedad inesperada de reacciones adversas.

Deberá procurarse que el paciente realice una visita de retirada prematura, equivalente en pruebas a la Visita Mes 12, en aquellos casos en los que sea posible. De cualquier forma, la razón de retirada prematura del paciente deberá ser documentada en la historia clínica o documentos fuente del estudio, así como en el CRD.

Para todos los pacientes que abandonen el estudio el investigador seguirá los siguientes procedimientos, siempre que sea posible:

- Seguimiento de los efectos secundarios a largo plazo.
- Seguimiento de los acontecimientos adversos graves durante los 3 meses siguientes a la finalización de su participación en el estudio y hasta su resolución en caso de que hayan aparecido previamente a su salida.

4. RESULTADOS

4.3.4.7 Interrupción prematura del estudio

La interrupción prematura del estudio podrá sobrevenir por solicitud del Promotor, decisión de las autoridades competentes o según criterio del Comité Ético de Investigación Clínica.

El Investigador principal y/o el promotor se reservan el derecho a interrumpir el estudio por motivos médicos, administrativos o de insuficiente reclutamiento.

4.3.5 Descripción del tratamiento o plan y métodos de tratamiento.

4.3.5.1 Descripción de la dosis, forma de administración y duración del seguimiento post-tratamiento.

Células madre mesenquimales:

Nombre de las células: MSV (Mesenchymal Stem from Valladolid).

PEI: 15-007 MSV

Forma de aplicación: inyección intravítrea con una aguja de calibre 25G

Volumen a administrar: 100 μ l (0.1ml) en una única dosis intravítrea.

Concentración: $1,5 \times 10^6$ células/ml

Las fases de obtención de las células MSV (PEI 15-007) han sido expuestas previamente en el apartado 3.2.1.2 (Material y métodos)

Composición cualitativa y cuantitativa

El producto en investigación se presentará en una jeringa de 1ml luer lock que contendrá 150 μ l de medio isotónico compuesto por Ringer-lactato + Albúmina Humana al 0.5% + Glucosa 5 mM con una concentración celular de $1,5 \times 10^6$ células/ml. Se inyectará una suspensión de 100 μ l (0.1ml) en la cavidad vítrea del paciente por vía pars plana, a una distancia del limbo de 3,5 mm en estos ojos que serán todos pseudofáquicos. Los 50 μ l restantes se pierden al enrasar la aguja.

Acondicionamiento y etiquetado

La medicación del estudio estará identificada por dos etiquetas, una en la jeringa y otra troquelada y adhesiva que deberá colocarse en la zona correspondiente a la identificación de medicación de estudio en el CRD. Una muestra puede verse en el anexo

Así mismo contendrá el código del protocolo, forma farmacéutica, vía de administración, entidad elaboradora y director técnico, lote, fecha de caducidad, condiciones de conservación, instrucciones de administración en la lengua oficial y la inscripción “muestra para investigación clínica”. Deberá ser almacenada siempre en un ambiente refrigerado (2 a 8°C).

Conservación y retirada de la medicación del estudio

El investigador principal será responsable de la recepción del Producto en Investigación, tarea que podrá delegar bajo su supervisión en una persona suficientemente cualificado para ello.

Posología y forma de administración

El PEI 15-007 (MSV) será administrado por un oftalmólogo que tenga experiencia en la administración de inyecciones intravítreas. Se utilizará una jeringa precargada para un solo uso, únicamente para vía intravítrea. La dosis será única. El calibre de la aguja será de 25G ya que mediante el estudio preclínico se comprobó la viabilidad celular >90% de las MSV a su paso por este calibre de aguja. El procedimiento se llevará a cabo bajo condiciones asépticas, que incluyen el lavado quirúrgico de las manos, el uso de guantes estériles, un campo estéril, un blefaróstato estéril y la disponibilidad de una paracentesis estéril (en caso necesario) y será realizado en un quirófano del área clínica del IOBA, siguiendo las recomendaciones de las guías de práctica clínica de la Sociedad Española de Retina y Vítreo (SERV).⁹³

Los pacientes recibirán anestesia tópica con lidocaína al 2%, luego se empleará povidona yodada al 10% para limpiar la piel de los párpados, el borde palpebral y las pestañas, y al 5% para el saco conjuntival, dejándola actuar durante tres minutos. Posteriormente se colocará el blefaróstato. El lugar de la inyección será marcado con una jeringa sin aguja desde el limbo hacia la pars plana con una distancia de 3,5 mm en ojos pseudofáquicos. Una vez administrada la inyección intravítrea, se administrará un colirio antibiótico de amplio espectro como el

4. RESULTADOS

moxifloxacino o el ciprofloxacino, dos gotas tras la aplicación de la inyección y luego, una gota cada 8 horas durante cinco días después del procedimiento.⁹³

4.3.5.2 Normas especiales para el manejo de los fármacos del estudio

Toda la medicación del estudio será enviada al IOBA. Se recibirá el medicamento (jeringa precargada de 15-007 MSV® para inyección intravítrea) en un ambiente refrigerado (2 a 8 °C), proveniente de la Unidad de Producción Celular del Instituto de Biología y Genética Molecular de la Universidad de Valladolid 20 minutos previos a la administración del medicamento al paciente. Ambos centros se encuentran a 1,5 km de distancia, lo que corresponde a 5 minutos en coche.

El producto en investigación se presentará en una jeringa de 1ml luer lock que contendrá 150 µl de medio isotónico compuesto por Ringer-lactato + Albúmina Humana al 0.5% + Glucosa 5 mM con una concentración celular de $1,5 \times 10^6$ células/ml, de los cuales solo se inyectará una suspensión de 100 µl (0.1ml) a través de una aguja de calibre 25 (25G).

4.3.5.3 Tratamientos concomitantes

No estarán permitidos los tratamientos tópicos oculares de forma general, debiendo ser evaluados caso por caso, exceptuando el uso de lágrimas artificiales, en el ojo de estudio.

4.3.5.4 Medicación de rescate

En caso de reacciones adversas graves al medicamento o a alguno de sus excipientes se procederá a valorar el tratamiento con el fármaco o procedimiento que corresponda de acuerdo a la reacción adversa observada. En caso de reacción inflamatoria leve-moderada se usarán colirios tópicos antiinflamatorios y midriáticos. En caso reacción inflamatoria severa que no sea controlada con colirios tópicos se valorará la indicación de vitrectomía según la evolución del caso. Para reacciones adversas relacionadas con la vía de administración ver el siguiente apartado (4.3.5.5).

4.3.5.5 Reacciones relacionadas con las inyecciones intravítreas

Las inyecciones intravítreas (de cualquier fármaco en presentación intravítrea), se han asociado a endoftalmitis (0,03% a 0,16%), inflamación intraocular (0,5 a 1,5%), desprendimiento de retina regmatógeno (0,01 a 0,08%), desgarro retiniano y catarata traumática iatrogénica (0,01%). Siempre que se administre el PEI 15-007 (MSV) solución inyectable en jeringa precargada se deberán emplear técnicas de inyección asépticas adecuadas. Además, deberá realizarse un seguimiento de los pacientes durante la semana posterior a la inyección para poder administrar un tratamiento temprano en caso de infección. Se deberá instruir a los pacientes sobre la necesidad de comunicar inmediatamente cualquier síntoma que sugiera endoftalmitis o cualquiera de los acontecimientos mencionados anteriormente.

Las MSV (PEI 15-007) en solución inyectable para inyección intravítrea no se administrará de forma concurrente con otros medicamentos intravítreos.

Aumento de la presión intraocular:

Se han observado aumentos transitorios de la presión intraocular (PIO) en los 60 minutos siguientes a la inyección de fármacos intravítreos. También se han identificado aumentos sostenidos de la PIO. Por lo tanto, la presión intraocular será monitorizada y tratada adecuadamente.

Aplazamiento del tratamiento MSV (PEI 15-007) solución inyectable en jeringa precargada:

La administración se deberá aplazar y el tratamiento no deberá administrarse en caso de:

- Presión intraocular de ≥ 24 mmHg;
- Rotura retiniana
- Hemorragia subretiniana
- Desgarro del epitelio pigmentario de la retina
- Desprendimiento de retina regmatógeno o agujeros maculares

4. RESULTADOS

4.3.6 Desarrollo del estudio y evaluación de la respuesta

4.3.6.1 Visita de selección y evaluación oftalmológica

Se determinará el papel de cada oftalmólogo previamente al inicio del estudio, de modo que habrá un “Oftalmólogo administrador del tratamiento” que será el que administre la inyección intravítrea de la dosis utilizada; y habrá un “Oftalmólogo evaluador” que será el que valore la evolución del paciente y será el que realice la exploración oftalmológica antes y después de la inyección intravítrea.

Antes de la inclusión, se explicará a todos los pacientes la naturaleza del estudio, los riesgos y los beneficios potenciales asociados al mismo, el calendario de visitas y las alternativas terapéuticas para su proceso. Los pacientes deberán firmar un formulario de consentimiento informado que se considerará un documento único junto con la hoja de información al paciente. Además, deberán firmar un formulario de protección de datos.

Durante la visita de selección, todos los pacientes serán sometidos a una exploración oftalmológica completa, la cual incluirá: medida de la agudeza visual mejor corregida (AVMC), exploración del polo anterior y del polo posterior, junto con retinografía y autofluorescencia, medida de la presión intraocular (PIO), pruebas electrofisiológicas, que incluirán potenciales visuales evocados con flash (PVEF), así como la tomografía de coherencia óptica (OCT) de dominio espectral del nervio óptico y de la mácula antes y después de la inyección intravítrea.

La evaluación de la AV se realizará utilizando los optotipos del Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study (ETDRS).

La evaluación del polo anterior se realizará con lámpara de hendidura y la fundoscopia se realizará bajo midriasis farmacológica utilizando oftalmoscopia indirecta con lentes de no contacto.

Posteriormente, se dejará registro de las imágenes del área del polo posterior y del nervio óptico mediante retinografía en color y autofluorescencia.

Las pruebas electrofisiológicas (PVEF) se llevarán a cabo siguiendo los criterios estándar definidos por la International Society of Clinical Electrophysiology and Vision (<http://www.iscev.org>).

La cuantificación de la presión intraocular (PIO) se evaluará con el tonómetro de aplanación de Goldmann.

Los cambios en el grosor macular y en la cuantificación de las fibras nerviosas de la cabeza del NO se evaluarán con tomografía de coherencia óptica (OCT-Stratus Spectral Domain, Carl Zeiss Meditec, Inc., Dublin, Calif., USA). Las imágenes topográficas de la mácula y del disco óptico al estar completamente automatizadas, permitirán realizar comparaciones de bases de datos normativas y análisis de evolución (análisis de tendencias) mediante las diferentes opciones de detección sistemática que proporciona esta tecnología.

Deberán registrarse además la historia médica, la historia oftalmológica, la medicación concomitante y los procedimientos médico-quirúrgicos previos de relevancia.

Con toda la información anterior deberá recogerse en la documentación fuente que el paciente cumple con los criterios de inclusión y exclusión y puede ser incluido en el estudio. En caso afirmativo se citará al paciente para la visita basal. En caso negativo, se registrará al paciente en el listado de preselección del estudio como fallo de selección, con sus iniciales, fecha de la visita y fecha de la firma del consentimiento informado.

4.3.6.2 Desarrollo o secuencia del estudio

El ensayo clínico constará de 1 visita basal, 1 visita de administración del PEI y 6 visitas de seguimiento. Para establecer el orden de las visitas, se considerará la visita basal como día 0. Sin embargo, todas las visitas de seguimiento se calcularán a partir de la fecha de la visita de administración del tratamiento, como se muestra a continuación (Figura 23):

4. RESULTADOS

Visita Basal:

El investigador deberá evaluar que los pacientes cumplan con los criterios de inclusión y de exclusión, así como deberá explicar el consentimiento informado a los pacientes. Además, deberá llevar a cabo las siguientes evaluaciones:

• **Entrevista al paciente:**

- Firma del consentimiento informado
- Criterios de inclusión y de exclusión
- Historia clínica
- Síntomas y signos (tiempo de evolución, antecedentes de amaurosis fugax, alteración en el campo visual, escotomas, alteración en la visión de los colores, cefalea, etc.)
- Patologías concomitantes y medicación actual.

• **Exploración oftalmológica:**

- Cuantificación de la Agudeza Visual Mejor Corregida (AVMC)
- Test electrofisiológicos
- Biomicroscopía de Polo Anterior (BMPA)
- Presión intraocular (PIO)
- Exploración en midriasis del fondo de ojo con registro mediante retinografía y autofluorescencia
- OCT

• **Otras exploraciones:**

- Analítica de sangre para la determinación de la velocidad de sedimentación globular y la proteína C reactiva.
- Hemograma y serología para Virus Hepatitis B, Virus hepatitis C, sífilis y HIV.

Visita de administración del tratamiento o V0:

Tras 7 días +2/-4 días de la visita basal y tras confirmar que el paciente cumple con los criterios de inclusión y exclusión, se procederá a la administración del PEI a estudio.

Además, se recogerán los cambios en medicación concomitante y los acontecimientos adversos que hubiesen podido suceder desde la visita previa.

Dos horas después del tratamiento el investigador deberá evaluar:

- Presión intraocular (PIO)
- Biomicroscopía de Polo Anterior (BMPA)
- Exploración del fondo de ojo
- Visita de seguimiento 1 (Día 1 respecto a la Visita de administración del PEI):
- Presión intraocular (PIO)
- Biomicroscopía de Polo Anterior (BMPA)
- Exploración en midriasis del fondo de ojo

Además, se recogerán los cambios en medicación concomitante y los acontecimientos adversos que hubiesen podido suceder desde la visita previa. Si se aprecian cambios en la BMPA se realizará la fotografía de segmento anterior correspondiente.

Visita de seguimiento 2 (Día 7 +/- 2 respecto a la Visita de administración del PEI):

- Cuantificación de la Agudeza Visual Mejor Corregida (AVMC)
- Presión intraocular (PIO)
- Biomicroscopía de Polo Anterior (BMPA)
- Exploración del fondo de ojo

Además, se recogerán los cambios en medicación concomitante y los acontecimientos adversos que hubiesen podido suceder desde la visita previa. Si se aprecian cambios en la BMPA se realizará la fotografía de segmento anterior correspondiente.

Visita de seguimiento 3 (Día 30 +/-3 respecto a la Visita de administración del PEI):

Igual a la visita de seguimiento 2.

4. RESULTADOS

Visita de seguimiento 4 (Día 90 +/-5 respecto a la Visita de administración del PEI):

Igual a la visita de seguimiento 2.

Visita de seguimiento 5 (Día 180 +/-5 respecto a la Visita de administración del PEI):

- Cuantificación de la Agudeza Visual Mejor Corregida (AVMC)
- Test electrofisiológicos
- Biomicroscopía de Polo Anterior (BMPA)
- Presión intraocular (PIO)
- Exploración del fondo de ojo con registro opcional mediante retinografía y autofluorescencia
- OCT

Se recogerán los cambios en medicación concomitante y los acontecimientos adversos que hubiesen podido suceder desde la visita previa. Si se aprecian cambios en la BMPA se realizará la fotografía de segmento anterior correspondiente.

Visita de seguimiento 6 (Día 360 +/-5 respecto a la Visita de administración del PEI):

- Cuantificación de la Agudeza Visual Mejor Corregida (AVMC)
- Test electrofisiológicos
- Presión intraocular (PIO)
- Biomicroscopía de Polo Anterior (BMPA)
- Exploración del fondo y registro opcional mediante retinografía y autofluorescencia
- OCT

Y se recogerán los cambios en medicación concomitante y los acontecimientos adversos que hubiesen podido suceder desde la visita previa. Si se aprecian cambios en la BMPA se realizará la fotografía de segmento anterior correspondiente.

Visita de salida prematura del estudio:

- Cuantificación de la Agudeza Visual Mejor Corregida (AVMC)
- Biomicroscopía de Polo Anterior (BMPA)
- Presión intraocular (PIO)

- Exploración del fondo de ojo y registro opcional mediante retinografía y autofluorescencia
- OCT

También, se recogerán los cambios en medicación concomitante y los acontecimientos adversos que hubiesen podido suceder desde la visita previa, así como el motivo y fecha de la salida del estudio del paciente. Si se aprecian cambios en la BMPA se realizará la fotografía de segmento anterior.

Visita no programada:

Se especificará qué motivó la necesidad de una visita no programada.

Las pruebas a realizar dependerán de lo que motivó la visita, especificando qué procedimientos no se llevaron a cabo. Además, se recogerán los cambios en medicación concomitante y los acontecimientos adversos que hubiesen podido suceder desde la visita previa. Si se aprecian cambios en la BMPA se realizará la fotografía de segmento anterior correspondiente.

4. RESULTADOS

	Visita Basal	Visita 0 (TX)	V1	V2	V3	V4	V5	V6	NP	SP
Día		VB +7	V0+1	V0+7	V0+30	V0+90	V0+180	V0+360		
Ventana		+2/-4 Días	+2 Días	+2 Días	+2 Días	+2 Días	+2 Días	+2 Días		
Consentimiento Informado	✓									
Criterios Inclusión	✓	✓								
Historia clínica	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Síntomas y signos	✓									
Patología actual	✓									
Medicación concomitante	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
AVMC ETDRS	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Electrofisiología	✓						✓	✓		✓
BMPA	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
PIO	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Fondo de Ojo	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Fotografía de fondo	✓					✓**	✓**	✓**	✓**	✓**
Autofluorescencia	✓					✓**	✓**	✓**	✓**	✓**
Fotografía segmento anterior			✓*	✓*	✓*	✓*	✓*	✓*	✓*	✓*
OCT	✓				✓	✓	✓	✓	✓	✓
Análítica VSG - Proteína C	✓									
Serología	✓									
Tratamiento		✓								
Evaluación seguridad postTX		✓								
Acontecimientos adversos		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Las pruebas marcadas con * sólo se realizarán en caso de hallazgos en la exploración del polo anterior. Las marcadas con ** quedan a discreción del investigador.

Figura 23. Cronograma de actividades para realizar en las visitas programadas

4.3.7 Acontecimientos adversos

Se define como acontecimiento adverso todo acontecimiento que ocurra durante el estudio clínico, ya se trate de una enfermedad intercurrente o accidente, y altere el bienestar del enfermo. El acontecimiento podrá adoptar también la forma de una anomalía de laboratorio. El término acontecimiento adverso no implica ninguna relación causal con el tratamiento del estudio.

Todos los acontecimientos adversos, incluidas las enfermedades intercurrentes, serán notificados y documentados según se describe más adelante.

Los acontecimientos adversos serán divididos en las categorías de graves y no graves, que determinan el procedimiento a seguir para la notificación y documentación de los mismos.

4.3.7.1 **Acontecimientos adversos graves**

Se define como acontecimiento adverso grave:

- Todo acontecimiento que cause la muerte o amenace la vida del enfermo.
- Todo acontecimiento que provoque una discapacidad permanente.
- Todo acontecimiento que requiera o prolongue la hospitalización.
- Todo acontecimiento que suponga cáncer, anomalías congénitas o sea consecuencia de una sobredosis (administración de una dosis mayor de la estipulada).

4.3.7.2 **Acontecimiento adverso no grave**

Los acontecimientos adversos que no pertenezcan a ninguna de las categorías citadas anteriormente se calificarán como no graves.

4.3.7.3 **Clasificación de la gravedad y relación con el tratamiento**

Clasificación de la gravedad

Con independencia de que el acontecimiento adverso sea clasificado como grave o no grave (véase apartados anteriores), su intensidad será evaluada como leve, moderada o severa de acuerdo con criterios exclusivamente médicos.

- Leve: No impide las actividades rutinarias
- Moderado: Interfiere las actividades rutinarias
- Severo: Imposibilita las actividades rutinarias.

Debe tenerse en cuenta que un acontecimiento adverso severo no necesariamente debe ser grave y que un acontecimiento adverso grave no siempre es, por definición, severo. Todos los

4. RESULTADOS

acontecimientos adversos graves, con independencia de su severidad, se notificarán según se describe anteriormente.

Relación con el tratamiento

El investigador debe intentar explicar cada acontecimiento adverso y valorar su relación con el tratamiento de prueba (probable, posible, sin relación). Los criterios para establecer la relación entre las reacciones adversas clínicas y la medicación del estudio comprenden:

Probable: Se considera que el acontecimiento adverso guarda una probable relación con el producto en investigación (PI) si reúne los tres criterios siguientes:

1. Existe una relación temporal razonable entre la administración del medicamento y el acontecimiento adverso y
2. Se cumplen cualquiera de los siguientes criterios:

El acontecimiento adverso es un ejemplo típico de reacción adversa al PI conocida, de tal manera que:

- Si se continúa el tratamiento, persiste el acontecimiento adverso.
- Si cesa la administración del producto, desaparece el acontecimiento adverso.
- Si se produce una reexposición, reaparece el acontecimiento adverso.

3. En caso de que exista otra explicación del acontecimiento adverso (tratamiento concomitante, enfermedad intercurrente), esta explicación es menos probable como causa del acontecimiento adverso.

Posible: Se considera como reacción adversa posiblemente relacionada con el PI, aquella que cumpla los dos criterios siguientes:

1. Existe una relación temporal razonable entre la administración del PI y el acontecimiento adverso.
2. No se cumple ninguno de los criterios establecidos en el punto 2 anterior (probable) o existe otra explicación alternativa más verosímil del acontecimiento adverso.

Sin relación: Se catalogará el acontecimiento adverso como hecho sin relación con el PI cuando cumpla alguno de los siguientes requisitos:

1. No se observa una relación temporal razonable entre la administración del medicamento y el inicio de la reacción adversa.
2. No resulte plausible desde el punto de vista biológico la relación causal entre el PI y el acontecimiento adverso.
3. Exista otra explicación alternativa más verosímil del acontecimiento adverso.

4.3.7.4 **Monitorización, notificación y documentación de los acontecimientos adversos**

Se llevará a cabo por una CRO.

4.3.8 Consideraciones éticas y legales

4.3.8.1 **Comité Ético (Helsinki)**

El EECC se realizará en conformidad con los principios de la Declaración de Helsinki (1964) revisada por última vez en Fortaleza (2013) y con las Normas de Buena Práctica Clínica (NBPC).

El estudio será realizado después de que se haya obtenido la aprobación de protocolo por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del centro, de acuerdo con la legislación local, y tras la autorización de la Agencia Española del Medicamento.

El comité ético recibirá los siguientes documentos:

- Protocolo.
- Hoja de Información al Paciente y Pagina de Consentimiento Informado.
- Manual del Investigador o Resumen de las Características del Producto.
- Enmiendas al protocolo
- Informe de los acontecimientos adversos graves y reacciones adversas al fármaco no esperadas, que pudieran poner en peligro la seguridad del paciente, de acuerdo con la normativa vigente.

4. RESULTADOS

Los pacientes participantes en el estudio serán informados del curso del estudio y del almacenamiento de sus datos personales. Serán informados del carácter voluntario de su participación en el estudio y de la posibilidad de retirarse sin ningún perjuicio. Se obtendrá el Consentimiento Informado por Escrito de los pacientes. Los datos y resultados de los exámenes recogidos en este estudio son confidenciales. Estos podrán únicamente ser revisados o transmitidos dentro del ámbito del Consentimiento Informado por Escrito.

4.3.8.2 **Consentimiento informado**

El paciente debe otorgar su consentimiento antes de ser admitido en el estudio clínico. El médico habrá de explicar la naturaleza, propósitos y posibles consecuencias del ensayo clínico, de una manera comprensible al paciente. La información proporcionada por el médico deberá ser también registrada.

El sujeto del estudio otorgará su consentimiento, firmando el modelo correspondiente. El investigador recibirá un número adecuado de modelos de consentimiento informado a través del Promotor. A este fin cada modelo debe llevar la firma del investigador y del paciente.

El investigador no iniciará ninguna investigación correspondiente al ensayo hasta que haya obtenido el consentimiento del paciente.

El modelo de hoja de información al paciente y consentimiento informado se encuentra en anexo aparte (anexo 3).

4.3.8.3 **Confidencialidad**

Todos los datos de los pacientes se guardarán con estricta confidencialidad. Los datos de filiación de los pacientes no estarán vinculados con sus datos clínicos en ningún momento, salvo en caso de requerimiento por las autoridades competentes.

Únicamente el personal del equipo investigador y el monitor o persona designada por el promotor tendrá acceso directo al historial clínico del paciente. Salvo requerimiento del comité ético o las autoridades competentes, el acceso al historial será restringido a los actores enumerados anteriormente.

El paciente deberá firmar un Formulario de Confidencialidad donde da su consentimiento para el acceso a las entidades y/o personas arriba descritas.

4.3.9 Consideraciones Prácticas

4.3.9.1 Responsabilidades según las normas de buenas prácticas clínicas

Responsabilidades del Promotor

1. Establecer y mantener un sistema de garantías y control de calidad, con procedimientos normalizados de trabajo (PNT) escritos, de forma que los ensayos sean realizados y los datos generados, documentados y comunicados de acuerdo con el protocolo, las normas de buena práctica clínica y lo dispuesto en el Real Decreto RD 223/2004.
2. Firmar, junto con el investigador que corresponda, el protocolo y cualquiera de sus modificaciones.
3. Seleccionar al investigador más adecuado según su cualificación y medios disponibles, y asegurarse de que este llevara a cabo el estudio tal como está especificado en el protocolo.
4. Proporcionar la información básica y clínica disponible del producto en investigación y actualizarla a lo largo del ensayo.
5. Solicitar el dictamen del Comité Ético de Investigación Clínica y la autorización de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, así como suministrarles la información y recabar las autorizaciones que procedan, sin perjuicio de la comunicación a las comunidades autónomas, en caso de modificación o violación del protocolo o interrupción del ensayo, y las razones para ello.
6. Suministrar de forma gratuita los medicamentos en investigación, garantizar que se han cumplido las normas de correcta fabricación y que las muestras están adecuadamente envasadas y etiquetadas. También es responsable de la conservación de muestras y sus protocolos de fabricación y control, del registro de las muestras entregadas y de asegurarse que en el centro donde se realiza el ensayo existirá un procedimiento correcto de manejo,

4. RESULTADOS

conservación y uso de dichas muestras. Excepcionalmente, se podrán acordar con el centro otras vías de suministro.

7. Designar el monitor que vigilara la marcha del ensayo.

8. Comunicar a las autoridades sanitarias, a los investigadores y a los Comités Éticos de Investigación Clínica involucrados en el ensayo las sospechas de reacciones adversas graves e inesperadas de conformidad con lo establecido en los artículos 43 a 46. (R.D. 223/2004).

9. Proporcionar al investigador y al Comité Ético de Investigación Clínica, de forma inmediata, cualquier información de importancia a la que tenga acceso durante el ensayo.

10. Proporcionar compensación económica a los sujetos en caso de lesión o muerte relacionadas con el ensayo. Proporcionar al investigador cobertura legal y económica en estos casos excepto cuando la lesión sea consecuencia de negligencia o mala práctica del investigador.

11. Acordar con el investigador las obligaciones en cuanto al tratamiento de datos, elaboración de informes y publicación de resultados. En cualquier caso, el promotor es responsable de elaborar los informes finales o parciales del ensayo y comunicarlos a quien corresponda.

12. El promotor dispondrá de un punto de contacto, donde los sujetos del ensayo puedan obtener mayor información sobre este, que podrá delegar en el investigador.

4.3.9.2 Responsabilidades del Monitor

1. Trabajar de acuerdo con los procedimientos normalizados de trabajo del promotor, visitar al investigador antes, durante y después del ensayo para comprobar el cumplimiento del protocolo, garantizar que los datos son registrados de forma correcta y completa, así como asegurarse de que se ha obtenido el consentimiento informado de todos los sujetos antes de su inclusión en el ensayo.

2. Cerciorarse de que los investigadores y el centro donde se realizará la investigación son adecuados para este propósito durante el período de realización del ensayo.

3. Asegurarse de que tanto el investigador principal, como sus colaboradores, han sido informados adecuadamente y garantizar en todo momento una comunicación rápida entre investigador y promotor.
4. Verificar que el investigador cumple el protocolo y todas sus modificaciones aprobadas.
5. Comprobar que el almacenamiento, distribución, devolución y documentación de los medicamentos en investigación es seguro y adecuado.
6. Remitir al promotor informes de las visitas de monitorización y de todos los contactos relevantes con el investigador.

4.3.9.3 **Responsabilidades del Investigador**

1. Estar de acuerdo y firmar junto con el promotor el protocolo del ensayo.
2. Conocer a fondo las propiedades de los medicamentos en investigación.
3. Garantizar que el consentimiento informado se recoge de conformidad a lo establecido en el R.D. 223/2004.
4. Recoger, registrar y notificar los datos de forma correcta y garantizar su veracidad.
5. Notificar inmediatamente los acontecimientos adversos graves o inesperados al promotor.
6. Garantizar que todas las personas implicadas respetarán la confidencialidad de cualquier información acerca de los sujetos del ensayo, así como la protección de sus datos de carácter personal.
7. Informar regularmente al Comité Ético de Investigación Clínica de la marcha del ensayo.
8. Corresponsabilizarse con el promotor de la elaboración del informe final del ensayo, dando su acuerdo con su firma.

4.3.9.4 **Informe del estudio clínico / Publicación**

Estas se ajustarán a lo dispuesto en el Real Decreto 223/2004 de 6 de febrero, por el que se regula los Ensayos Clínicos con medicamentos, artículo 38, que recoge el siguiente texto:

4. RESULTADOS

1. El promotor está obligado a publicar los resultados, tanto positivos como negativos, de los ensayos clínicos autorizados en revistas científicas.
2. Se harán constar los fondos obtenidos por el autor por o para su realización y las fuentes de financiación.
3. Se mantendrá en todo momento el anonimato de los sujetos participantes en el ensayo.
4. Los resultados o conclusiones de los ensayos clínicos se comunicarán preferentemente en publicaciones científicas antes de ser divulgados al público no sanitario. No se darán a conocer de modo prematuro o sensacionalista procedimientos de eficacia todavía no determinada o exagerar ésta.
5. La publicidad de productos en fase de investigación clínica está absolutamente prohibida, tal como se recoge en la Ley 34/1998, de 11 de noviembre, General de Publicidad.

4.3.9.5 Monitorización y Auditoria

La monitorización incluye una explicación de los procedimientos y la logística del estudio, la entrega de la medicación de estudio, materiales y documentos, la recogida de los Cuadernos de Recogida de datos (CRD) y su comprobación de que estén completos y admisibles. También incluye la revisión, recuento y devolución de la medicación de estudio, materiales y documentos. Todos los procedimientos de monitorización serán documentados por escrito y la monitorización será llevada a cabo de acuerdo con los respectivos PNTs del Promotor.

Los monitores visitarán los centros cada mes, exceptuando circunstancias excepcionales como puedan ser las debidas a un número inesperado de acontecimientos adversos graves o reacciones adversas graves en un determinado centro.

El investigador está obligado a tener suficiente tiempo durante las visitas de monitorización. Todos los documentos del estudio, así como la documentación fuente deben estar disponibles y completos en el momento de las visitas de monitorización.

Toda la documentación del ensayo estará accesible a las auditorias de las autoridades sanitarias o vigilancia.

Todos los CRD, su cumplimentación y admisibilidad, deberán ser comprobados por los monitores o auditores, y cada cuaderno tendrá que incluir al menos los siguientes datos: edad e iniciales del paciente, número del paciente, enfermedad de estudio y enfermedades y terapias concomitantes, referencia a la participación del estudio (estudio y número de Aleatorización, tipo de fármaco), fecha de visitas al investigador, breve descripción de preocupaciones referentes a acontecimientos adversos.

Los documentos del estudio, por ejemplo, el archivo del investigador y los CRDs deberán ser almacenados en un lugar de acceso restringido y condiciones idóneas al menos durante 15 años.

4.3.9.6 Enmiendas al protocolo

Cualquier cambio del protocolo será documentado como enmienda y será aprobado por el comité ético de referencia. En caso de que estas enmiendas afectaran a la hoja de información al paciente y/o consentimiento informado, éstas tendrán que ser adaptadas, debiendo conservarse copia de las versiones antiguas de los documentos actualizados.

Las autoridades reguladoras y Comités Éticos tendrán que ser notificados de cualquier cambio relevante del protocolo.

4.3.10 Análisis estadístico y tratamiento de datos

4.3.10.1 Tamaño muestral

El número de pacientes a reclutar para este estudio será de 5, dicha cifra concuerda con los requisitos de un ensayo clínico de similares características y con la prevalencia de la enfermedad en la población que abarcan los centros médicos mencionados durante el periodo de duración del estudio.

4.3.10.2 Análisis estadístico

El análisis estadístico estará limitado al número de pacientes evaluados. Las variables cualitativas serán expresadas en porcentajes de frecuencia. Las variables cuantitativas serán evaluadas dependiendo de su distribución normal y en la homogeneidad de sus varianzas.

5. LIMITACIONES

5 LIMITACIONES

El presente trabajo tiene una serie de limitaciones que deben tenerse en cuenta previamente a la discusión de los resultados y a la hora de valorar las conclusiones obtenidas.

Con respecto al estudio *in vivo*, la no realización de pruebas de funcionalidad visual en los animales, como la electroretinografía, no permite conocer si las MSV producen algún tipo de deterioro de la función visual. Al tratarse de animales sanos, se desconoce si la presencia de procesos inflamatorios en el NO y/ o la retina pueden facilitar la migración de las MSV hacia capas internas retinianas o hacia otros tejidos oculares/extraoculares. Tampoco se ha estudiado “eficacia” sobre alguno de los modelos animales de NOIANA. La técnica FISH utilizada para determinar la localización de las MSV solamente permitió una valoración cualitativa (ausencia o presencia de las MSV en los tiempos evaluados), por lo tanto, se desconoce si la concentración celular administrada influye en la supervivencia del PEI a lo largo del tiempo. No se ha profundizado en la “migración” de las MSV hacia la cabeza del NO. Los tiempos evaluados se limitaron a dos y seis semanas, sería necesario evaluar un tiempo intermedio para confirmar si las MSV sobreviven al menos cuatro semanas tras la inyección.

Con respecto al estudio *in vitro*, el cultivo de MSV se aleja un poco de lo que ocurre tras una inyección intravítrea, porque las MSV cultivadas son confluentes y se adhieren a la superficie de los pocillos, mientras que, tras la inyección intravítrea, la mayor parte de las MSV se encuentran suspendidas en el vítreo, y se desconoce si estando en suspensión son capaces de secretar los factores neurotróficos evaluados. En relación con los factores secretados por las MSV, al evaluar solamente tres factores neurotróficos, se desconoce si las MSV son capaces de secretar otros factores que promuevan la supervivencia de las células retinianas en degeneración.

6. DISCUSIÓN

6 DISCUSIÓN

6.1 Estudio *in vivo*

En el presente trabajo se ha estudiado la biocompatibilidad de las células madre mesenquimales (MSV, PEI 15-007), administradas por vía intravítrea en conejos pigmentados inmunocompetentes, con la finalidad de demostrar la seguridad preclínica de estas células previamente a su uso en seres humanos, específicamente en un ensayo clínico fase II para el tratamiento de pacientes con NOIANA.

Se decidió utilizar conejos sin patología ocular ya que los objetivos de este trabajo se orientaron a demostrar la tolerancia de las MSV a nivel intraocular y a descartar la migración sistémica. No se desarrolló un modelo animal de NOIANA debido a que no se pretendió estudiar eficacia. Por otra parte, los conejos no fueron inmunosuprimidos a pesar de utilizar células humanas para demostrar el privilegio inmune del que gozan estas células (MSV, PEI 15-007).

En la literatura, existen diversos modelos animales de NOIA descritos en roedores y en primates no humanos. El primer modelo animal fue realizado en ratas en el año 2003,²⁶ dos años después se desarrolló el modelo de NOIA en ratón,²⁸ y en el año 2008 se desarrolló el mismo modelo en primates *Maccaca mullata* (rhesus monkey).⁹⁴ En estos modelos, se utiliza un colorante (rosa de bengala) por vía intravenosa que es activado mediante un láser de doble frecuencia – Yttrium Aluminum Garnet (Fd-Yag) que genera la trombosis capilar de la cabeza del NO.⁹⁵ Aunque son modelos útiles para la evaluación de los cambios electrofisiológicos e histológicos que ocurren tras la isquemia de la cabeza del nervio óptico,⁹⁵ tienen el inconveniente de no simular la verdadera patogenia de la NOIANA, que se debe a una hipoperfusión transitoria de la circulación de la cabeza del nervio óptico¹⁵ y no a una trombosis capilar de la cabeza del NO como ocurre verdaderamente en una NOIAA.¹⁷

A pesar de que la mayoría de los estudios de seguridad similares al presente trabajo utilizan roedores (ratones y ratas) como animales de experimentación,^{33,96} en este estudio se utilizaron conejos debido a que son animales que tienen mayores similitudes anatómicas, histológicas y

6. DISCUSIÓN

fisiológicas con el ojo humano en comparación con los modelos murinos.⁹⁷⁻⁹⁹ En este sentido, mientras que el volumen vítreo del ratón ($5 \mu\text{L}$)¹⁰⁰ representa tan solo un 0,1% del humano, el volumen vítreo del conejo (1,15ml) representa un tercio del volumen vítreo humano (4ml)¹⁰¹ lo que ha permitido administrar un mayor volumen y por lo tanto un mayor número de células en comparación con los estudios realizados en modelos murinos,^{60, 102} y lo que además permite extrapolar de forma más sencilla los resultados obtenidos para su utilización en humanos.

Las dosis celulares utilizadas en este estudio fueron calculadas en función de las concentraciones celulares utilizadas en estudios preclínicos similares,^{60, 102} así como también a partir de EECC con MSC que actualmente se encuentran en desarrollo (NCT01531348, NCT023330978). Sin embargo, el rango de dosis en estos estudios oscila notablemente (entre 1×10^6 y 4×10^8 cels/ml). La dosis “alta” utilizada en este trabajo también dependió del diámetro de las células ($7 - 20 \mu\text{m}$)¹⁰³ y del calibre de la aguja utilizada para la inyección intravítrea, de forma que se asegurara una viabilidad celular $\geq 90\%$ a su paso por la aguja. La dosis “baja” sirvió para establecer el comportamiento celular en función de la agregación celular, así como también para analizar los efectos clínicos observados en comparación con la dosis “alta” y para determinar la dosis “mejor tolerada” para su utilización en el ensayo clínico.

La razón de usar conejos machos en la segunda fase de este estudio, aparte de confirmar la tolerancia de la dosis celular escogida, residió en la evaluación de la posible migración de las MSV a las gónadas masculinas y así descartar la afectación a la descendencia (recomendación realizada por parte del comité preclínico de la AEMPS). En esta fase no se utilizó grupo control en base al principio de las “3 Rs” (Reemplazar, reducir y refinar),¹⁰⁴ por el cual se rige el uso de animales para investigación científica.

Por otra parte, se ha estudiado que el efecto terapéutico de las MSC está mediado principalmente por la secreción paracrina de citoquinas, factores neurotróficos e inmunomoduladores.⁵⁸ En este sentido, las MSC han sido utilizadas en diversos modelos murinos de patologías retinianas y del NO.^{96, 102, 105} En estos estudios se han administrado las MSC de tres maneras, la inyección intravenosa, el trasplante subretiniano y la inyección intravítrea.⁵¹ La administración sistémica (vía intravenosa), se basa en la capacidad de

migración o *homing* que tienen las MSC, es decir, una vez administradas por vía sistémica, las MSC son capaces de migrar hacia tejidos dañados para llevar a cabo sus acciones terapéuticas.⁵⁸ El trasplante subretiniano se basa en la propiedad de inmunoprivilegio que tienen las MSC y además es la forma en que las células se encuentran más cerca del tejido afectado, lo que facilita la migración, la integración y la diferenciación de las células trasplantadas. Por su parte, la vía intravítrea representa otra de las vías de administración local, es menos traumática para el globo ocular y permite administrar un mayor volumen celular con respecto al trasplante subretiniano, y según los estudios mencionados, se considera como la vía más adecuada para evaluar el efecto paracrino de los factores que secretan las MSC.⁵¹

Tomando en cuenta que la cavidad vítrea tiene fácil acceso y se considera un buen reservorio de fármacos para el tratamiento de enfermedades intraoculares,⁹³ se decidió administrar el PEI en estudio mediante inyección intravítrea. Esta vía de administración ha permitido generar el menor daño posible a los tejidos oculares, administrar un mayor número de células que las que se hubiesen podido administrar mediante trasplante subretiniano⁵¹ y además ha permitido evaluar el comportamiento migratorio de las células tras la inyección.

En relación a los resultados de la evaluación clínica en este estudio *in vivo*, tales como el incremento progresivo del peso y la ausencia de formación de tumores o enfermedades sistémicas en los conejos, se confirma la ausencia de efectos adversos relevantes por parte de las MSV en los animales utilizados y coincide con otros estudios preclínicos de seguridad similares desarrollados en modelos murinos, en los que no se observaron alteraciones en los diversos órganos examinados (corazón, pulmones, hígado, bazo, ojos, riñones e intestino).¹⁰⁶
¹⁰⁷ Los escasos hallazgos observados en la exploración del polo anterior, tales como la congestión conjuntival leve y la inflamación leve del iris en algunos de los conejos de los grupos experimentales, no se consideraron clínicamente relevantes ya que ambos fueron transitorios y remitieron espontáneamente. Por otra parte, la catarata desarrollada por uno de los conejos del grupo control es posible que se deba al procedimiento de la inyección intravítrea, ya que la catarata representa una de las principales complicaciones de la inyección intravítrea de fármacos,⁹³ y además, estos animales tienen un cristalino muy voluminoso que puede favorecer el roce de la aguja con la cápsula posterior del cristalino durante la inyección.

6. DISCUSIÓN

Las opacidades vítreas retrolentales y prepapilares presentes en algunos de los conejos de los grupos experimentales fueron más acentuadas en los conejos que recibieron la dosis alta, sin embargo, no estuvieron asociadas a la presencia de inflamación vítrea o de hemorragias retinianas, desprendimientos de retina o edema de la cabeza del nervio óptico en ningún caso. Estudios similares realizados en modelos murinos^{107, 108} muestran que las células inyectadas por vía intravítrea suelen formar cúmulos celulares en el vítreo, sin embargo, debido a que la cavidad vítrea de los ratones y ratas es muy pequeña, estos estudios no aportan información detallada acerca de la zona del vítreo donde se agrupan las células y pudieran no ser extrapolables al ser humano. En este sentido, los resultados del presente estudio muestran que las células tienden a migrar hacia el vítreo retrolental y hacia el vítreo prepapilar, mientras que otra parte de las células suelen quedarse en el vítreo adyacente a la zona de la inyección. La migración hacia el vítreo retrolental ha hecho tomar la decisión de añadir como parte de los criterios de inclusión en el protocolo de ensayo clínico a pacientes pseudofáquicos, con la finalidad de evitar que esta localización de las células inyectadas pudiera acarrear en los pacientes fáquicos la formación de una catarata, y por lo tanto, dificultar las exploraciones oftalmológicas a lo largo del seguimiento.

Parece un hallazgo interesante la migración observada hacia el vítreo prepapilar, ya que de cara a la patología de estudio y basados en el principio de *homing* de las MSC esta migración sería favorable ya que las células se situarían más cerca del tejido afectado para poder ejercer sus propiedades paracrina.⁵⁸ Estudios similares también han descrito que las MSC inyectadas en la cavidad vítrea adoptan cúmulos grandes de células que producen mejoras en la función retiniana mediante una acción paracrina transitoria en el tejido adyacente (evaluado mediante electroretinografía).¹⁰⁷ No obstante, el presente estudio preclínico no fue diseñado para evaluar eficacia y por ello no se realizaron pruebas de funcionalidad retiniana.

De forma similar a lo descrito en estudios relacionados con la inyección intravítrea de fármacos,^{93, 109} la PIO en todos los ojos tratados aumentó inmediatamente tras las inyecciones. Esto es debido al aumento de volumen que se genera y es un hallazgo habitual que ocurre tras la inyección de fármacos intravítreaos en humanos.¹⁰⁹ Además, los resultados de este estudio muestran que la PIO regresó a valores normales sin ningún tratamiento hipotensor 24 horas

después de la inyección, y las oscilaciones durante el período de seguimiento no fueron estadísticamente significativas en ninguno de los grupos experimentales con respecto al grupo control. Aunque no existen estudios similares que evalúen la evolución de la PIO tras la inyección intravítrea de MSC, estudios realizados en modelos murinos de glaucoma han descrito que las MSC inyectadas por vía intravítrea o intracamerular mejoran la PIO, lo que relacionan con una mayor supervivencia de las RGC a nivel histológico.^{105, 110}

En el presente estudio, los hallazgos histológicos observados en los tejidos oculares y sistémicos muestran que la inyección del PEI no afectó a la estructura de la córnea, del ángulo iridocorneal, de la retina ni del nervio óptico, así como tampoco se observaron alteraciones en el estudio del hígado, el bazo y las gónadas. Al realizar un análisis general de los hallazgos clínicos e histológicos, se pudo determinar que ambas dosis de MSV fueron bien toleradas por los conejos hembras, no obstante, los animales que recibieron la dosis “alta” mostraron más opacidades vítreas, probablemente debido a una mayor aglomeración de las células inyectadas. Por esta razón, se utilizó la dosis “baja” en los conejos machos como la dosis “mejor tolerada” del PEI. En este sentido, los hallazgos observados en los conejos machos fueron similares a los obtenidos en los conejos hembras, por lo que se ratificó nuevamente la tolerancia a nivel ocular y sistémico del PEI evaluado.

Ha de tenerse en cuenta que las células administradas por vía intravítrea en los conejos fueron de origen humano. Gracias a la baja inmunogenicidad que generan,⁵⁸ las MSV fueron bien toleradas sin necesidad de inmunosuprimir a los conejos, incluso aunque se trató de un trasplante xenogénico, es decir entre especies diferentes. Se realizó este tipo de trasplante ya que, con vistas a la traslación clínica, es necesario realizar los ensayos preclínicos en animales con las mismas células que se van a emplear en el EECC en humanos. De esta manera se posibilita que los efectos demostrados en las fases preclínicas puedan verse reflejados en las posteriores fases clínicas. En diversos trabajos también se ha descrito que las MSC humanas no producen reacción de rechazo inmune cuando son trasplantadas en la superficie ocular de ratones, ratas y conejos sin inmunosuprimir.¹¹¹⁻¹¹³ Sin embargo, solo existen dos trabajos publicados en los que se administraron MSC humanas por vía intravítrea en animales, un modelo murino de diabetes y otro de degeneración retiniana, ambos sin inmunosuprimir, en

6. DISCUSIÓN

los cuales no se observó reacción de rechazo.¹⁰⁶ De esta manera, el presente estudio *in vivo* es el único realizado en conejos y el tercero realizado en animales inmunocompetentes.

En relación a la localización, supervivencia y posible migración de las MSV, en el presente proyecto se decidió utilizar la técnica FISH con sondas específicas para cromosomas humanos para identificar a las MSV, de forma similar a otros estudios preclínicos en modelos murinos en los que se utilizó esta técnica para identificar MSC humanas.^{114, 115} No obstante, la mayoría de los estudios preclínicos evalúan la migración celular mediante el marcaje de las células antes de su inyección con diversos colorantes como la 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU), colorantes fluorescentes de membrana (PKH26, CM-Dil),^{60, 102} o incluso con nanopartículas de oro.¹¹⁶ Estas opciones podrían ser más rápidas y sencillas, sin embargo, el comité preclínico de la AEMPS recomienda estudiar las células sin generar modificaciones en el PEI, con la intención de mantener las mismas condiciones en el EECC, por ello, en el presente estudio se optó por no premarcar las células previamente a su inyección.

Se decidió evaluar la presencia de las MSV a las 2 y a las 6 semanas tras la inyección, con la finalidad de determinar si las células sobrevivían más allá de 5 semanas, que es lo que han determinado diversos estudios realizados en modelos murinos de patologías retinianas, en los que se ha visto que las MSC inyectadas en la cavidad vítrea sobreviven al menos de 4 a 5 semanas y durante este tiempo son capaces de producir factores como el BDNF, el CNTF y el bFGF que promueven la supervivencia de las RGC.^{60, 102} En este sentido, las células fueron identificadas en la cavidad vítrea de las muestras analizadas a las 2 semanas, específicamente en zonas adyacentes a la retina y a la cabeza del nervio óptico, mientras que no fueron identificadas en el interior de las capas retinianas o en otros tejidos oculares. Es posible que esto sea debido a la barrera que ejerce la membrana limitante interna de la retina, que a pesar de tener poros, estos son muy pequeños (media de diámetro de 13,5 nm)¹¹⁷ y no permiten el paso de las MSC ya que estas células son grandes con una media de diámetro de 17,9 μm ¹¹⁸ y por otra parte, la barrera hematorretiniana no permite que partículas extrañas entren o salgan del ojo.¹¹⁹ No obstante, los factores neurotróficos producidos por las MSC al ser moléculas muy pequeñas (13 a 23kDa),^{120, 121} sí podrían atravesar estas barreras y ejercer su efecto paracrino sobre la retina y el NO.^{60, 102}

Por otra parte, la no identificación de las MSV (PEI 15-007) en las muestras evaluadas a las 6 semanas no permite confirmar que las células sobrevivan hasta este momento. Es posible que no hayan sido identificadas porque las células degeneren y por lo tanto, no hayan podido ser detectadas mediante la técnica FISH. No obstante, la ventana terapéutica en la patología de estudio, descrita en modelos murinos, se limita a las dos primeras semanas tras el evento isquémico,³³ esto hace que la supervivencia de las MSV (PEI 15-007) de al menos 2 semanas tras la inyección, con la correspondiente acción paracrina de los factores neurotróficos, se considere suficiente para que el PEI en estudio, administrado de forma precoz, pueda mitigar la degeneración de las RGC y de sus axones, durante la fase aguda de la NOIANA.

El hígado y el bazo fueron evaluados para determinar la migración sistémica de las MSV, por recomendación de la UPC del IBGM por tratarse de los órganos relacionados con el filtrado y la depuración de las células sanguíneas.^{122, 123} No se identificaron las MSV en estos órganos, de manera que se puede descartar la migración sistémica hacia estos tejidos hematopoyéticos al menos en estos animales de experimentación. También es importante resaltar que no se han identificado las MSV en los tejidos gonadales (ovario y testículo), lo cual ha permitido descartar la migración de estas células hacia dichos órganos y, por lo tanto, descartar una posible influencia de las MSV sobre las células germinales y la descendencia. Con respecto a otros estudios similares descritos en la literatura, la localización de las MSC se limitó a los tejidos oculares,^{60, 102, 107} por lo tanto, no se han encontrado estudios publicados relacionados con la migración sistémica de MSC tras inyección intravítrea.

Con los resultados clínicos, histológicos e inmunohistoquímicos obtenidos *in vivo*, se ha demostrado de forma preclínica la biocompatibilidad de la inyección intravítrea de las MSV (PEI15-007) en conejos pigmentados e inmunocompetentes. Estos resultados han sido necesarios para la aprobación del ensayo clínico planteado para el tratamiento de pacientes con NOIANA.

6. DISCUSIÓN

6.2 Estudio *in vitro*

Se ha estudiado la secreción *in vitro* de factores neurotróficos por parte de las células madre mesenquimales (MSV, PEI 15-007) en cocultivo con neuroretinas porcinas, así como su potencial efecto neuroprotector hacia las RGC, con la finalidad de demostrar la eficacia preclínica de estas células previamente a su utilización en humanos, específicamente en el ensayo clínico fase II diseñado para pacientes con NOIANA.

Los cultivos organotípicos de retina representan una herramienta útil para el estudio de la fisiopatología de los procesos de degeneración retiniana.^{124, 125} Estos cultivos, tienen la peculiaridad de reproducir las dinámicas funcionales neuroretinianas, basadas en la interacción entre las diferentes células que constituyen este tejido complejo. Por esta razón, el cultivo organotípico de retina neural resulta ser superior a los cultivos de células disociadas, en los cuales tales dinámicas están ausentes.¹²⁶ De esta manera, los modelos de cultivo organotípico de retina permiten el ensayo de medicamentos y la evaluación de la toxicidad farmacológica,^{127,128} el estudio de los efectos de moléculas como los factores de crecimiento,¹²⁹ y del cocultivo con células madre,¹³⁰ de una forma más cercana a los procesos *in vivo*.

En la actualidad, los cultivos organotípicos de retina se utilizan de forma activa y eficaz para ampliar los conocimientos acerca de las patologías retinianas. En este sentido, el Grupo de Retina del IOBA ha empleado este modelo *in vitro* para estudiar los procesos de inflamación y cicatrización retiniana, así como diferentes estrategias de neuroprotección y más recientemente para estudiar la toxicidad del perfluoro-octano (*in press*) en un modelo organotípico de NR porcina.^{81, 82, 131} Otros grupos internacionales también han publicado notables trabajos, donde destacan el uso de estos modelos organotípicos para evaluar la degeneración de las RGC,¹³² el estudio de la toxicidad de medicamentos así como sus efectos sobre la supervivencia celular.¹³³ Una de las razones por las cuales se usa como modelo de degeneración de las RGC se basa en que los explantes de retina requieren de una axotomía completa de las RGC, proceso que conduce a la muerte de estas células por degeneración retrógrada en modelos *in vivo*.⁶⁰ De esta manera, la pérdida progresiva de RGC que ocurre en los explantes de retina permite utilizarlos como modelos *in vitro* para evaluar los cambios que

ocurren en las enfermedades degenerativas del NO asociadas a isquemia (NOIANA), traumatismos o glaucoma.¹³²

Por todo ello, se decidió utilizar un cultivo organotípico de NR como modelo experimental *in vitro* para el desarrollo de este trabajo. Como origen animal para este modelo se eligió el cerdo debido a que el ojo porcino es muy similar al humano, no solo en cuanto a tamaño del globo ocular, sino también a la estructura de la retina.⁸³ Pese a las similitudes con la retina humana, en la retina de cerdo, al igual que en las retinas de los demás mamíferos no primates, no hay una verdadera mácula, aunque sí existe una banda central y horizontal (*area centralis*) que atraviesa la retina, por encima del nervio óptico, donde se ha descrito la presencia de una elevada densidad de fotorreceptores y de RGC, similar a la mácula humana.^{83, 134} Por esta razón, al obtener los explantes de neuroretina utilizados durante este estudio, se tomaron del *area centralis* y solo se aislaron 3 explantes por retina de 5 x 5 mm cada uno aproximadamente, como previamente ha sido descrito por el grupo de Retina del IOBA.^{81, 131}

Con el objetivo de dotar a este modelo experimental de una mayor similitud con las condiciones que se producirían *in vivo* tras la inyección intravítrea del PEI se decidió colocar los explantes de NR con la ILM dispuesta hacia la membrana y cultivar las MSV en el fondo de los pocillos, de modo que los factores secretados actuaran directamente sobre la GCL al contrario de los desarrollados hasta el momento por el grupo de Retina del IOBA y de otros estudios sobre RGC en cultivos organotípicos.^{132, 133} El número de células sembradas por pocillo (30.000/pocillo o 3.125 células/cm²), fue suficiente para que las MSV alcanzaran la confluencia celular en los pocillos al inicio del cocultivo, y corresponde con la concentración utilizada en estudios previos.¹³⁵ Como medio de cultivo para este estudio, se ha utilizado una dilución 1:1 de medio DMEM/HAM F12 suplementado con un 10% de suero fetal bovino con un 1% de L-glutamina, y un 1% de antibiótico. Esta elección ha venido marcada por la experiencia obtenida en un estudio similar en el que observaron que la apoptosis de las RGC ocurría más rápidamente utilizando los medios convencionales (DMEM suplementado con Neurobasal A) en comparación con el DMEM/HAM F12.¹³² Por ello, a pesar de que el grupo del IOBA mayoritariamente ha utilizado una combinación de Neurobasal A con B-27 y SFB, que preserva mejor a los fotorreceptores, y Neurobasal A/DMEM para cocultivos de NR y EPR/MSV,¹³⁶ en el

6. DISCUSIÓN

presente estudio se optó por utilizar el medio DMEM/HAM F12 por estar orientado al estudio de las CGR.

Los tiempos de estudio utilizados en el presente trabajo han sido escogidos tomando en cuenta la experiencia obtenida en estudios similares realizados por nuestro grupo,^{81, 131, 136} descartándose tiempos mayores para evitar que hubiese una excesiva desestructuración de la retina, y específicamente una excesiva degeneración de las RGC, que impidiese valorar adecuadamente la existencia de diferencias entre las NR cocultivadas con MSV y las NR cultivadas sin MSV. Por otra parte, la caracterización de las MSV realizada tras la finalización del experimento permitió confirmar que estas células mantienen su inmunofenotipo de MSC a pesar de estar en cocultivo con NR porcinas.

Teniendo en cuenta que el daño isquémico causado por un episodio de NOIANA genera la apoptosis de las RGC por degeneración retrógrada,³⁰ pareció adecuado la búsqueda de factores que influyeran en la supervivencia de las RGC y en la regeneración neuronal. En este sentido, se han relacionado diversos factores neurotróficos secretados por las MSC con los procesos de supervivencia, diferenciación y migración neuronal, así como con el crecimiento de las fibras nerviosas.^{62, 63} De este modo, se conoce que el BDNF es una proteína que actúa como factor de crecimiento codificada por el gen BDNF. Además, es uno de los factores neurotróficos más estudiados, tanto *in vivo*¹³⁷ como *in vitro*, que ha demostrado un aumento en la supervivencia de las RGC.¹³⁸ Es expresado por las RGC, las neuronas de interconexión,¹³⁹⁻¹⁴¹ las células gliales^{142, 143} y otras células nerviosas.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ Entre sus funciones se incluyen mantener la supervivencia, la diferenciación, el crecimiento de las fibras nerviosas y la plasticidad celular. Su mecanismo de acción se produce por medio de la unión a su receptor (TrkB), lo que desencadena la activación de la proteína c-jun y la supresión de la caspasa-2.⁶⁵

El GDNF pertenece a la familia de ligandos del GDNF y también juega un papel muy importante en los procesos de supervivencia, diferenciación y migración neuronal, así como en el crecimiento de las fibras nerviosas. En modelos murinos de glaucoma ha demostrado mejorar la supervivencia de las RGC, disminuir la activación del tejido glial y reducir la pérdida del grosor de la capa plexiforme interna de la retina.^{68, 69}

Por su parte, el CNTF pertenece a la familia de las citoquinas neuropoyéticas y es expresado principalmente por los astrocitos. En modelos murinos de degeneración retiniana, ha demostrado el aumento de la supervivencia de las RGC mediante la transducción y la activación de la vía de la transcriptasa 3 (STAT3), así como también ha promovido la regeneración de los segmentos externos de los conos.^{66, 67}

Los resultados del presente estudio muestran que las MSV son capaces de producir *in vitro* dos de estos factores, el BDNF y el CNTF, no solamente cuando se cocultivan con NR sino también cuando son cultivadas de forma aislada. No obstante, la secreción de BDNF por parte de las MSV cultivadas sin NR decrece significativamente a lo largo del tiempo, mientras que la secreción de este factor por parte de las MSV cocultivadas con NR mantiene unos niveles de secreción similares a lo largo del tiempo, esta secreción es significativamente mayor en comparación con la producida por las MSV cultivadas sin NR en los tres tiempos de estudio evaluados (24, 48 y 72 horas). En relación a la producción de CNTF, los resultados de este estudio muestran que las MSV cocultivadas con NR aumentan de forma progresiva la secreción diaria de este factor siendo estadísticamente significativa a las 72 horas. A diferencia de lo que ocurre con el BDNF, la cantidad de CNTF producido por las MSV cultivadas de forma aislada fue similar a la cantidad producida por las MSV cocultivadas con NR, excepto a las 72 horas, donde la producción fue significativamente mayor en esta última condición. Además, con el presente estudio se puede confirmar que también las NR por si mismas producen estos factores (BDNF y CNTF), no obstante, en una menor cantidad y a medida que avanza la degeneración del tejido retiniano esta producción decrece significativamente.

La no detección de GDNF en las condiciones experimentales evaluadas puede ser debido a que su secreción sea muy baja y por lo tanto, no ha podido ser detectado mediante el kit de ELISA utilizado (rango 2,74 a 2000pg/ml). En este sentido, un estudio similar determinó la secreción de GDNF por las MSC en cultivo, previamente a la administración intravítrea en un modelo *in vivo* de neuropatía óptica traumática.⁶⁰ En este estudio se observó que las MSC en cultivo producen GDNF en poca cantidad (40.92 ± 40.92 pg/ 10^6 cels), pero cuando estas células son estimuladas mediante la adición de otros factores como el *Epidermal Growth Factor* (hEGF), el bFGF, el *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), y la *Neuregulin 1* durante tres días de cultivo,

6. DISCUSIÓN

la cantidad de GDNF secretado se incrementaba significativamente (348.61 ± 46.04 pg/ 10^6 cels). No obstante, independientemente de la concentración de factores, la administración intravítrea de las MSC (estimuladas o no previamente) demostraba mejorar la supervivencia de las RGC.⁶⁰

En relación con los resultados del estudio histológico de las NR porcinas tras tres días de cultivo, se pudo observar que los hallazgos más notables fueron la pérdida de la mayor parte de los IS y OS de los fotorreceptores, y la disminución del grosor de las capas nucleares (ONL e INL), de forma más marcada en los explantes cultivados sin MSV en comparación con los explantes cocultivados con MSV. Es posible que la marcada degeneración precoz de los IS y OS en comparación con otros estudios del grupo de retina del IOBA⁸¹ sea debida a la orientación en que fueron dispuestos los explantes sobre la membrana transwell® (con los fotorreceptores hacia arriba) así como al medio utilizado en el cultivo sin Neurobasal A y B-27, ideales para el cultivo de estas células,¹³⁶ y al propio proceso degenerativo de la retina como ha sido descrito en estudios similares.^{81, 131} Por otra parte, aunque el grosor retiniano total de los explantes cocultivados con MSV disminuyó significativamente con respecto a las NR frescas, esta disminución fue significativamente menor a la observada en los explantes de NR cultivados solos.

La reacción glial es otro de los puntos de interés relacionado con el proceso de degeneración retiniana. En este sentido, se conoce que las células de Müller representan aproximadamente el 90% de las células gliales en la retina de los vertebrados (los astrocitos representan solo el 10%)¹⁴⁷ y tienen un importante conjunto de funciones para el mantenimiento de la fisiología retiniana¹⁴⁸ y para la protección contra el estrés oxidativo.¹⁴⁹ Las células de Müller son las células más reactivas de la retina que tras procesos traumáticos, inflamatorios o patológicos, suelen proliferar e hipertrofiarse, dando lugar a la formación de membranas epi-, intra- y sub-retinianas.^{150, 151} En este sentido, se llevó a cabo la evaluación inmunocitoquímica de las células gliales, mediante la expresión de GFAP, presente en los filamentos intermedios de las células gliales retinianas (astrocitos y células de Müller) con la finalidad de estudiar la gliosis retiniana ante la acción paracrina de las MSV. Los resultados muestran que, tras tres días de cultivo, las NR que presentaron una mayor expresión de GFAP fueron aquellas que se cultivaron sin MSV

en comparación con las NR cocultivadas con MSV, diferencias que fueron estadísticamente significativas. Por lo tanto, de estos resultados se puede asumir que la presencia de MSV y la acción paracrina de sus factores, enlenteció la degeneración retiniana ya que los cambios histológicos e inmunohistoquímicos presentes en las NR cocultivadas con MSV fueron menos marcados que en las NR cultivadas sin MSV, así como el grosor retiniano total de los explantes cocultivados con MSV fue estadísticamente mayor al de los explantes cultivados sin MSV.

En relación con la evaluación de las RGC, en el presente estudio se utilizaron dos marcadores específicos, la Tubulina beta III y el NeuN. La Tubulina beta III es una proteína específica de neuronas que pertenece a una familia de proteínas que forman los microtúbulos en el citoesqueleto celular.¹⁵² Esta proteína se ha utilizado para identificar y diferenciar neuronas en el tejido cerebral de células gliales que no expresan la Tubulina beta III.¹⁵³ Debido a la elevada expresión de esta proteína en las RGC,⁸⁷ la Tubulina beta III también se ha utilizado para identificar y cuantificar el número de RGC en diversos modelos murinos de patologías del NO.¹⁵⁴⁻¹⁵⁷ Los resultados del presente estudio muestran que la Tubulina beta III marca principalmente el soma y las prolongaciones de las RGC, como se ha descrito en estudios previos,^{130, 132} lo que permitió comparar las fibras nerviosas procedentes de las RGC en las muestras evaluadas. En este sentido, se observó que las NR frescas presentaron un marcaje homogéneo y localizado a nivel de la capa de fibras nerviosas, mientras que las NR cultivadas sin MSV mostraron un aumento estadísticamente significativo del marcaje de fibras nerviosas hacia la IPL y, en algunos casos llegaba a la INL, con respecto a las NR frescas. Mientras que este marcaje en las NR cocultivadas con MSV no mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto a las NR frescas. Es posible que las prolongaciones observadas en la IPL de las NR cultivadas sin MSV correspondan no solamente a dendritas de las GCR sino también a prolongaciones de las células amacrinas y de interconexión localizadas en esta capa, ya que en estudios similares realizados en retinas murinas se observó que la tubulina beta III marcaba débilmente estas neuronas retinianas.⁸⁷

Por su parte, NeuN es una fosfoproteína de unión al ADN presente en el núcleo y en el citoplasma de las neuronas que se utiliza para identificar poblaciones neuronales¹⁵⁸ y además, tras descubrirse que las RGC la expresan en altas cantidades, diversos estudios han utilizado el

6. DISCUSIÓN

NeuN como un marcador para la identificación de las RGC.^{88, 159} En este estudio, la inmunoexpresión del anticuerpo NeuN fue principalmente nuclear con el que se pudo identificar la presencia de los núcleos correspondientes a las RGC. Los resultados muestran un mayor número de RGC estadísticamente significativo en las NR cocultivadas con MSV (60,78%) en comparación con las NR cultivadas sin MSV (38%). Estos resultados están en consonancia con los obtenidos en un estudio *in vivo* donde se demostró que hasta un 50% de RGC pueden ser rescatadas 3 días después de una axotomía a través de la acción de factores neurotróficos.¹⁶⁰

En relación con la apoptosis de las RGC, los resultados de este estudio muestran que las NR cocultivadas con MSV mostraron un menor marcaje TUNEL positivo a nivel de la GCL (13,57%) con respecto a las NR cultivadas sin MSV (37%). Teniendo en cuenta la mayor presencia de núcleos NeuN positivos y el menor porcentaje de núcleos apoptóticos presentes en las NR cocultivadas con MSV en comparación con las NR cultivadas sin MSV, se puede afirmar que la presencia de MSV y la acción paracrina de sus factores favorece la supervivencia de las RGC *in vitro*.

Por lo tanto, los resultados de este estudio *in vitro* apoyan la hipótesis general del presente estudio, es decir, que la acción paracrina de los factores neurotróficos secretados por las MSV (PEI15-007) pudiera enlentecer o detener la degeneración axonal causada por un episodio de NOIANA en su fase aguda.

6.3 Protocolo de ensayo clínico

Para el diseño del presente protocolo se realizó una revisión bibliográfica de todos los EECC relacionados con terapia celular para el tratamiento de patologías de la retina y del NO. La información recopilada ha sido publicada como un artículo de revisión (anexo 4): **Labrador-Velandia S**, Alonso-Alonso ML, Alvarez-Sanchez S, González-Zamora J, Carretero-Barrio I, Pastor JC, Fernandez-Bueno I, Srivastava GK. *“Mesenchymal stem cell therapy in retinal and optic nerve diseases: An update of clinical trials”* en la revista *World Journal Stem Cells*.¹⁶¹

Los estudios relacionados con la administración intravítrea de MSC para el tratamiento de patologías retinianas y del NO han ido evolucionando desde la publicación de series de casos, resultados preliminares de EECC fase I y la aparición de nuevos estudios en las bases de datos de EECC (ClinicalTrials.gov e International Clinical Trials Registry Platform).

En relación a las series de casos, Jonas y cols. (2008, 2010)^{162, 163} evaluaron la viabilidad de una inyección intravítrea de células mononucleares autólogas procedentes de un aspirado de médula ósea (MO) en un paciente con patologías del NO (neuropatía óptica glaucomatosa avanzada) y en otros 2 con retinopatías degenerativas avanzadas (atrofia retiniana por retinopatía diabética y atrofia retiniana por degeneración macular asociada a la edad). Un año más tarde, Siqueira y cols. (2011)⁵⁹ llevaron a cabo un ensayo clínico fase I para evaluar la seguridad de una inyección intravítrea de células mononucleares autólogas procedentes de médula ósea, en cinco pacientes con distrofias retinianas avanzadas. En estos estudios, la exploración oftalmológica incluyó la evaluación de la agudeza visual, pruebas de electroretinografía, campo visual, angiografías y tomografía de coherencia óptica.⁵⁹ Estos estudios iniciales demostraron la factibilidad y la seguridad de la inyección intravítrea de un aspirado de células de MO autólogas en ojos humanos.^{59, 162, 163}

A diferencia de estos estudios en los que se utilizó un aspirado de células mononucleares de MO, el PEI estudiado en el presente trabajo es un concentrado específico de MSC sin otro tipo celular añadido. Una de las ventajas de usar MSC como terapia celular deriva de su privilegio inmune, ya que son células que no tienen en su superficie moléculas del CMH clase II, responsables del rechazo de los trasplantes.^{14, 58} Por esta razón, el PEI de estudio ha sido

6. DISCUSIÓN

utilizado previamente en EECC para el tratamiento de otras patologías, tanto de forma autóloga como de forma alogénica sin necesidad de inmunosuprimir a los individuos receptores.¹⁶⁴⁻¹⁶⁷ Por otra parte, las MSV (PEI 15-007) son células que pueden ser criopreservadas y utilizadas a posteriori tras ser reexpandidas *ex vivo* (EudraCT: 2012-004441-32). La criopreservación es un proceso que consiste en la interrupción del metabolismo celular mediante procesos de congelación a muy bajas temperaturas (-196°C) sin que las células pierdan su viabilidad.¹⁶⁸ Este proceso permite que las células madre estén disponibles en cualquier momento y puedan ser descongeladas fácilmente para su uso en caso de necesidad en el tratamiento de diversas enfermedades. De esta manera, la criopreservación y la expansión *ex vivo* de las MSC (MSV, PEI 15-007) derivadas de donantes sanos permite darle una mayor rentabilidad a este tipo de terapia celular mediante el trasplante alogénico a varios pacientes receptores, evitando en estos casos todo el proceso correspondiente a la extracción celular en los pacientes afectados. Además, permite la creación de bancos celulares, facilita el transporte de los productos celulares hacia los centros de trasplante optimizando el tiempo desde que se recluta un paciente benefactor hasta la aplicación del tratamiento.¹⁶⁹

Actualmente, se encuentran inscritos en el sistema de *ClinicalTrials.gov* y en la *International Clinical Trials Registry Platform* (última revisión marzo 2017) 28 ensayos clínicos relacionados con el uso de células madre en patologías de la retina y del NO, de los cuales destacan 8 por emplear específicamente células madre mesenquimales como terapia celular (Tabla 9). Estos ensayos clínicos se encuentran en fase I/II y en proceso de reclutamiento. Por el momento, no existen resultados preliminares publicados, debido al poco tiempo que llevan de desarrollo y ninguno de ellos está orientado al tratamiento de la NOIANA a excepción del presente EECC (EUCTR2016-003039-40-ES, tabla 9), lo cual deja una puerta abierta para investigar el posible uso de las MSC y sus propiedades paracrinas en pacientes afectados de NOIANA.

Tabla 9. Ensayos clínicos relacionados con el uso de células madre mesenquimales en patologías retinianas y del nervio óptico.

Ensayo clínico	Patología	Células	Vía de administración	Dosis	Nº de pacientes	Estado del reclutamiento	Fase de estudio	País	Año inicio
NCT01531348	Retinosis pigmentaria	ABMMS C	Intravítrea	1x10 ⁶ ce ls/0.1 ml	10	Reclutando	I	Tailandia	2012
IRCT201111291414N29	Retinopatía diabética	ABMMS C	Intravenosa	2x10 ⁶ cels/Kg	20	En curso	I/II	Irán	2011
NCT01364246	Neuromielitis óptica	UC-MS C	Intravenosa	-	20	Desconocido	I/II	China	2010
NCT02249676	Neuromielitis óptica	ABMMS C	Intravenosa	2x10 ⁶ c els/kg.	15	Reclutando	II	China	2014
ChiCTR-TRC-14005093	Neuropatía óptica traumática	UC-MS C	Endonasal	-	70	Reclutando	I/II	China	2014
NCT02330978	Glaucoma	ABMMS C	Intravítrea	1x10 ⁶ ce ls/0,1 ml	10	Reclutando	I	Brasil	2014
ChiCTR-TRC-16008839	Retinosis pigmentaria	UC-MS C	Intravenosa	-	40	Reclutando	Observacional	China	2016
EUCTR2016-003039-40-ES	NOIANA	AlloBM MSC	Intravítrea	1,5x10 ⁶ cels/ml	5	Reclutando	II	España	2017

ABMMS C: Células madre mesenquimales derivadas de médula ósea; UC-MS C: Células madre mesenquimales derivadas de cordón umbilical. (Clinicaltrials.gov and the International Clinical Trials Registry Platform, acceso 27 de marzo 2017).

En este sentido, el protocolo de EECC diseñado en el presente trabajo se basó en protocolos de EECC similares realizados para NOIANA,^{45, 46, 170} pero con modificaciones correspondientes al uso de terapia celular y siguiendo las directrices del CEIC correspondiente (área este de Valladolid) y la AEMPS (REAL DECRETO 1090/2015, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos, los Comités de Ética de la Investigación con medicamentos y el Registro Español de Estudios Clínicos, BOE 307, de 24 de diciembre; ORDEN SCO/256/2007, de 5 de febrero, por la que se establecen los principios y las directrices detalladas de buena práctica clínica y los requisitos para autorizar la fabricación o importación de medicamentos en investigación de uso humano, BOE 38, de 13 de febrero). Una de las consideraciones requeridas por la AEMPS para la aprobación de este protocolo consistía en la determinación de la seguridad preclínica del PEI a estudio (MSV, 15-007) bajo inyección intravítrea, evaluación que fue llevada a cabo en estudios *in vivo* e *in vitro* con resultados favorables que permitieron la aprobación del protocolo de ensayo clínico desde el 15 de febrero de 2017.

6. DISCUSIÓN

Inicialmente, el EECC diseñado se catalogó como un ensayo clínico fase I ya que las variables se orientaron hacia la evaluación de la seguridad del PEI inyectado por vía intravítrea, no obstante, el CEIC recomendó catalogarlo como un ensayo fase II, debido a que su realización está indicada en pacientes con la patología y no en pacientes sanos. Por otra parte, no es un objetivo de este EECC la determinación de la eficacia del PEI, pero la realización de exploraciones oftalmológicas básicas como la AV y la campimetría pueden orientar los resultados de eficacia en la patología de estudio que servirán para dar continuidad a futuros EECC.

En relación con el cálculo del tamaño muestral, se decidió el reclutamiento de 5 pacientes por tratarse de un ensayo piloto de seguridad y, por otra parte, se basó en la incidencia de la patología de estudio en la población objetivo, que en este caso es la población mayor de 50 años de la comunidad autónoma de Castilla y León, específicamente de Valladolid y de Palencia donde sería esperable que hubiera entre 5 y 28 casos nuevos por año. Dado que no existen estudios epidemiológicos publicados en España relacionados con la incidencia de la NOIANA, la estimación se basó en los tres únicos artículos publicados relacionados con la incidencia de la patología, dos de ellos realizados en EE.UU (2,3 a 10 individuos por cada 100.000 habitantes/año)^{4,5} y otro realizado en Croacia (2,5 a 3,8 individuos por cada 100.000 habitantes /año).⁶

En cuanto a los criterios de inclusión, se decidió incluir como criterio el reclutamiento de pacientes durante la fase aguda de la patología, específicamente entre las dos primeras semanas tras el inicio de los síntomas, que como se ha comentado anteriormente, es la fase en la que podrían funcionar las terapias encaminadas a detener el deterioro de las fibras nerviosas y a mejorar la supervivencia de las CGR tras el daño isquémico.³³ De esta manera, cuanto antes se aplique el tratamiento más posibilidades habrá de lograr un beneficio. No obstante, también hay que reconocer que podría ser difícil captar pacientes en esta fase debido a que en muchas ocasiones sobre todo en pacientes muy mayores, no son conscientes del inicio de los síntomas hasta que de forma fortuita (por ejemplo, al guiñar un ojo) perciben una pérdida de AV y por tanto, acuden al oftalmólogo en fases avanzadas de la patología (observación de atrofia del NO mediante exploración oftalmológica). En relación con la AV, se decidió que los pacientes tuvieran una AV $\leq 0,1$ (escala decimal) en el ojo afectado, por tratarse de un estudio piloto de

seguridad. La razón de reclutar pacientes pseudofáquicos se basó en los resultados obtenidos del estudio preclínico *in vivo*, donde se observó que las MSV tienden a aglomerarse en el vítreo retrolental, lo que podría generar la formación de una catarata, y limitaría la exploración del polo posterior.

Con respecto a los criterios de exclusión, se decidió descartar todas aquellas patologías que clínicamente pueden presentar síntomas similares a la NOIANA, en especial la NOIAA, mediante la detección de reactantes de fase aguda, tales como la velocidad de sedimentación globular (VSG) y la proteína C reactiva (PCR). De igual manera, se decidió incluir como criterio el descarte de cualquier patología ocular o sistémica de base inflamatoria o inmune (uveítis, vasculitis ocular o sistémica) que pudieran generar episodios de inflamación no relacionados con el PEI a lo largo del seguimiento de los pacientes tratados. También se decidió no incluir pacientes con antecedentes de glaucoma o PIO ≥ 24 mmHg, para evitar sesgos de confusión relacionados con el PEI a estudio. En relación con los pacientes con opacidades de medios, tampoco se consideraron aptos, debido a que no se podrían evaluar bien las estructuras oculares a estudio.

En cuanto a las variables de seguridad escogidas, se orientaron hacia la búsqueda de signos inflamatorios tanto en la cámara anterior como en la cavidad vítrea que pudieran indicar una posible reacción de rechazo al PEI de estudio. Por esta razón, en todas las visitas de estudio se consideró necesaria la exploración con lámpara de hendidura del polo anterior y la fundoscopia realizada mediante oftalmoscopia indirecta y lentes de no contacto. No obstante, es importante resaltar que, tras la administración del PEI es esperable observar acúmulos u opacidades vítreas (como se observó en el estudio *in vivo*) que no serán consideradas como reacción inflamatoria a menos que estén asociadas a otros hallazgos, tales como edema macular, hemorragias vítreas o retinianas, celularidad vítrea y desprendimientos de retina, entre otros.

Para el seguimiento de las variables de seguridad, así como también la notificación de posibles hallazgos adversos a los organismos correspondientes, se ha contratado a Leon Research, S.L. Se trata de una *Contract Research Organisation* (CRO), que se encargará de monitorizar las visitas para la evaluación del cumplimiento del protocolo de EECC.

6. DISCUSIÓN

Este proyecto de tesis incluyó la realización del protocolo del presente EECC pero no la consecución del mismo. Actualmente el estado del presente EECC está abierto y en fase de reclutamiento y se tiene estipulado su finalización en el plazo de dos años.

8. CONCLUSIONES

7 CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados en este trabajo y como consecuencia de los resultados obtenidos y su discusión, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- Las células MSV administradas bajo inyección intravítrea en conejos pigmentados inmunocompetentes son seguras y bien toleradas, ya que no se han observado signos de infección y/o inflamación ni cambios tisulares a nivel histológico, que puedan ser considerados relevantes durante un período de seguimiento de seis semanas, y la dosis mejor tolerada es de 15×10^6 cells/ml (750,000 cels/50 μ l).
 - Las MSV permanecen dentro de la cavidad vítrea, tienen especial tropismo por la región vítrea cercana a la cápsula posterior del cristalino y a la cabeza del NO. Las MSV no migran hacia los principales órganos hematopoyéticos ni hacia los tejidos gonadales. Las MSV sobreviven al menos dos semanas tras la inyección intravítrea, lo que sería una gran ventaja para abordar la patología de estudio (NOIA-NA) dentro de la ventana terapéutica de esta patología.
- Las RGC en las NR cocultivadas durante 3 días con MSV degeneran menos que las RGC en las NR cultivadas sin MSV. Las MSV en cocultivo con NR porcinas mantienen su fenotipo característico de MSC.
 - Las MSV cocultivadas *in vitro* con o sin NR son capaces de secretar factores neurotróficos tales como el BDNF y el CNTF implicados en la supervivencia de las RGC en degeneración, por tanto, las MSV son potencialmente eficaces como terapia neuroprotectora en patologías relacionadas con la degeneración de las CGR y sus axones, como la NOIANA.
- Los resultados favorables obtenidos sobre seguridad *in vivo* y eficacia *in vitro* del presente PEI han permitido la autorización de un EECC en terapia celular para el tratamiento de pacientes con NOIANA en su fase aguda, cuya consecución abre nuevas expectativas terapéuticas en una patología que produce un deterioro visual irreversible y que a día de hoy no tiene ningún tratamiento.

7. CONCLUSIONES

Finalmente, los resultados de esta tesis doctoral permiten concluir que la terapia celular con MSV inyectadas por vía intravítrea podría funcionar para el tratamiento de pacientes con NOIANA, y si lo hacen puede que sea por el mecanismo que pensamos, es decir mediante la acción paracrina de los factores que estas células secretan.

8 CONTINUACIÓN DE LA LINEA DE INVESTIGACIÓN

Para ampliar el conocimiento acerca del comportamiento de las MSV en cultivo con NR, este proyecto se ha continuado con la evaluación *in vitro* de la secreción de otro factor neurotrófico implicado en la regeneración axonal, el *Nerve Growth Factor* (NGF), así como la determinación de la secreción del BDNF y el CNTF a diferentes dosis celulares y con tiempos más prolongados de cocultivo (hasta 6 días). Este estudio constituye el trabajo de fin de Máster del alumno Andres Valisena, con título “Evaluación de la secreción de factores neurotróficos por las MSV en cocultivo con NR porcinas en función de la dosis celular y el tiempo de cocultivo”.

Por otra parte, se continuará este proyecto con la realización del EECC autorizado, cuyos resultados serán de gran relevancia para la ampliación del conocimiento de la terapia celular para el tratamiento de la patología de estudio. Si los resultados son favorables se podría pasar a evaluar eficacia en futuros EECC e incluso se podrían proponer otras patologías retinianas o del nervio óptico que puedan favorecerse de un tratamiento con terapia celular.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Hayreh SS, Jonas JB, Zimmerman MB. Nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy and tobacco smoking. *Ophthalmology* 2007;114:804-809.
2. Dickersin K, Manheimer E, Li T. Surgery for nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;1:CD001538.
3. Hayreh SS, Zimmerman MB. Optic disc edema in non-arteritic anterior ischemic optic neuropathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245:1107-1121.
4. Hattenhauer MG, Leavitt JA, Hodge DO, Grill R, Gray DT. Incidence of nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy. *Am J Ophthalmol* 1997;123:103-107.
5. Johnson LN, Arnold AC. Incidence of nonarteritic and arteritic anterior ischemic optic neuropathy. Population-based study in the state of Missouri and Los Angeles County, California. *J Neuroophthalmol* 1994;14:38-44.
6. Roscic V, Bojic L, Marovic T. The incidence of nonarteritic ischemic optic neuropathy in the Split-Dalmatia County. *Acta Med Croatica* 2009;63:169-172.
7. Beri M, Klugman MR, Kohler JA, Hayreh SS. Anterior ischemic optic neuropathy. VII. Incidence of bilaterality and various influencing factors. *Ophthalmology* 1987;94:1020-1028.
8. Newman NJ, Scherer R, Langenberg P, et al. The fellow eye in NAION: report from the ischemic optic neuropathy decompression trial follow-up study. *Am J Ophthalmol* 2002;134:317-328.
9. Olsen TS, Larsen B, Herning M, Skriver EB, Lassen NA. Blood flow and vascular reactivity in collaterally perfused brain tissue. Evidence of an ischemic penumbra in patients with acute stroke. *Stroke* 1983;14:332-341.
10. Balduini W, Carloni S, Buonocore G. Autophagy in hypoxia-ischemia induced brain injury. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012;25 Suppl 1:30-34.
11. Lamba DA, Karl MO, Reh TA. Strategies for retinal repair: cell replacement and regeneration. *Prog Brain Res* 2009;175:23-31.
12. Parekkadan B, Milwid JM. Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annu Rev Biomed Eng* 2010;12:87-117.
13. McLaren A. Ethical and social considerations of stem cell research. *Nature* 2001;414:129-131.
14. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007;110:3499-3506.

9. BIBLIOGRAFÍA

15. Arnold AC. Pathogenesis of nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy. *J Neuroophthalmol* 2003;23:157-163.
16. Hayreh SS. Role of nocturnal arterial hypotension in the development of ocular manifestations of systemic arterial hypertension. *Curr Opin Ophthalmol* 1999;10:474-482.
17. Hayreh SS. Ischemic optic neuropathy. *Prog Retin Eye Res* 2009;28:34-62.
18. Morrison JC, Cork LC, Dunkelberger GR, Brown A, Quigley HA. Aging changes of the rhesus monkey optic nerve. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:1623-1627.
19. Aktas Z, Gurelik G, Akyurek N, Onol M, Hasanreisoglu B. Neuroprotective effect of topically applied brimonidine tartrate 0.2% in endothelin-1-induced optic nerve ischaemia model. *Clin Experiment Ophthalmol* 2007;35:527-534.
20. Bosley TM, Abu-Amero KK, Ozand PT. Mitochondrial DNA nucleotide changes in non-arteritic ischemic optic neuropathy. *Neurology* 2004;63:1305-1308.
21. Goldenberg-Cohen N, Dadon-Bar-El S, Hasanreisoglu M, et al. Possible neuroprotective effect of brimonidine in a mouse model of ischaemic optic neuropathy. *Clin Experiment Ophthalmol* 2009;37:718-729.
22. Li Y, Schlamp CL, Nickells RW. Experimental induction of retinal ganglion cell death in adult mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:1004-1008.
23. Pomeranz HD, Bhavsar AR. Nonarteritic ischemic optic neuropathy developing soon after use of sildenafil (viagra): a report of seven new cases. *J Neuroophthalmol* 2005;25:9-13.
24. Sakai T, Shikishima K, Matsushima M, Kitahara K. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in non-arteritic anterior ischemic optic neuropathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245:288-292.
25. Salomon O, Rosenberg N, Steinberg DM, et al. Nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy is associated with a specific platelet polymorphism located on the glycoprotein Ibalph gene. *Ophthalmology* 2004;111:184-188.
26. Bernstein SL, Guo Y, Kelman SE, Flower RW, Johnson MA. Functional and cellular responses in a novel rodent model of anterior ischemic optic neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4153-4162.
27. Bernstein SL, Guo Y, Slater BJ, Puche A, Kelman SE. Neuron stress and loss following rodent anterior ischemic optic neuropathy in double-reporter transgenic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:2304-2310.

28. Goldenberg-Cohen N, Guo Y, Margolis F, Cohen Y, Miller NR, Bernstein SL. Oligodendrocyte dysfunction after induction of experimental anterior optic nerve ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:2716-2725.
29. Knox DL, Kerrison JB, Green WR. Histopathologic studies of ischemic optic neuropathy. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2000;98:203-220; discussion 221-202.
30. Levin LA, Louhab A. Apoptosis of retinal ganglion cells in anterior ischemic optic neuropathy. *Arch Ophthalmol* 1996;114:488-491.
31. Salgado C, Vilson F, Miller NR, Bernstein SL. Cellular inflammation in nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy and its primate model. *Arch Ophthalmol* 2011;129:1583-1591.
32. Slater BJ, Mehrabian Z, Guo Y, Hunter A, Bernstein SL. Rodent anterior ischemic optic neuropathy (rAION) induces regional retinal ganglion cell apoptosis with a unique temporal pattern. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:3671-3676.
33. Zhang C, Guo Y, Slater BJ, Miller NR, Bernstein SL. Axonal degeneration, regeneration and ganglion cell death in a rodent model of anterior ischemic optic neuropathy (rAION). *Exp Eye Res* 2010;91:286-292.
34. Lonngren U, Napankangas U, Lafuente M, et al. The growth factor response in ischemic rat retina and superior colliculus after brimonidine pre-treatment. *Brain Res Bull* 2006;71:208-218.
35. Horn KP, Busch SA, Hawthorne AL, van Rooijen N, Silver J. Another barrier to regeneration in the CNS: activated macrophages induce extensive retraction of dystrophic axons through direct physical interactions. *J Neurosci* 2008;28:9330-9341.
36. Kupersmith MJ, Frohman L, Sanderson M, et al. Aspirin reduces the incidence of second eye NAION: a retrospective study. *J Neuroophthalmol* 1997;17:250-253.
37. Beck RW, Hayreh SS, Podhajsky PA, Tan ES, Moke PS. Aspirin therapy in nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy. *Am J Ophthalmol* 1997;123:212-217.
38. Group IONDTR. Optic nerve decompression surgery for nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy (NAION) is not effective and may be harmful. *JAMA* 1995;273:625-632.
39. Group IONDTR. Ischemic Optic Neuropathy Decompression Trial: twenty-four-month update. *Arch Ophthalmol* 2000;118:793-798.
40. Arnold AC, Levin LA. Treatment of ischemic optic neuropathy. *Semin Ophthalmol* 2002;17:39-46.
41. Hayreh SS, Zimmerman MB. Non-arteritic anterior ischemic optic neuropathy: role of systemic corticosteroid therapy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008;246:1029-1046.

9. BIBLIOGRAFÍA

42. Beck RW. Does Levodopa improve visual function in NAION? *Ophthalmology* 2000;107:1431-1434; discussion 1435-1438.
43. Hayreh SS. Does Levodopa improve visual function in NAION? *Ophthalmology* 2000;107:1434-1438.
44. Bernstein SL, Mehrabyan Z, Guo Y, Moianie N. Estrogen is not neuroprotective in a rodent model of optic nerve stroke. *Mol Vis* 2007;13:1920-1925.
45. Modarres M, Falavarjani KG, Nazari H, et al. Intravitreal erythropoietin injection for the treatment of non-arteritic anterior ischaemic optic neuropathy. *Br J Ophthalmol* 2011;95:992-995.
46. Wilhelm B, Ludtke H, Wilhelm H, Group BS. Efficacy and tolerability of 0.2% brimonidine tartrate for the treatment of acute non-arteritic anterior ischemic optic neuropathy (NAION): a 3-month, double-masked, randomised, placebo-controlled trial. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006;244:551-558.
47. Pece A, Querques G, Quinto A, Isola V. Intravitreal ranibizumab injection for nonarteritic ischemic optic neuropathy. *J Ocul Pharmacol Ther* 2010;26:523-527.
48. Rebolleda G, Perez-Lopez M, Casas-Llera P, Contreras I, Munoz-Negrete FJ. Visual and anatomical outcomes of non-arteritic anterior ischemic optic neuropathy with high-dose systemic corticosteroids. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2012.
49. Rebolleda G, Perez-Lopez M, Casas-Llera P, Munoz-Negrete FJ. Treatment of non-arteritic anterior ischemic optic neuropathy with high-dose systemic corticosteroids. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2012.
50. Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther* 2008;15:109-116.
51. Xu W, Xu GX. Mesenchymal stem cells for retinal diseases. *Int J Ophthalmol* 2011;4:413-421.
52. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315-317.
53. Bahat-Stroomza M, Barhum Y, Levy YS, et al. Induction of adult human bone marrow mesenchymal stromal cells into functional astrocyte-like cells: potential for restorative treatment in Parkinson's disease. *J Mol Neurosci* 2009;39:199-210.
54. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000;290:1775-1779.

55. Cho SR, Kim YR, Kang HS, et al. Functional recovery after the transplantation of neurally differentiated mesenchymal stem cells derived from bone marrow in a rat model of spinal cord injury. *Cell Transplant* 2009;18:1359-1368.
56. Ladak A, Olson J, Tredget EE, Gordon T. Differentiation of mesenchymal stem cells to support peripheral nerve regeneration in a rat model. *Exp Neurol* 2011;228:242-252.
57. Phinney DG, Isakova I. Plasticity and therapeutic potential of mesenchymal stem cells in the nervous system. *Curr Pharm Des* 2005;11:1255-1265.
58. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007;25:2739-2749.
59. Siqueira RC, Messias A, Voltarelli JC, Scott IU, Jorge R. Intravitreal injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells for hereditary retinal dystrophy: a phase I trial. *Retina* 2011;31:1207-1214.
60. Levkovitch-Verbin H, Sadan O, Vander S, et al. Intravitreal injections of neurotrophic factors secreting mesenchymal stem cells are neuroprotective in rat eyes following optic nerve transection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:6394-6400.
61. Seo JH, Cho SR. Neurorestoration induced by mesenchymal stem cells: potential therapeutic mechanisms for clinical trials. *Yonsei Med J* 2012;53:1059-1067.
62. Labouyrie E, Dubus P, Groppi A, et al. Expression of neurotrophins and their receptors in human bone marrow. *Am J Pathol* 1999;154:405-415.
63. Lin N, Hu K, Chen S, et al. Nerve growth factor-mediated paracrine regulation of hepatic stellate cells by multipotent mesenchymal stromal cells. *Life Sci* 2009;85:291-295.
64. Harper MM, Adamson L, Blits B, Bunge MB, Grozdanic SD, Sakaguchi DS. Brain-derived neurotrophic factor released from engineered mesenchymal stem cells attenuates glutamate- and hydrogen peroxide-mediated death of staurosporine-differentiated RGC-5 cells. *Exp Eye Res* 2009;89:538-548.
65. Kurokawa T, Katai N, Shibuki H, et al. BDNF diminishes caspase-2 but not c-Jun immunoreactivity of neurons in retinal ganglion cell layer after transient ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:3006-3011.
66. Li Y, Tao W, Luo L, et al. CNTF induces regeneration of cone outer segments in a rat model of retinal degeneration. *PLoS One* 2010;5:e9495.

9. BIBLIOGRAFÍA

67. MacLaren RE, Buch PK, Smith AJ, et al. CNTF gene transfer protects ganglion cells in rat retinae undergoing focal injury and branch vessel occlusion. *Exp Eye Res* 2006;83:1118-1127.
68. Jiang C, Moore MJ, Zhang X, Klassen H, Langer R, Young M. Intravitreal injections of GDNF-loaded biodegradable microspheres are neuroprotective in a rat model of glaucoma. *Mol Vis* 2007;13:1783-1792.
69. Ward MS, Khoobehi A, Lavik EB, Langer R, Young MJ. Neuroprotection of retinal ganglion cells in DBA/2J mice with GDNF-loaded biodegradable microspheres. *J Pharm Sci* 2007;96:558-568.
70. Gneccchi M, He H, Noiseux N, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J* 2006;20:661-669.
71. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 2004;94:678-685.
72. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 2004;109:1543-1549.
73. Mirotsov M, Zhang Z, Deb A, et al. Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:1643-1648.
74. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J Cell Physiol* 1996;166:585-592.
75. Chabannes D, Hill M, Merieau E, et al. A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood* 2007;110:3691-3694.
76. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006;24:386-398.
77. Sato K, Ozaki K, Oh I, et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 2007;109:228-234.
78. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 2008;111:1327-1333.
79. Williams AR, Hare JM. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res* 2011;109:923-940.

80. Hackett RB MT. *Eye irritation*. In: Marzulli F, Maibach H, eds. *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology*. 4th Ed. ed. Washington, DC: Hemisphere Publishing Corporation; 1991.
81. Fernandez-Bueno I, Pastor JC, Gayoso MJ, Alcalde I, Garcia MT. Muller and macrophage-like cell interactions in an organotypic culture of porcine neuroretina. *Mol Vis* 2008;14:2148-2156.
82. Fernandez-Bueno I, Garcia-Gutierrez MT, Srivastava GK, Gayoso MJ, Gonzalo-Orden JM, Pastor JC. Adalimumab (tumor necrosis factor-blocker) reduces the expression of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity increased by exogenous tumor necrosis factor alpha in an organotypic culture of porcine neuroretina. *Mol Vis* 2013;19:894-903.
83. Hendrickson A, Hicks D. Distribution and density of medium- and short-wavelength selective cones in the domestic pig retina. *Exp Eye Res* 2002;74:435-444.
84. Eisenfeld AJ, Bunt-Milam AH, Sarthy PV. Muller cell expression of glial fibrillary acidic protein after genetic and experimental photoreceptor degeneration in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984;25:1321-1328.
85. Ekstrom P, Sanyal S, Narfstrom K, Chader GJ, van Veen T. Accumulation of glial fibrillary acidic protein in Muller radial glia during retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29:1363-1371.
86. Lewis GP, Guerin CJ, Anderson DH, Matsumoto B, Fisher SK. Rapid changes in the expression of glial cell proteins caused by experimental retinal detachment. *Am J Ophthalmol* 1994;118:368-376.
87. Sharma RK, Netland PA. Early born lineage of retinal neurons express class III beta-tubulin isotype. *Brain Res* 2007;1176:11-17.
88. Canola K, Angenieux B, Tekaya M, et al. Retinal stem cells transplanted into models of late stages of retinitis pigmentosa preferentially adopt a glial or a retinal ganglion cell fate. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:446-454.
89. Delorme B, Ringe J, Gallay N, et al. Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood* 2008;111:2631-2635.
90. Alhadlaq A, Mao JJ. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev* 2004;13:436-448.
91. Anderson PJ, Watts H, Hille C, et al. Glial and endothelial blood-retinal barrier responses to amyloid-beta in the neural retina of the rat. *Clin Ophthalmol* 2008;2:801-816.
92. Hedberg-Buenz A, Christopher MA, Lewis CJ, et al. RetFM-J, an ImageJ-based module for automated counting and quantifying features of nuclei in retinal whole-mounts. *Exp Eye Res* 2016;146:386-392.

9. BIBLIOGRAFÍA

93. Gomez-Ulla F BE, Arias L, Martinez-Sanz F. "Manejo de las inyecciones intravítreas. Guías de Práctica Clínica de la SERV". Copyright © 2009, Sociedad Española de Retina y Vítreo 2009.
94. Chen CS, Johnson MA, Flower RA, Slater BJ, Miller NR, Bernstein SL. A primate model of nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:2985-2992.
95. Bernstein SL, Johnson MA, Miller NR. Nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy (NAION) and its experimental models. *Prog Retin Eye Res* 2011;30:167-187.
96. Otani A, Dorrell MI, Kinder K, et al. Rescue of retinal degeneration by intravitreally injected adult bone marrow-derived lineage-negative hematopoietic stem cells. *J Clin Invest* 2004;114:765-774.
97. Coco RM, Lopez MI, Pastor JC. Pharmacokinetics of 0.5 mg of a single and a multiple dose of intravitreal vancomycin in infected rabbit eyes. *J Ocul Pharmacol Ther* 2000;16:373-381.
98. Aydin E, Kazi AA, Peyman GA, et al. [Retinal toxicity of intravitreal doxycycline. A pilot study]. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2007;82:223-228.
99. Aguirre SA, Collette W, 3rd, Gukasyan HJ, Huang W. An assessment of the ocular safety of excipient maleic acid following intravitreal injection in rabbits. *Toxicol Pathol* 2012;40:797-806.
100. Kaplan HJ, Chiang CW, Chen J, Song SK. Vitreous Volume of the Mouse Measured by Quantitative High-Resolution MRI. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2010;51:4414-4414.
101. Del Amo EM, Urtti A. Rabbit as an animal model for intravitreal pharmacokinetics: Clinical predictability and quality of the published data. *Exp Eye Res* 2015;137:111-124.
102. Li N, Li XR, Yuan JQ. Effects of bone-marrow mesenchymal stem cells transplanted into vitreous cavity of rat injured by ischemia/reperfusion. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009;247:503-514.
103. Prockop DJ, Sekiya I, Colter DC. Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells. *Cytotherapy* 2001;3:393-396.
104. Griffin G, Clark JM, Zurlo J, Ritskes-Hoitinga M. Scientific uses of animals: harm-benefit analysis and complementary approaches to implementing the three Rs. *Rev Sci Tech* 2014;33:265-272.
105. Johnson TV, Bull ND, Hunt DP, Marina N, Tomarev SI, Martin KR. Neuroprotective effects of intravitreal mesenchymal stem cell transplantation in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:2051-2059.

106. Tzameret A, Sher I, Belkin M, et al. Epiretinal transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cells rescues retinal and vision function in a rat model of retinal degeneration. *Stem Cell Res* 2015;15:387-394.
107. Tzameret A, Sher I, Belkin M, et al. Transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cells as a thin subretinal layer ameliorates retinal degeneration in a rat model of retinal dystrophy. *Exp Eye Res* 2014;118:135-144.
108. Lu B, Wang S, Girman S, McGill T, Ragaglia V, Lund R. Human adult bone marrow-derived somatic cells rescue vision in a rodent model of retinal degeneration. *Exp Eye Res* 2010;91:449-455.
109. Lee JW, Park H, Choi JH, et al. Short-term changes of intraocular pressure and ocular perfusion pressure after intravitreal injection of bevacizumab or ranibizumab. *BMC Ophthalmol* 2016;16:69.
110. Roubex C, Godefroy D, Mias C, et al. Intraocular pressure reduction and neuroprotection conferred by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an animal model of glaucoma. *Stem Cell Res Ther* 2015;6:177.
111. Lin KJ, Loi MX, Lien GS, et al. Topical administration of orbital fat-derived stem cells promotes corneal tissue regeneration. *Stem Cell Res Ther* 2013;4:72.
112. Zeppieri M, Salvetat ML, Beltrami AP, et al. Human adipose-derived stem cells for the treatment of chemically burned rat cornea: preliminary results. *Curr Eye Res* 2013;38:451-463.
113. Lin HF, Lai YC, Tai CF, et al. Effects of cultured human adipose-derived stem cells transplantation on rabbit cornea regeneration after alkaline chemical burn. *Kaohsiung J Med Sci* 2013;29:14-18.
114. Song D, Zhong Y, Qian C, et al. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Therapy in Cyclophosphamide-Induced Premature Ovarian Failure Rat Model. *Biomed Res Int* 2016;2016:2517514.
115. Kyriakou C, Rabin N, Pizzey A, Nathwani A, Yong K. Factors that influence short-term homing of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a xenogeneic animal model. *Haematologica* 2008;93:1457-1465.
116. Leow SN, Luu CD, Hairul Nizam MH, et al. Safety and Efficacy of Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells Therapy for Retinal Degeneration. *PLoS One* 2015;10:e0128973.
117. Nishihara H. [Studies on the ultrastructure of the inner limiting membrane of the retina. I. Surface replication study on the inner limiting membrane of the retina]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 1989;93:429-438.

9. BIBLIOGRAFÍA

118. Ge J, Guo L, Wang S, et al. The size of mesenchymal stem cells is a significant cause of vascular obstructions and stroke. *Stem Cell Rev* 2014;10:295-303.
119. Shen J, Durairaj C, Lin T, Liu Y, Burke J. Ocular pharmacokinetics of intravitreally administered brimonidine and dexamethasone in animal models with and without blood-retinal barrier breakdown. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:1056-1066.
120. Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 2001;294:1945-1948.
121. Sendtner M, Carroll P, Holtmann B, Hughes RA, Thoenen H. Ciliary neurotrophic factor. *J Neurobiol* 1994;25:1436-1453.
122. Abdel-Misih SR, Bloomston M. Liver anatomy. *Surg Clin North Am* 2010;90:643-653.
123. Michael M. *Cirugía Clínica*; 2005.
124. Ogilvie JM, Speck JD, Lett JM, Fleming TT. A reliable method for organ culture of neonatal mouse retina with long-term survival. *J Neurosci Methods* 1999;87:57-65.
125. Cossenza M, Cadilhe DV, Coutinho RN, Paes-de-Carvalho R. Inhibition of protein synthesis by activation of NMDA receptors in cultured retinal cells: a new mechanism for the regulation of nitric oxide production. *J Neurochem* 2006;97:1481-1493.
126. Caffè AR, Ahuja P, Holmqvist B, et al. Mouse retina explants after long-term culture in serum free medium. *J Chem Neuroanat* 2001;22:263-273.
127. Syed H, Safa R, Chidlow G, Osborne NN. Sulfisoxazole, an endothelin receptor antagonist, protects retinal neurones from insults of ischemia/reperfusion or lipopolysaccharide. *Neurochem Int* 2006;48:708-717.
128. Saikia P, Maisch T, Kobuch K, et al. Safety testing of indocyanine green in an ex vivo porcine retina model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:4998-5003.
129. Delyfer MN, Simonutti M, Neveux N, Leveillard T, Sahel JA. Does GDNF exert its neuroprotective effects on photoreceptors in the rd1 retina through the glial glutamate transporter GLAST? *Mol Vis* 2005;11:677-687.
130. Johnson TV, Martin KR. Development and characterization of an adult retinal explant organotypic tissue culture system as an in vitro intraocular stem cell transplantation model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:3503-3512.
131. Di Lauro S, Rodriguez-Crespo D, Gayoso MJ, et al. A novel coculture model of porcine central neuroretina explants and retinal pigment epithelium cells. *Mol Vis* 2016;22:243-253.

132. Osborne A, Hopes M, Wright P, Broadway DC, Sanderson J. Human organotypic retinal cultures (HORCs) as a chronic experimental model for investigation of retinal ganglion cell degeneration. *Exp Eye Res* 2016;143:28-38.
133. Taylor L, Arner K, Ghosh F. Specific inhibition of TRPV4 enhances retinal ganglion cell survival in adult porcine retinal explants. *Exp Eye Res* 2016;154:10-21.
134. Hebel R. Distribution of retinal ganglion cells in five mammalian species (pig, sheep, ox, horse, dog). *Anat Embryol (Berl)* 1976;150:45-51.
135. Nieto-Miguel T, Galindo S, Reinoso R, et al. In vitro simulation of corneal epithelium microenvironment induces a corneal epithelial-like cell phenotype from human adipose tissue mesenchymal stem cells. *Curr Eye Res* 2013;38:933-944.
136. Rodriguez-Crespo D, Di Lauro S, Singh AK, et al. Triple-layered mixed co-culture model of RPE cells with neuroretina for evaluating the neuroprotective effects of adipose-MSCs. *Cell Tissue Res* 2014;358:705-716.
137. Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:1632-1636.
138. Johnson JE, Barde YA, Schwab M, Thoenen H. Brain-derived neurotrophic factor supports the survival of cultured rat retinal ganglion cells. *J Neurosci* 1986;6:3031-3038.
139. Gao H, Qiao X, Hefti F, Hollyfield JG, Knusel B. Elevated mRNA expression of brain-derived neurotrophic factor in retinal ganglion cell layer after optic nerve injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:1840-1847.
140. Perez MT, Caminos E. Expression of brain-derived neurotrophic factor and of its functional receptor in neonatal and adult rat retina. *Neurosci Lett* 1995;183:96-99.
141. Vecino E, Garcia-Crespo D, Garcia M, Martinez-Millan L, Sharma SC, Carrascal E. Rat retinal ganglion cells co-express brain derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor TrkB. *Vision Res* 2002;42:151-157.
142. Harada T, Harada C, Kohsaka S, et al. Microglia-Muller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *J Neurosci* 2002;22:9228-9236.
143. Seki M, Tanaka T, Sakai Y, et al. Muller Cells as a source of brain-derived neurotrophic factor in the retina: noradrenaline upregulates brain-derived neurotrophic factor levels in cultured rat Muller cells. *Neurochem Res* 2005;30:1163-1170.

9. BIBLIOGRAFÍA

144. Castren E, Zafra F, Thoenen H, Lindholm D. Light regulates expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:9444-9448.
145. Karlsson M, Hallbook F. Kainic acid, tetrodotoxin and light modulate expression of brain-derived neurotrophic factor in developing avian retinal ganglion cells and their tectal target. *Neuroscience* 1998;83:137-150.
146. Spalding KL, Cui Q, Harvey AR. The effects of central administration of neurotrophins or transplants of fetal tectal tissue on retinal ganglion cell survival following removal of the superior colliculus in neonatal rats. *Brain Res Dev Brain Res* 1998;107:133-142.
147. Sarthy VP. Muller cells in retinal health and disease. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2000;75:367-368.
148. Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, et al. Muller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res* 2006;25:397-424.
149. Marc RE, Murry RF, Fisher SK, Linberg KA, Lewis GP. Amino acid signatures in the detached cat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:1694-1702.
150. Lewis GP, Betts KE, Sethi CS, et al. Identification of ganglion cell neurites in human subretinal and epiretinal membranes. *Br J Ophthalmol* 2007;91:1234-1238.
151. Pastor JC, Mendez MC, de la Fuente MA, et al. Intraretinal immunohistochemistry findings in proliferative vitreoretinopathy with retinal shortening. *Ophthalmic Res* 2006;38:193-200.
152. Romero-Aleman MM, Monzon-Mayor M, Santos E, Yanes C. Expression of neuronal markers, synaptic proteins, and glutamine synthetase in the control and regenerating lizard visual system. *J Comp Neurol* 2010;518:4067-4087.
153. Xu SY, Wu YM, Ji Z, Gao XY, Pan SY. A modified technique for culturing primary fetal rat cortical neurons. *J Biomed Biotechnol* 2012;2012:803930.
154. Chen H, Wei X, Cho KS, et al. Optic neuropathy due to microbead-induced elevated intraocular pressure in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:36-44.
155. Hu Y, Cho S, Goldberg JL. Neurotrophic effect of a novel TrkB agonist on retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:1747-1754.
156. Hu Y, Cui Q, Harvey AR. Interactive effects of C3, cyclic AMP and ciliary neurotrophic factor on adult retinal ganglion cell survival and axonal regeneration. *Mol Cell Neurosci* 2007;34:88-98.
157. Oono S, Kurimoto T, Nakazawa T, et al. Pyroglutamic acid promotes survival of retinal ganglion cells after optic nerve injury. *Curr Eye Res* 2009;34:598-605.

158. Lind D, Franken S, Kappler J, Jankowski J, Schilling K. Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. *J Neurosci Res* 2005;79:295-302.
159. Dijk F, Bergen AA, Kamphuis W. GAP-43 expression is upregulated in retinal ganglion cells after ischemia/reperfusion-induced damage. *Exp Eye Res* 2007;84:858-867.
160. Shen S, Wiemelt AP, McMorris FA, Barres BA. Retinal ganglion cells lose trophic responsiveness after axotomy. *Neuron* 1999;23:285-295.
161. Labrador-Velandia S, Alonso-Alonso ML, Alvarez-Sanchez S, et al. Mesenchymal stem cell therapy in retinal and optic nerve diseases: An update of clinical trials. *World J Stem Cells* 2016;8:376-383.
162. Jonas JB, Witzens-Harig M, Arseniev L, Ho AD. Intravitreal autologous bone marrow-derived mononuclear cell transplantation: a feasibility report. *Acta Ophthalmol* 2008;86:225-226.
163. Jonas JB, Witzens-Harig M, Arseniev L, Ho AD. Intravitreal autologous bone-marrow-derived mononuclear cell transplantation. *Acta Ophthalmol* 2010;88:e131-132.
164. Orozco L, Munar A, Soler R, et al. Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study. *Transplantation* 2013;95:1535-1541.
165. Orozco L, Munar A, Soler R, et al. Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: two-year follow-up results. *Transplantation* 2014;97:e66-68.
166. Soler R, Orozco L, Munar A, et al. Final results of a phase I-II trial using ex vivo expanded autologous Mesenchymal Stromal Cells for the treatment of osteoarthritis of the knee confirming safety and suggesting cartilage regeneration. *Knee* 2016;23:647-654.
167. Vega A, Martin-Ferrero MA, Del Canto F, et al. Treatment of Knee Osteoarthritis With Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: A Randomized Controlled Trial. *Transplantation* 2015;99:1681-1690.
168. Woods EJ, Perry BC, Hockema JJ, Larson L, Zhou D, Goebel WS. Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. *Cryobiology* 2009;59:150-157.
169. Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A, McGann LE, Elliott JA. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology* 2015;71:181-197.
170. Characteristics of patients with nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy eligible for the Ischemic Optic Neuropathy Decompression Trial. *Arch Ophthalmol* 1996;114:1366-1374.

ANEXO 1



**DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN
CON MEDICAMENTOS**

D. F. Javier Álvarez González, Secretario del COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS del Hospital Clínico Universitario de Valladolid

CERTIFICA

Que éste Comité ha evaluado la siguiente propuesta de ensayo clínico

CÓDIGO: IOBA-01-2016 Nº EUDRACT: 2016-003029-40

Código en el HCUV: CASVE 16-270

TÍTULO: "ESTUDIO DE FASE II DE LA SEGURIDAD DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES 15-007 MSV EN INYECCIÓN INTRAVÍTREA PARA EL TRATAMIENTO DE PACIENTES CON NEUROPATÍA ÓPTICA ISQUÉMICA ANTERIOR NO ARTRÍTICA AGUDA".

PROMOTOR: Instituto de Oftalmobiología Aplicada IOBA.
PROTOCOLO: Versión 1.0 Fecha: 6 de septiembre de 2016.

- Hoja de Información al Paciente/Consentimiento Informado, versión 1 fecha 09 de septiembre de 2016.
- Hoja informativa para oftalmólogos y neurólogos del hospital clínico universitario de Valladolid, versión 1 fecha 09 de septiembre de 2016.
- Hoja informativa para oftalmólogos y neurólogos del complejo asistencial universitario de Palencia, versión 1 fecha 09 de septiembre de 2016.

Que este Comité ha realizado la evaluación de la parte I de la solicitud de autorización del ensayo, ha valorado las respuestas del promotor a las aclaraciones solicitadas (si las hubiese) y ha transmitido a la Agencia Española de medicamentos su opinión final sobre la parte I.

Que este Comité ha realizado la evaluación de la parte II de la solicitud de autorización del ensayo, de acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 1090/2015 y en el art. 7 del reglamento (UE) 536/2014 y considera que:

- El procedimiento para obtener el consentimiento informado (incluyendo las hojas de información al sujeto del ensayo y consentimientos informados mencionados en el encabezamiento), y el plan de reclutamiento de sujetos previsto son adecuados y cumplen con los requisitos para la obtención del consentimiento informado previsto en el capítulo II del Real Decreto 1090/2015.
- Las compensaciones previstas a los participantes son adecuadas, así como las previsiones de indemnización por daños y perjuicios que pueda sufrir el participante.
- El procedimiento previsto para el manejo de datos personales es adecuado.
- El uso futuro de muestras biológicas obtenidas durante el ensayo se adecua a lo previsto en el Real Decreto 1716/2011.
- Para la realización del ensayo se consideran adecuados los centros e investigadores previstos en el anexo II a este dictamen, teniendo en cuenta las declaraciones de idoneidad emitidas por el promotor y por lo responsables de las instituciones correspondientes.



ANEXO 1. AUTORIZACIÓN DEL EECC POR PARTE DEL CEIC



Que este Comité decidió emitir **DICTAMEN FAVORABLE** en la reunión celebrada el día 29/09/2016 (acta nº9 del 2016).

Que en dicha reunión se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente - Real Decreto 1090/2015 - para que la decisión del citado CEIm sea válida.

Que el CEIm del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, tanto en su composición como en sus procedimientos, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEIm del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, es la indicada en el anexo I, teniendo en cuenta que en el caso de que algún miembro participe en el ensayo o declare algún conflicto de interés no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen de la solicitud de autorización del ensayo clínico.

Lo que firmo en Valladolid a 5 de octubre de 2016



F. Javier Álvarez

Fdo. Prof. F. Javier Álvarez.
Secretario Técnico
CEIC Área de Valladolid – Este (CEIC-VA-ESTE-HCUV)
Facultad de Medicina, Farmacología
Universidad de Valladolid,
c/ Ramón y Cajal 7,
47005 Valladolid
alvarez@med.uva.es
jalvarezgo@saludcastillayleon.es
Tel.: 983 423077



ANEXO 2

ANEXO 2. AUTORIZACIÓN DEL EEC POR PARTE DE LA AEMPS



DEPARTAMENTO
DE MEDICAMENTOS
DE USO HUMANO
Área de Ensayos Clínicos

Referencia: MUH/CLIN/EC

ASUNTO: RESOLUCIÓN DE LA SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE UN ENSAYO CLÍNICO

DESTINATARIO: IOBA
Paseo de Belen 17
47011 Valladolid (España)

DATOS DE LA SOLICITUD

Solicitud de autorización del Ensayo clínico N° EudraCT 2016-003029-40 y título Estudio de Fase II de la seguridad de las células madre mesenquimales MSV® en inyección intravítrea para el tratamiento de pacientes con neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica aguda.

Promotor: IOBA - University of Valladolid
Paseo de Belen 17
47011 Valladolid (España)

Fecha de solicitud válida: 08/12/2016

Una vez evaluada la solicitud de autorización de ensayo clínico previamente indicada, se considera que cumple con los requisitos indicados en el Real Decreto 1090/2015, de 4 de diciembre, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos, los Comités de Ética de la Investigación con medicamentos y el Registro Español de Estudios Clínicos y demás legislación aplicable*.

Por todo lo anteriormente expuesto la Directora de la Agencia de Medicamentos y Productos Sanitarios en el ejercicio de sus competencias RESUELVE:

AUTORIZAR el ensayo clínico solicitado y ACTUALIZAR la calificación del medicamento 15-007 MSV con N° de PEI 15-007 como producto en fase de investigación clínica, con las siguientes condiciones:

La dosis a administrar en el ensayo clínico (EC) no ha sido justificada adecuadamente por el promotor. Teniendo en cuenta los datos de seguridad preclínica del solicitante, la dosis inicial en humanos no será superior a 1.5x10⁶ células/mL en 100 µL y la dosis máxima a emplear en el ensayo una vez se haya comprobado la seguridad de la primera dosis no podrá superar la concentración de 1.5x10⁷ células/mL en 100 µL. Se reflejará de forma adecuada los términos indicados referentes a la

* Texto refundido de la Ley de Garantías y Uso Racional de los medicamentos y productos sanitarios, aprobado por Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de Julio.
Real Decreto 1275/2011, de 16 de septiembre, por el que se crea la Agencia estatal "Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios y se aprueba su Estatuto".

Firmado digitalmente por: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios Localizador: FEFSOPW78C
Fecha de la firma: 14/02/2017

Puede comprobar la autenticidad del documento en la aplicación Localizador de la Web de la AEMPS

CORREO ELECTRÓNICO
smhaem@aemps.es

Página 1 de 2

C/ CAMPEZO, 1 - EDIFICIO 8
28022 MADRID
Tel.: 918225073
Fax: 918225043



dosis en el protocolo del estudio. Una vez estos cambios hayan sido incluidos se considerará aprobable desde un punto de vista preclínico la solicitud del EC.

¿Dosis inicial máxima: 1.5x10⁶ células/mL en 100 µL

¿Dosis máxima para el EC: 1.5x10⁷ células/mL en 100 µL

Contra esta Resolución, que pone fin a la vía administrativa, puede interponerse potestativamente Recurso de Reposición ante el/la Director/a de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios en el plazo de un mes, conforme a lo dispuesto en los artículos 123 y 124 de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas, o interponerse Recurso Contencioso-Administrativo ante el Juzgado Central de lo Contencioso-Administrativo de Madrid, en el plazo de dos meses a contar desde el día siguiente a la recepción de la presente notificación, conforme a lo dispuesto en la Ley Reguladora de la Jurisdicción Contencioso-Administrativa de 13 de julio de 1998, y sin perjuicio de cualquier otro recurso que pudiera interponerse.

LA DIRECTORA DE LA AGENCIA ESPAÑOLA
DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS

D^a. Belén Crespo Sánchez-Eznarriaga

Firmado digitalmente por: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
Fecha de la firma: 14/02/2017

Localizador: FEFSCPW78C

Puede comprobar la autenticidad del documento en la aplicación Localizador de la Web de la AEMPS

CORREO ELECTRÓNICO
smhaem@aemps.es

Página 2 de 2

C/ CAMPEZO, 1 - EDIFICIO 8
28022 MADRID
Tel.: 915225073
Fax: 915225043

ANEXO 3

[Escriba aquí]



Universidad de Valladolid



HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Título del Ensayo: “Ensayo clínico fase II, de la seguridad de las células madre mesenquimales MSV (PEI: 15-007) en inyección intravítrea en pacientes con neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica aguda (NOIA-NA)”

Nº de estudio: IOBA-01-2016

Nº EUDRA: 2016-003029-40

Coordinador: IOBA (Instituto de Oftalmobiología Aplicada)

Nombre del paciente: _____

FINALIDAD

El estudio en el que le ofrecemos participar pretende **establecer las bases que puedan demostrar que las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (MSV) inyectadas por vía intravítrea pueden servir como potencial terapia para el tratamiento de la Neuropatía Óptica Isquémica Anterior Aguda no arterítica**, patología que actualmente no tiene tratamiento.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

A usted se le ha propuesto participar en un ensayo clínico que se llevará a cabo en el IOBA. Este ensayo clínico ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica correspondiente y la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios, de acuerdo a la legislación vigente, el Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Es

importante que usted entienda los principios generales que se aplican a todos los pacientes que toman parte en el estudio:

- La participación es totalmente voluntaria
- No existen tratamientos alternativos aprobados para esta patología por lo que Ud. puede elegir tratarse o no.
- El beneficio para usted puede que no se alcance, pero se pueden obtener conocimientos que podrán beneficiar a otros pacientes que estén en su situación.
- Si no desea participar en este ensayo clínico, su decisión no repercutirá en sus cuidados médicos.
- Si decide retirarse del estudio, su médico investigador responsable del ensayo continuará tratándole con los mejores cuidados disponibles.
- Los objetivos de este ensayo, riesgos, inconvenientes molestias o cualquier otra información sobre el estudio que usted solicite, le será facilitada por el médico investigador responsable del estudio para darle la oportunidad de que decidir antes de ser incluido o no en el ensayo.

Siéntase en absoluta libertad de preguntar cualquier duda que pudiera surgirle. Una vez que haya comprendido el estudio y si desea participar, se le pedirá que firme este consentimiento, del cual se le entregará una copia firmada y fechada.

El personal clínico del estudio puede retirarle del estudio en cualquier momento si lo considera necesario. El IOBA puede suspender este estudio en cualquier momento si tiene razones para determinar qué es lo adecuado.

CONDICIONES DEL ESTUDIO

Si acepta participar en el estudio es necesario que antes de comenzar confirmemos que es un candidato adecuado. Para ello en la consulta de inclusión se le harán una serie de preguntas para conocer su historial clínico y más tarde se le practicará una exploración médica.

Posteriormente se recogerá la siguiente información sobre usted:

- Se hablará sobre el estudio, el investigador responderá todas las preguntas que tenga sobre este estudio o sobre el consentimiento informado y se le pedirá que firme este formulario de consentimiento antes de iniciar su participación en el estudio.
- Si es mujer en edad fértil, se le facilitará un test de embarazo antes de la primera visita del estudio para que se pueda valorar el resultado antes de ser incluida en el estudio.

La neuropatía óptica isquémica anterior aguda no arterítica es una patología causada por un infarto a nivel de la cabeza del nervio óptico, y caracterizada por la pérdida de visión en un ojo de forma aguda e indolora, acompañada de defectos del campo visual y alteración de la visión de los colores. **A día de hoy no hay ningún tratamiento aprobado que haya demostrado ser efectivo para la mejora de la función visual de los pacientes que la padecen. Por esa razón no se emplea ningún tratamiento.**

El presente estudio pretende determinar la seguridad en la administración intravítrea del fármaco en estudio PEI 15-007 solución inyectable en una jeringa precargada (2×10^7 células/ml) en una dosis única y se evaluarán sus efectos al principio y hasta 12 meses tras la administración del tratamiento en estudio.

Si usted cumple los requisitos médicos para ser incluido en el estudio, pasará a la fase de tratamiento en la que recibirá el siguiente fármaco:

Tratamiento: PEI 15-007 Inyección intravítrea ($1,5 \times 10^6$ células/ml) dosis única. Es decir una dosis de células madre cuya finalidad es que liberen factores en el interior de su ojo que ayuden a reducir el daño causado por el infarto y evitar que se extienda a fibras de su nervio óptico que no estén directamente afectadas.

La inyección intravítrea se realizará en el quirófano por un oftalmólogo con amplia experiencia. Será un procedimiento ambulatorio, es decir, no precisa de ingreso hospitalario. Previamente a la realización de la inyección se echarán gotas de anestésico en el ojo a tratar para evitar la sensación de dolor. También se echarán gotas de betadine® como antiséptico. Tras la anestesia del ojo, se colocará un instrumento que mantendrá los párpados abiertos, y luego se aplicará la inyección en el cuadrante ínfero-temporal del ojo. Luego se echará nuevamente una gota de betadine® y se retirará el separador de párpados. El procedimiento suele ser breve, tiene una

duración aproximada de 15 minutos.

Posteriormente, durante 7 días deberá instilarse un antibiótico tópico (oftacilox) 3 veces al día en el ojo intervenido.

En caso de que aparezca un acontecimiento adverso o surja algún problema con el tratamiento, inmediatamente se tomarán las medidas necesarias para controlar tal situación.

Se estima que su participación en este estudio tenga una duración total de 12 meses, durante los cuales tendrá que acudir al IOBA para realizar un total de 8 visitas, en las que se realizarán las pruebas que comúnmente se llevan a cabo en la consulta especializada de oftalmología habitual (presión intraocular, exploración en lámpara de hendidura, exploración de fondo de ojo y campos visuales, entre otros). La única diferencia respecto a la rutina habitual será el mayor número de visitas con respecto a lo habitual para su enfermedad, y algunos requisitos más estrictos en cuanto a la realización de alguna de ellas, como el tipo de campo visual.

Ninguno de los procedimientos que se le van a realizar durante las visitas es invasivo o resulta doloroso, únicamente puede sentir una ligera molestia o escozor durante la administración de la inyección intravítrea. No obstante para la toma de la tensión ocular se le instilará anestésico tópico para evitar las pequeñas molestias derivadas de su realización.

Todos los datos recogidos serán utilizados exclusivamente para la realización de los análisis descritos en el protocolo de este estudio. Si usted, o el personal del estudio cree necesario realizar otra visita entre visitas programadas, se programará otra cita con usted. Si el personal investigador lo estimara necesario se podrán precisar pruebas adicionales.

SUS RESPONSABILIDADES

Usted deberá acudir a todas las visitas del estudio, así como a aquellas necesarias para la repetición de alguna prueba que le comunique el investigador y avisar al centro, tan pronto como pueda, si por cualquier motivo no pudiera acudir a alguna de estas visitas. Se le pedirá que comunique cualquier cambio en su medicación (con o sin prescripción médica) y comunicar al personal investigador del estudio cualquier cambio que usted experimente.

BENEFICIOS Y RIESGOS RAZONABLEMENTE PREVISIBLES PARA EL PARTICIPANTE

La meta del tratamiento es prevenir más pérdida de visión. Aunque algunos pacientes pudieran recobrar visión, o mantener la que tiene en el momento de entrada a este estudio, es posible que el medicamento no restaure la visión que ya se haya perdido, y es posible que al fin no impida que se pierda más visión a causa de la enfermedad.

El medicamento que se evalúa en el presente estudio es posible que no mejore o aún que empeore su condición. Cualquiera o todas las complicaciones pueden causar reducción en la vista y/o tienen la posibilidad de causar ceguera. Es posible que sean necesarios procedimientos adicionales para tratar estas complicaciones. Durante las visitas de seguimiento o llamadas telefónicas, se le examinará para ver si presenta efectos secundarios y los resultados se le explicarán detalladamente.

El producto en estudio que se va a usar durante el estudio está aprobado por la AEMPS y ya está siendo actualmente utilizado en otros ensayos clínicos para el tratamiento de otras patologías en el ser humano.

Los riesgos y molestias son las derivadas de cualquier tratamiento administrado bajo inyección intravítrea, que según se describen en el estudio "The International Intravitreal Bevacizumab Safety Survey" en relación con el procedimiento se describieron las siguientes complicaciones: abrasiones corneales (0,15%), daños al cristalino (0,01%), endoftalmitis (0,014%), desprendimientos de retina (0,04%) y hemorragias subconjuntivales (0,03%).

TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS

No se le obliga a recibir tratamiento para su condición, aunque sin tratamiento, estas enfermedades pueden conducir a más pérdida de visión y ceguera. Actualmente no hay ninguna terapia que haya demostrado ser efectiva para el tratamiento de la neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica. Aunque se han utilizado diversos tratamientos en pacientes afectados como el ácido acetilsalicílico, la fenestración de la cabeza del nervio óptico, los corticosteroides, la levodopa, la difenilhidantoína, los estrógenos, la eritropoyetina, la brimonidina y el ranibizumab, ninguno ha logrado mejorar la función visual de los pacientes, ni prevenir la afectación del ojo contralateral, por lo que no están indicados ni se utilizan.

CONFIDENCIALIDAD

Puede publicarse un informe de los resultados de este estudio o enviarse a las autoridades sanitarias pertinentes, pero su nombre no aparecerá en estos documentos. De acuerdo a la Ley Orgánica 15/1999, su confidencialidad será debidamente respetada si la información es transferida a otros países. Su nombre puede ser revelado a las autoridades sanitarias gubernamentales como la AEMPS (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios) o a los Comités Éticos de Investigación Clínica (CEIC) en caso de que necesiten inspeccionar sus archivos médicos. Se tomarán las medidas oportunas para mantener la confidencialidad de los archivos médicos y de la información personal.

PERSONA DE CONTACTO

Se le anima a que consulte con el personal encargado del estudio cualquier duda que tenga debiendo recibir respuestas satisfactorias a todas sus preguntas. Si durante el estudio experimenta algún cambio en su salud o en la medicación, o si tiene alguna pregunta adicional, deberá ponerse en contacto con:

Equipo Investigador:

Dra. José Carlos Pastor Jimeno Número de Teléfono: 983 184762

Dra. Rosa María Coco Martin Número de Teléfono: 983 184738

Título del Ensayo: ““Estudio de Fase II de la seguridad de las células madre mesenquimales: 15-007 MSV® en inyección intravítrea para el tratamiento de pacientes con neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica aguda”

Número de estudio:

Al firmar abajo, yo declaro que:

1. He leído, o me han leído, y entiendo completamente el contenido del formulario de información adjunto, Versión 1.0 de septiembre de 2016
2. He tenido la oportunidad de preguntar y obtener respuestas satisfactorias a cada una de mis preguntas.
3. Acepto de forma voluntaria participar en este estudio de investigación y sé que puedo retirarme en cualquier momento sin que se vea afectada la continuidad de mi tratamiento.
4. Personal del equipo investigador: _____,
Dirección: Instituto Universitario de Oftalmología Aplicada, Valladolid; Número de Teléfono: 983 184762; me ha explicado la información para el paciente y el formulario de consentimiento y comprendo lo que implica la investigación.
5. He comprendido completamente que los representantes del patrocinador, el Comité Ético Independiente o los representantes de las autoridades regulatorias pueden examinar mis registros médicos donde aparece mi nombre para verificar la exactitud de la información obtenida y entiendo que estas personas tendrán el deber de manejar esta información con confidencialidad utilizándola solamente con un objetivo legítimo para la salud pública.
6. Acepto comunicar al personal clínico del estudio todos los efectos secundarios u otros cambios en mi salud y todos los cambios de mi tratamiento médico
7. Se me entregará una copia firmada y fechada de este formulario de consentimiento para mis propios archivos.

PACIENTE (Debe ser completado, firmado y fechado por el paciente)

Nombre del paciente _____

Firma _____ Fecha _____

REPRESENTANTE LEGAL (Debe ser completado, firmado y fechado por el representante legalmente autorizado, si aplica)

Nombre del representante legalmente autorizado _____

Firma _____ Fecha _____

INVESTIGADOR (Debe ser firmado y fechado por el Investigador Principal u otro investigador autorizado)

Nombre del Investigador _____

Firma _____ Fecha _____

APARTADO PARA LA REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO (CONTACTAR CON EL INVESTIGADOR PRINCIPAL)

Yo, D/Dña _____ revoco el consentimiento de participación en el estudio “Estudio de Fase II de la seguridad de las células madre mesenquimales: 15-007 MSV® en inyección intravítrea para el tratamiento de pacientes con neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica aguda” arriba firmado con fecha _____ Firma: _____

ANEXO 4



Submit a Manuscript: <http://www.wjgnet.com/esp/>
 Help Desk: <http://www.wjgnet.com/esp/helpdesk.aspx>
 DOI: 10.4252/wjsc.v8.i11.376

World J Stem Cells 2016 November 26; 8(11): 376-383
 ISSN 1948-0210 (online)
 © 2016 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

MINIREVIEWS

Mesenchymal stem cell therapy in retinal and optic nerve diseases: An update of clinical trials

Sonia Labrador-Velandia, María Luz Alonso-Alonso, Sara Alvarez-Sanchez, Jorge González-Zamora, Irene Carretero-Barrio, José Carlos Pastor, Iván Fernandez-Bueno, Girish Kumar Srivastava

Sonia Labrador-Velandia, María Luz Alonso-Alonso, José Carlos Pastor, Iván Fernandez-Bueno, Girish Kumar Srivastava, Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada, Universidad de Valladolid, 47011 Valladolid, Spain

Sara Alvarez-Sanchez, Jorge González-Zamora, Irene Carretero-Barrio, José Carlos Pastor, Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid, 47005 Valladolid, Spain

José Carlos Pastor, Iván Fernandez-Bueno, Girish Kumar Srivastava, Centro en Red de Medicina Regenerativa y Terapia Celular de Castilla y León, 47011 Valladolid, Spain

José Carlos Pastor, Iván Fernandez-Bueno, Girish Kumar Srivastava, Red Temática de Investigación Cooperativa Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III. Oñared, 28029 Madrid, Spain

José Carlos Pastor, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, 47003 Valladolid, Spain

Author contributions: All the authors contributed to the paper.

Supported by A grants from the Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León, No. VA118U14; and the Centro en Red de Medicina Regenerativa y Terapia Celular de la Junta de Castilla y León, 47011 Valladolid.

Conflict-of-interest statement: The authors have no conflicts of interest to disclose.

Open-Access: This article is an open-access article which was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Manuscript source: Invited manuscript

Correspondence to: Girish Kumar Srivastava, PhD, Prin-

cipal and Senior Investigator, Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada, Universidad de Valladolid, Campus Miguel Delibes, Paseo de Belén, 17, 47011 Valladolid, Spain. girish@ioba.med.uva.es
 Telephone: +34-9-83184753
 Fax: +34-9-83184762

Received: June 8, 2016
 Peer-review started: June 14, 2016
 First decision: July 11, 2016
 Revised: July 23, 2016
 Accepted: September 13, 2016
 Article in press: September 18, 2016
 Published online: November 26, 2016

Abstract

Retinal and optic nerve diseases are degenerative ocular pathologies which lead to irreversible visual loss. Since the advanced therapies availability, cell-based therapies offer a new all-encompassing approach. Advances in the knowledge of neuroprotection, immunomodulation and regenerative properties of mesenchymal stem cells (MSCs) have been obtained by several preclinical studies of various neurodegenerative diseases. It has provided the opportunity to perform the translation of this knowledge to prospective treatment approaches for clinical practice. Since 2008, several first steps projecting new treatment approaches, have been taken regarding the use of cell therapy in patients with neurodegenerative pathologies of optic nerve and retina. Most of the clinical trials using MSCs are in I / II phase, recruiting patients or ongoing, and they have as main objective the safety assessment of MSCs using various routes of administration. However, it is important to recognize that, there is still a long way to go to reach clinical trials phase III -IV. Hence, it is necessary to continue preclinical and clinical studies to improve this new therapeutic tool. This paper reviews the latest progress of MSCs in human clinical trials for retinal and

optic nerve diseases.

Key words: Mesenchymal stem cells; Cell therapy; Optic nerve diseases; Clinical trials; Retinal diseases

© The Author(s) 2016. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Core tip: Advances in the knowledge of neuroprotection, immunomodulation and regenerative properties of mesenchymal stem cells (MSCs) are contributed by several preclinical studies of various neurodegenerative diseases. It has provided opportunity to perform the translation of treatment approach to the clinical practice. Several clinical trials in patients with retinal and optic nerve diseases have been developed since 2008. Most of them using MSCs are in I / II phase. However, there is still a long way to go to reach clinical trials Phase III-IV. Hence, it is necessary to continue with preclinical and clinical studies to improve this new therapeutic tool.

Labrador-Velandia S, Alonso-Alonso ML, Alvarez-Sanchez S, González-Zamora J, Carretero-Barrio I, Pastor JC, Fernandez-Bueno I, Srivastava GK. Mesenchymal stem cell therapy in retinal and optic nerve diseases: An update of clinical trials. *World J Stem Cells* 2016; 8(11): 376-383 Available from: URL: <http://www.wjgnet.com/1948-0210/full/v8/i11/376.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.4252/wjsc.v8.i11.376>

INTRODUCTION

Retinal dystrophies, diabetic retinopathy, age related macular degeneration and optic nerve diseases are chronic and degenerative ocular pathologies which lead to irreversible visual loss. Retinal degeneration is a leading cause of incurable low vision and blindness worldwide^[1]. Most retinal and optic nerve diseases are caused by irreversible apoptosis of retinal neural cells or adjacent supporting tissue. Because there is no curative treatment for these degenerative diseases, current therapies mainly focus on the aetiology cause or at specific situations, such as late complications. However, most of them have low efficacy. Since the advanced therapies availability, cell-based therapies offer a new all-encompassing approach^[2].

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent and self-renewing stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, and other mesenchymal tissues, which can be induced to differentiate into bone marrow, cartilage, muscle, lipid, myocardial cells, glial cells and neurons^[3,4]. MSCs have some features that make them useful in cell therapy research. These are easy to isolate and expand rapidly after a short period of dormancy^[5]. They are free of ethical issues associated with the harvesting of embryonic stem cells^[6]. Also, it is considered that MSCs are "immunoprivileged" because they do not express Major Histocompatibility Complex class II (MHC-II) on

their surface, associated with transplant rejections^[7], and this advantage allows its use as an autologous or allogenic form^[8]. Furthermore, MSCs produce several growth factors with paracrine actions that are believed to modulate the microenvironment of diseased tissues, promote survival and activate endogenous repair mechanisms^[9].

Due to this features MSCs have been used in several preclinical studies of retinal and optic nerve diseases, where they have demonstrated their properties of immunomodulation, neuroprotection and tissue repair^[10-13]. These properties support the clinical use of MSCs as an opportunity for tissue repair and regeneration in several neurodegenerative disorders. To remember, the stages of clinical trials for drugs in development can be divided into four phases. The main purpose of the first clinical stage, phase I, is to observe the tolerance and pharmacokinetic characteristics of the drug in the human body and to provide evidence to establish the phase II administration protocol. The purpose of phase II clinical trials is to evaluate the efficacy and safety of the drug in patients with the target indication. In phase III, the efficacy and safety of the drug in patients with the target indication is further validated, providing the basis of the evidence used for review during the drug registration and application process. The phase IV clinical trial, which takes place during the post marketing period, provides further evidence regarding the drug's efficacy and any emerging adverse reactions under conditions of real-life use in large numbers of patients^[14].

In this review, we summarize the latest progress of MSCs in human clinical trials for retinal and optic nerve diseases.

TISSUE SOURCES OF MSCS

Bone marrow is the first isolation source of MSCs following by umbilical cord and adipose tissue^[15]. Although bone marrow is the best source of obtaining MSCs, there are some aspects that reduced their use: Limited growth rate, differentiation capability depending on the donor age, and risk inherited to sample collection^[15]. Regarding to umbilical cord source to obtain MSCs, it is required an optimal protocol such as, time of recollection and process less than 16 h, as well as, volume collection higher than 30 mL to get a success culture^[16]. MSCs obtaining by adipose tissue source have a similar morphology and phenotype to the bone marrow source, but these cells have a higher capability of proliferation and adipose tissue samples are easier to collect from liposuction procedures^[17].

CRYOPRESERVATION OF MSCS

Cryopreservation consists on the interruption of cellular metabolism regulated by processes of freezing and thawing, maintaining a good functional and structural cellular state. To preserve a biological sample as long as possible, without losing their properties, cells are immersed in liquid nitrogen at extremely low temperature

Labrador-Velandia S *et al.* Cell clinical trials in retinal diseases

(-196 °C), stopping the metabolic activity of the cells^[18].

Cryopreservation has been performed primarily for the purpose of preserving the hematopoietic stem cell populations for transplantation. Currently, the use of this procedure has been extended, allowing the preservation of the biological potential, and to retain the biological age at time of cryopreservation. In autologous patients, MSCs are collected and cryopreserved for later clinical use. In allogeneic patients, cryopreservation permits banking of cells for human leukocyte antigen typing and matching, facilitating the logistical transport of cellular products to transplant centers, and allowing enough time for the screening of transmissible diseases in the donated cells before transplantation^[19].

CLINICAL TRIALS USING MSCS

Today, there are ongoing clinical trials of advanced therapies' using MSCs in various retinal and optic nerve diseases. In these clinical trials the main route of administration is the intravitreal injection following by subretinal implant and then intravenous route. In all these studies it is used autologous stem cells from bone marrow or adipose tissue. On Table 1 it is shown all clinical trials finished and ongoing registered in clinicaltrials.gov and the International Clinical Trials Registry Platform, until today (Last search performed on 18 May 2016).

Clinical trials in retinal dystrophies: Retinitis pigmentosa and stargardt's disease

Retinitis pigmentosa (RP) includes some inherited diseases which are characterized by a classic pattern of difficulties in dark adaptation and night blindness in adolescence, loss of mid-peripheral visual field in young adulthood and central vision later in life due to the severe loss of rod and cone photoreceptors^[20]. The RP is one of the leading hereditary degenerative retinal diseases, affecting 1 in 4000 individuals^[20]. RP is characterized by the classic triad of decreased arteriolar diameter, pigment spicules deposits in the mid periphery of the retina and pallor of the papilla^[20].

Stargardt's disease (SD) is the most common form of inherited juvenile macular degenerations. Its prevalence worldwide is estimated to be 1 in 10000 individuals^[21]. Patients initially present with reduced central vision. The pathology is defined by the accumulation of lipofuscin in the apical zone of the RPE cells. The patients present decreased vision to legal blindness and secondary choroidal neovascularization, with bilateral gradual involvement of vision^[21].

There are nine clinical trials that use MSCs to treat this kind retinal dystrophies (6 for RP, 2 for SD and RP and 1 for RP and other diseases) (Table 1). Although most clinical trials are in recruitment phase, there are two completed to treat retinitis pigmentosa, both were held at Hospital das Clínicas (Medical school Ribeirão Preto, São Paulo) - (NCT01068561 phase I , NCT01560715 phase II). The cells used were autologous bone marrow-derived

MSCs, which were administered through intravitreal injection containing 10×10^6 cells/0.1 mL. The MSCs were obtained through aspiration of 10 mL bone marrow tissue from the posterior iliac crest and were separated by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation. Regarding to the clinical trial NCT01068561 (phase I), there is a case reported^[22]. The case is about one recruited patient of this study, who had macular oedema associated with RP, which showed complete resolution of the oedema 7 d after injection, and the effect remained for one month of follow-up with optical coherence tomography. They concluded that the adult stem cells can restore the blood ocular barrier due their paracrine effects or by osmotic gradient allowing the absorption of macular oedema^[22]. The trial NCT01560715 (phase II) is completed and also have published results^[23], they concluded that the therapy with intravitreal use MSC can improve the quality of life of patients with RP, although the improvement is lost with time. Patient's improvement has been evaluated with vision-related quality of life test (NEI VFG-25) before therapy and 3 and 12 mo later. There was a statistically significant improvement 3 mo after treatment, whereas by 12th month there was no significant difference from baseline^[23].

At the hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia (Spain), it is being carried out a phase I clinical trial with autologous bone marrow stem cells in patients with RP. This clinical trial continues recruiting patients. Regarding to the other clinical trials for RP and Stargardt's disease (NCT01531348, NCT017336059, NCT01914913, NCT02280135, NCT02709876 and NCT01518127), they are on phase I or I/II, and they are recruiting patients (Table 1).

Clinical trials in diabetic retinopathy and age macular degeneration

Diabetic retinopathy (DR) is a prevalent microvascular complication of diabetes, and remains the leading cause of preventable blindness in working-aged people (20-74 years)^[24]. About 30% all diabetics have signs of diabetic retinopathy, and 30% of these might have vision-threatening retinopathy, defined as severe retinopathy or macular edema^[25]. The current standard treatment for management of these disorders relies mainly on laser therapy, which is inherently destructive, or antiangiogenic therapy, both associated with unavoidable ocular/systemic side-effects^[25].

Age-related macular degeneration (AMD) is a progressive chronic disease of the central retina and a leading cause of vision loss worldwide, it accounts for 8% of all blindness worldwide and is the most common cause of blindness in developed countries^[26], particularly in people older than 60 years. Its prevalence is likely to increase as a consequence of exponential population ageing. There have been significant advances in the management of exudative AMD with the introduction of anti-angiogenesis therapy, and patients now have effective treatment options that can prevent blindness and, in many cases, restore vision^[27]. However antiangiogenic treatment doesn't stop the progression nor serves to treat dry AMD.

Table 1 Clinical trials for retinal and optic nerve diseases

Clinical trial	Condition	Cells	Route of administration	Dose	Estimated enrollment	Recruitment status	Study phase	Country	Start date
NCT01068561 ¹	Retinosis pigmentaria	ABMSC	Intravitreal injection	10 × 10 ⁶ cells/0.1 mL	5	Completed	I	Brazil	2010
NCT01531348	Retinosis pigmentaria	ABMMSC	Intravitreal injection	1 × 10 ⁶ cells/0.1 mL	10	Enrolling by invitation	I	Tailandia	2012
NCT01560715 ²	Retinosis pigmentaria	ABMSC	Intravitreal injection	10 × 10 ⁶ cells/0.1 mL	50	Recruiting	II	Brasil	2012
NCT01736059 ³	Retinosis pigmentaria, AMD, DR, VO	ABMSC	Intravitreal injection	3.4 × 10 ⁶ cells/0.1 mL	15	Enrolling by invitation	I	EEUU	2012
NCT01914913	Retinosis pigmentaria	ABMSC	-	-	15	Recruiting	I / II	India	2014
NCT02280135	Retinosis pigmentaria	ABMSC	Intravitreal injection	30 × 10 ⁶ cells/0.1 mL	10	Recruiting	I	Spain	2014
NCT02709876	Retinosis pigmentaria	ABMSC	Intravitreal injection	-	50	Recruiting	I / II	Arabia	2014
NCT01518127	Stargardt's disease and AMD	ABMSC	Intravitreal injection	10 × 10 ⁶ cells/0.1 mL	10	Recruiting	I / II	Brazil	2011
NCT01736059 ³	Stargardt's disease, AMD, DR, VO, RP	ABMSC	Intravitreal injection	3.4 × 10 ⁶ cells/0.1 mL	15	Recruiting	I	EEUU	2012
Carta al editor Act. Ophth ⁴	Diabetic retinopathy	ABMSC	Intravitreal injection	18 × 10 ⁷ cells/0.5 mL	1	Completed	I	Germany	2008
NCT01518842	Diabetic retinopathy	ABMSC	Intravitreal injection	2 × 10 ⁶ cells/0.1 mL	30	Unknown	I / II	Brasil	2011
IRCT201111291414N29	Diabetic retinopathy	ABMMSC	Intravenous	2 × 10 ⁶ cells/kg	20	Ongoing	I / II	Iran	2011
NCT01736059 ³	Diabetic retinopathy, VO, HRD	ABMSC	Intravitreal injection	3.4 × 10 ⁶ cells/0.1 mL	15	Recruiting	I	EEUU	2012
ChiCTR-ONC-16008055	Diabetic retinopathy	ASMSC	-	-	30	Recruiting	I / II	China	2013
NCT01518127	AMD, Stargardt's disease	ABMSC	Intravitreal injection	10 × 10 ⁶ cells/0.1 mL	10	Recruiting	I / II	Brasil	2011
NCT01736059 ³	AMD, DR, VO, HRD	ABMSC	Intravitreal injection	3.4 × 10 ⁶ cells/0.1 mL	15	Recruiting	I	EEUU	2012
NCT02016508	AMD	ABMSC	Intravitreal injection	-	1	Unknown	I / II	Egypt	2013
NCT02024269	AMD	AA5C	Intravitreal injection	-	-	Withdrawn	I	EEUU	2013
NCT00787722	Neuromielitis óptica	AH5C	Intravenous	-	10	Recruiting	I	EEUU	2008
NCT01364246	Neuromielitis óptica	UC-MSC	Intravenous	-	20	Unknown	I / II	China	2010
NCT01339455	Neuromielitis óptica	AH5C	Intravenous	-	3	Ongoing	I / II	Canada	2011
NCT02249676	Neuromielitis óptica	ABMMSC	Intravenous	2 × 10 ⁶ cells/kg	15	Recruiting	II	China	2014
NCT02638714	Optic nerve atrophy	AH5C	-	-	100	Ongoing	I / II	Jordania	2013
NCT01834079	Optic nerve atrophy	ABMSC	Intrathecal	10 × 10 ⁷ cells/dose	24	Recruiting	I / II	India	2014
ChiCTR-TRC-14005093	Traumatic optic neuropathy	UC-MSC	Endonasal	-	70	Recruiting	I / II	China	2014
NCT02330978	Glaucoma	ABMMSC	Intravitreal injection	1 × 10 ⁶ cells/0.1 mL	10	Recruiting	I	Brasil	2014
NCT02144103	Glaucoma	AA5C	Subtenon injection	0.5 mL	16	Enrolling by invitation	I	Russia	2014
NCT01920867 ⁵	Retinal diseases, Macular degeneration, HRD, OND, glaucoma	ABMSC	Retrobulbar, subtenon, intravenous, intravitreal and intraocular injection	1.2 × 10 ¹⁷ cells/15 mL	300	Recruiting	I	Estados Unidos	2013

Last search performed in Clinicaltrials.gov and the International Clinical Trials Registry Platform, 18 May 2016. ¹Case reported^[21]; ²Case reported^[22]; ³Case reported^[23]; ⁴Case reported^[24]; ⁵Case reported^[25,26]. ABMSC: Autologous bone-marrow stem cells; ABMMSC: Autologous bone-marrow mesenchymal stem cells; ASMSC: Autologous stromal mesenchymal stem cells; AA5C: Autologous adipose stem cells; AH5C: Autologous hematopoietic stem cells; UC-MSC: Umbilical cord mesenchymal stem cells; AMD: Age-related macular degeneration; DR: Diabetic retinopathy; HRD: Hereditary retinal diseases; OND: Optic nerve diseases; RP: Retinitis pigmentosa; VO: Vein occlusions.

Thus, new approaches like stem cell therapy are needed.

The use of bone marrow derived stem cells (BMDSC) therapy for the DR has been evaluated^[28,29] and there are five ongoing clinical trials (NCT01518842,

IRCT 201111291414N29, NCT01736059, ChiCTR-ONC-16008055 and NCT01920867) (Table 1). In relation to this therapy for the AMD, it has been evaluated in four (4) ongoing clinical trials (NCT02016508, NCT01

Labrador-Velandia S *et al.* Cell clinical trials in retinal diseases

920867, NCT01736059 y NCT01518127). One of them (NCT01736059) has published results in the AMD patients³⁰¹. Bone marrow stem cells used in these clinical trials was harvested from the patient's own iliac crest (autologous use) with an average final volume of 50 mL (20-100 mL). Then, mononuclear cells were separated by Ficoll-gradient centrifugation. The dose of cells is between 2×10^4 - 1.8×10^6 suspended in 0.1 mL buffered saline solution. A trial using adipose derived stems cells (ADSC) has been withdrawn prior to enrollment (NCT02024269), however they don't explain the reasons.

Results of stem cell-treatment for the DR are limited to the report on two patients. A 43-year-old patient with very advanced atrophy of the retina and optic nerve caused by the DR and vision limited to defective light perception, after cell treatment patient have improvement but no signs of any side-effects, such as inflammation or infection²⁹¹. The other reports a patient with macular oedema associated with macular ischemia, and describe the decrease of macular oedema and the improvement of retinal function after intravitreal injection of BMDSC²⁹¹.

Moreover, the only clinical results of MSCs therapy for the AMD³⁰¹ describes two patients who start from a visual acuity (VA) of 20/200. After intravitreal injection, they had an improvement with its new VA of 20/80 and 20/160. The patient with VA 20/80 kept it during first six months and the other patient with VA 20/160 worsened to its initial state of 20/200. A slight growth of extrafoveal geographic atrophy in both eyes of both patients was detected by fluorescein angiography. The results of electroretinography showed a slight worsening of the macular function of both eyes that could be attributed to the disease progression. In analysis by OCT hyperdense deposits were evident within the retinal layers after a month of therapy that correspond in size with CD34⁺ cells, however, more studies are needed to prove whether it corresponds to intraretinal incorporation of CD34⁺ cells. The results suggest that this cell therapy in patients with the AMD, especially in advanced stages, would not stop the progression³⁰¹.

Clinical trials of MSCs for optic neuropathies

Optic neuropathies are characterized by damage to the optic nerve and they can be due to various causes, such as glaucoma, autoimmune diseases, inflammation, infections, traumas, ischemia or compression. Glaucoma is the most common cause of optic nerve-related visual loss in adults, followed by nonarteritic anterior ischaemic optic neuropathy (NAION)³¹¹. The treatment for glaucoma is based on drugs and surgery that reduce intraocular pressure, whereas there is no treatment for NAION, nor to reverse the process nor for its recurrence³²¹. Traumatic optic neuropathy is a cause of severe visual loss and it has no reliable treatment³³¹. Neuromyelitis optica, also known as Devic's disease, is an autoimmune, demyelinating disorder which causes optic neuritis. Its prevalence is about 1-3/100000³⁴¹. Nowadays neuromyelitis optica treatment is based in corticosteroids and plasma exchange

for the acute attacks and immunosuppressant drugs for the maintenance therapy³⁵¹.

Currently, there are two clinical trials at phase I using MSCs to treat glaucoma (NCT02330978 and NCT02144103), both of them are recruiting patients at the moment. One of them is being held at Medical School Ribeirao Preto, University of São Paulo, Brazil (NCT02330978), and the other one in Bumasyan Federal Medical Biophysical Center, Russia (NCT02144103). The Brazilian one uses an intravitreal injection of 10^6 autologous bone marrow derived mesenchymal stem cells (BMSCs) to assess the safety of the procedure and how it improves visual field and visual acuity. The Russian one uses a sub Tenon administration of autologous adipose-derived regenerative cells that have been extracted from the patient's front abdominal wall. There are still no published results of these studies.

In the SCOTS clinical trial (NCT01920867), held at the Johns Hopkins Hospital, United States, there is one case reported of autoimmune optic neuropathy³⁶¹. They made a vitrectomy and intra-optic injection of autologous bone marrow stem cells (BMSCs) in one patient's eye and retrobulbar, sub Tenon and intravitreal injection in the other eye, improving the visual acuity, macular thickness and fast retinal nerve fiber layer thickness. In this clinical trial there is also a case reported of idiopathic bilateral optic neuritis³⁷¹. The patient received a retrobulbar injection, sub Tenon injection and intravitreal injection of autologous BMSCs for the right eye (OD), and vitrectomy and direct intra-optic nerve injection of autologous BMSCs for the left eye (OS), followed by intravenous infusion. After this procedure, there was an improvement in visual acuity in both eyes and remained stable at the 12 mo post-operative³⁷¹.

For neuromyelitis optica there is one active clinical trial at Foothills Medical Centre, University of Calgary, Canada (NCT01339455), two recruiting patients at Northwestern University, United States (NCT00787722), one ongoing clinical trial in Tianjin Medical University General Hospital, China (NCT02249676), and one with unknown status at Nanjing University Medical College Affiliated Drum Tower Hospital, China (NCT01364246). Most of them, active and recruiting clinical trials, use immunosuppressive treatment followed by an autologous hematopoietic stem cells transplantation. While the Nanjing University uses human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation. In this clinical trial (NCT01364246), 5 patients were followed for 18 mo including evaluation of Expanded Disability Status Scale (EDSS) levels, clinical course, magnetic resonance imaging (MRI) characteristics and adverse events. and they reported an improvement in the symptoms and signs of neuromyelitis optica in four out of five patients treated³⁸¹. There is another clinical trial for secondary progressive multiple sclerosis with evidence of optic nerve involvement (NCT00395200), in which patients were treated with autologous bone marrow stem cells transplantation and that resulted in an increase in visual acuity, visual evoked response latency, and optic nerve

area^[39]. Some individual cases with neuromyelitis optica treated with allogeneic hematopoietic stem cells have been reported^[40].

Traumatic optic neuropathy is being studied in a clinical trial in China, by the Cell Biotherapy Center, Daping Hospital, Third Military Medical University (ChiCTR-TRC-14005093). Currently, they are recruiting patients and will use human umbilical cord derived mesenchymal stem cells transplantation. There are still no results.

There are also clinical trials for optic neuropathies, without considering what caused it. One of them is currently active (NCT02638714) and is held by Stem Cells of Arabia, Jordan. The patients will be treated with a transplantation of purified adult autologous bone marrow derived CD34⁺, CD133⁺, and CD271⁺ stem cells due to their diverse potentialities to differentiate into specific functional cell types to regenerate damaged optic nerves, supporting tissues and vasculature. They will use clinical-grade purification system (CliniMACS) and Microbeads to purify the target cell populations. There is another clinical trial on optic atrophy, currently recruiting patients (NCT01834079) in Chaitanya Hospital in Pune, India. Patients will receive three intrathecal injections of 100 million autologous bone marrow derived mononuclear cells per dose at intervals of 7 d. There are no results posted yet of these studies.

DISCUSSION

Advances in the knowledge of neuroprotective, immunomodulative and regenerative properties of MSCs are continuously generated by several preclinical studies *in vitro* and *in vivo* in animal models of various neurodegenerative diseases, including optic nerve and retinal diseases. It has given the opportunity to perform the translation of treatment approaches to the clinical practice. Since 2008, several first steps, projecting new treatment approaches, have been taken regarding the use of cell therapy in patients with neurodegenerative pathologies of optic nerve and retina. It is about Phase I or I / II clinical trials, which have as main objective the safety assessment of MSCs using various routes of administration, where the main route used is the intravitreal injection.

Nevertheless, of the 24 clinical trials registered on clinicaltrials.gov, there are only 2 clinical trials finished, 3 are ongoing, 15 are in recruiting patients phase, 3 are in unknown state and 1 clinical trial has been withdrawn without knowing the reasons for this decision. Most of the results published to date, are reduced to 6 cases reported in various retinal/optic nerve pathologies, their number of patients is very low, and these are exceptional cases, so, there is not enough evidence to get any valid and scientific conclusion.

Furthermore, most of these clinical trials use autologous cells, obtaining by bone marrow aspirates, so the final content to be administered is a concentrate of mononuclear cells, containing a very small percentage of MSCs (0.1%)^[15], only four clinical trials use a specific concentration of MSCs without added another cell

type. It is surprising that, although MSCs derived from adipose tissue are easier to obtain and in a higher concentration^[17], there are only 2 clinical trials using this cell type, and one of them has been withdrawn without explanation. Regarding the use of allogenic MSCs, is limited to 2 clinical trials, which use MSCs derived from umbilical cord, however, it is not known whether their patients will receive immunosuppressive therapy.

Regarding to cell dose used in various clinical trials, there is a great variation from one to another. There is no consensus regarding the calculation of cell dose for the use of these cells through intravitreal injection. The clinical trials which use mononuclear cells aspirate, the doses are usually high (between 3×10^6 cells/0.1 mL and 30×10^6 cells/0.1 mL), whereas clinical trials using a concentrated purified of MSCs, doses are lower (1×10^6 cells/0.1 mL). However, the information collected by clinical trials.gov and the International Clinical Trials Registry Platform not specify the cell dose calculation or the cell production process.

CONCLUSION

It is important to know the development of cell therapy in relation to its use in the clinical practice. However, it is also important to recognize that, there is still a long way to go to reach clinical trials phase III-IV. One of the factors necessary to move forward is to establish unified criteria for the dose to be used, another important factor is the use of only MSCs without another cells added, because MSCs are immunoprivileged cells, and do not produce rejection. It is also important to use more frequently allogeneic MSC associated with cryopreservation processes. It can be the key to a better bioavailability of these cells, getting greater advantages of MSCs derived from adipose tissue, which are easier in obtaining and production. Therefore, it is necessary to continue preclinical and clinical studies to improve this new therapeutic tool.

Limitations

Most of the clinical trials using MSCs are in I / II phase, recruiting patients or ongoing. The information available in clinicaltrials.gov about the procedure obtaining cells or the dose used in each clinical trial is not described in all cases. Hence, there are not enough published results to have scientific evidence about the use of these cells in retinal and optic nerve diseases.

REFERENCES

- 1 Bunce C, Wormald R. Leading causes of certification for blindness and partial sight in England & Wales. *BMC Public Health* 2006; 6: 58 [PMID: 16524463 DOI: 10.1186/1471-2458-6-58]
- 2 Lamba DA, Karl MO, Reh TA. Strategies for retinal repair: cell replacement and regeneration. *Prog Brain Res* 2009; 175: 23-31 [PMID: 19660646 DOI: 10.1016/S0079-6123(09)17502-7]
- 3 Bahat-Stroomza M, Barhum Y, Levy YS, Karpov O, Bulvik S, Melamed E, Offen D. Induction of adult human bone marrow mesenchymal stromal cells into functional astrocyte-like cells: potential for restorative treatment in Parkinson's disease. *J Mol*

Labrador-Velandia S *et al.* Cell clinical trials in retinal diseases

- Neurosci* 2009; 39: 199-210 [PMID: 19127447 DOI: 10.1007/s12031-008-9166-3]
- 4 Phinney DG, Isakova I. Plasticity and therapeutic potential of mesenchymal stem cells in the nervous system. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 1255-1265 [PMID: 15853682]
 - 5 Xu W, Xu GX. Mesenchymal stem cells for retinal diseases. *Int J Ophthalmol* 2011; 4: 413-21 [PMID: 22553693 DOI: 10.3980/j.issn.2222-3959.2011.04.19]
 - 6 McLaren A. Ethical and social considerations of stem cell research. *Nature* 2001; 414: 129-131 [PMID: 11689959 DOI: 10.1038/35102194]
 - 7 Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007; 110: 3499-3506 [PMID: 17664353 DOI: 10.1182/blood-2007-02-069716]
 - 8 Vega A, Martín-Ferrero MA, Del Canto F, Alberca M, García V, Munar A, Orozco L, Soler R, Fuentes JJ, Huguet M, Sánchez A, García-Sancho J. Treatment of Knee Osteoarthritis With Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: A Randomized Controlled Trial. *Transplantation* 2015; 99: 1681-1690 [PMID: 25822648 DOI: 10.1097/TP.0000000000000678]
 - 9 Ng TK, Fortino VR, Pelaez D, Cheung HS. Progress of mesenchymal stem cell therapy for neural and retinal diseases. *World J Stem Cells* 2014; 6: 111-119 [PMID: 24772238 DOI: 10.4252/wjsc.v6.i2.111]
 - 10 Johnson TV, Bull ND, Hunt DP, Marina N, Tomarev SI, Martin KR. Neuroprotective effects of intravitreal mesenchymal stem cell transplantation in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51: 2051-2059 [PMID: 19933193 DOI: 10.1167/iov.09-4509]
 - 11 Li N, Li XR, Yuan JQ. Effects of bone-marrow mesenchymal stem cells transplanted into vitreous cavity of rat injured by ischemia/reperfusion. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009; 247: 503-514 [PMID: 19084985 DOI: 10.1007/s00417-008-1009-y]
 - 12 Otani A, Dorrell MI, Kinder K, Moreno SK, Nusinowitz S, Banin E, Heckenlively J, Friedlander M. Rescue of retinal degeneration by intravitreally injected adult bone marrow-derived lineage-negative hematopoietic stem cells. *J Clin Invest* 2004; 114: 765-774 [PMID: 15372100 DOI: 10.1172/JCI21686]
 - 13 Zhang Y, Wang W. Effects of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on light-damaged retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51: 3742-3748 [PMID: 20207980 DOI: 10.1167/iov.08-3314]
 - 14 Huang JH, Su QM, Yang J, Lv YH, He YC, Chen JC, Xu L, Wang K, Zheng QS. Sample sizes in dosage investigational clinical trials: a systematic evaluation. *Drug Des Devel Ther* 2015; 9: 305-312 [PMID: 25609916 DOI: 10.2147/DDDT.S76135]
 - 15 Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 2003; 121: 368-74 [PMID: 12694261]
 - 16 Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004; 22: 625-634 [PMID: 15277708 DOI: 10.1634/stemcells.22-4-625]
 - 17 Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006; 24: 1294-1301 [PMID: 16410387 DOI: 10.1634/stemcells.2005-0342]
 - 18 Woods EJ, Perry BC, Hockema JJ, Larson L, Zhou D, Goebel WS. Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. *Cryobiology* 2009; 59: 150-157 [PMID: 19538953 DOI: 10.1016/j.cryobiol.2009.06.005]
 - 19 Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A, McGann LE, Elliott JA. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology* 2015; 71: 181-197 [PMID: 26186998 DOI: 10.1016/j.cryobiol.2015.07.003]
 - 20 Hartong DT, Berson EL, Drjya TP. Retinitis pigmentosa. *Lancet* 2006; 368: 1795-1809 [PMID: 17113430 DOI: 10.1016/S0140-6736(06)69740-7]
 - 21 Bither PP, Bems LA. Stargardt's disease: a review of the literature. *J Am Optom Assoc* 1988; 59: 106-111 [PMID: 3283201]
 - 22 Siqueira RC, Messias A, Voltarelli JC, Messias K, Arcieri RS, Jorge R. Resolution of macular oedema associated with retinitis pigmentosa after intravitreal use of autologous BM-derived hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2013; 48: 612-613 [PMID: 23000646 DOI: 10.1038/bmt.2012.185]
 - 23 Siqueira RC, Messias A, Messias K, Arcieri RS, Ruiz MA, Souza NF, Martins LC, Jorge R. Quality of life in patients with retinitis pigmentosa submitted to intravitreal use of bone marrow-derived stem cells (Reticell-clinical trial). *Stem Cell Res Ther* 2015; 6: 29 [PMID: 25890251 DOI: 10.1186/s13287-015-0020-6]
 - 24 Collaboration NCDRF. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet* 2016; 387: 1513-1530 [PMID: 27061677 DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00618-8]
 - 25 Saaddine JB, Honeycutt AA, Narayan KM, Zhang X, Klein R, Boyle JP. Projection of diabetic retinopathy and other major eye diseases among people with diabetes mellitus: United States, 2005-2050. *Arch Ophthalmol* 2008; 126: 1740-1747 [PMID: 19064858 DOI: 10.1001/archophth.126.12.1740]
 - 26 Wong WL, Su X, Li X, Cheung CM, Klein R, Cheng CY, Wong TY. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health* 2014; 2: e106-e116 [PMID: 25104651 DOI: 10.1016/S2214-109X(13)70145-1]
 - 27 Wong TY, Liew G, Mitchell P. Clinical update: new treatments for age-related macular degeneration. *Lancet* 2007; 370: 204-206 [PMID: 17658379 DOI: 10.1016/S0140-6736(07)61104-0]
 - 28 Jonas JB, Witzens-Harig M, Arseniev L, Ho AD. Intravitreal autologous bone marrow-derived mononuclear cell transplantation: a feasibility report. *Acta Ophthalmol* 2008; 86: 225-226 [PMID: 17900263 DOI: 10.1111/j.1600-0420.2007.00987.x]
 - 29 Siqueira RC, Messias A, Gurgel VP, Simões BP, Scott IU, Jorge R. Improvement of ischaemic macular oedema after intravitreal injection of autologous bone marrow-derived hematopoietic stem cells. *Acta Ophthalmol* 2015; 93: e174-e176 [PMID: 24954079 DOI: 10.1111/aos.12473]
 - 30 Park SS, Bauer G, Abedi M, Pontow S, Panorgias A, Jonnal R, Zawadzki RJ, Werner JS, Nolta J. Intravitreal autologous bone marrow CD34+ cell therapy for ischemic and degenerative retinal disorders: preliminary phase 1 clinical trial findings. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; 56: 81-89 [PMID: 25491299 DOI: 10.1167/iov.14-15415]
 - 31 Miller NR, Arnold AC. Current concepts in the diagnosis, pathogenesis and management of nonarteritic anterior ischaemic optic neuropathy. *Eye (Lond)* 2015; 29: 65-79 [PMID: 24993324 DOI: 10.1038/eye.2014.144]
 - 32 Katz DM, Trobe JD. Is there treatment for nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy. *Curr Opin Ophthalmol* 2015; 26: 458-463 [PMID: 26367094 DOI: 10.1097/ICU.0000000000000199]
 - 33 Chaon BC, Lee MS. Is there treatment for traumatic optic neuropathy? *Curr Opin Ophthalmol* 2015; 26: 445-449 [PMID: 26448040 DOI: 10.1097/ICU.0000000000000198]
 - 34 Wingerchuk DM. Neuromyelitis optica spectrum disorders. *Continuum (Minneapolis)* 2010; 16: 105-121 [PMID: 22810601 DOI: 10.1212/01.CON.0000389937.69413.15]
 - 35 Jasiak-Zatonska M, Kalinowska-Lyszczarz A, Michalak S, Kozubski W. The Immunology of Neuromyelitis Optica-Current Knowledge, Clinical Implications, Controversies and Future Perspectives. *Int J Mol Sci* 2016; 17: 273 [PMID: 26950113 DOI: 10.3390/ijms17030273]
 - 36 Weiss JN, Levy S, Benes SC. Stem Cell Ophthalmology Treatment Study (SCOTS) for retinal and optic nerve diseases: a case report of improvement in relapsing auto-immune optic neuropathy. *Neural Regen Res* 2015; 10: 1507-1515 [PMID: 26604914 DOI: 10.4103/1673-5374.165525]
 - 37 Weiss JN, Levy S, Malkin A. Stem Cell Ophthalmology Treatment Study (SCOTS) for retinal and optic nerve diseases: a preliminary report. *Neural Regen Res* 2015; 10: 982-988 [PMID: 26199618 DOI: 10.4103/1673-5374.158365]
 - 38 Lu Z, Ye D, Qian L, Zhu L, Wang C, Guan D, Zhang X, Xu Y. Human umbilical cord mesenchymal stem cell therapy on neuromyelitis optica. *Curr Neurovasc Res* 2012; 9: 250-255 [PMID: 22873728]

- 39 Connick P, Kolappan M, Crawley C, Webber DJ, Patani R, Michell AW, Du MQ, Luan SL, Altmann DR, Thompson AJ, Compston A, Scott MA, Miller DH, Chandran S. Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study. *Lancet Neurol* 2012; 11: 150-156 [PMID: 22236384 DOI: 10.1016/S1474-4422(11)70305-2]
- 40 Greco R, Bondanza A, Vago L, Moiola L, Rossi P, Furlan R, Martino G, Radaelli M, Martinelli V, Carbone MR, Lupo Stanghellini MT, Assanelli A, Bernardi M, Corti C, Peccatori J, Bonini C, Vezzulli P, Falini A, Ciceri F, Comi G. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for neuromyelitis optica. *Ann Neurol* 2014; 75: 447-453 [PMID: 24318127 DOI: 10.1002/ana.24079]

P- Reviewer: Hong YJ, Nowak MS, Peng SM, Shih YF
S- Editor: Qiu S L- Editor: A E- Editor: Lu YJ

