



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

**INSTITUTO UNIVERSITARIO DE OFTALMOBIOLOGÍA APLICADA
(IOBA)**

TESIS DOCTORAL

**Células madre mesenquimales de tejido adiposo como
tratamiento de la superficie ocular en la deficiencia de
células madre limbares**

**“Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to
treat ocular surface failure due to limbal stem cell
deficiency”**

Presentada por SARA GALINDO DE LA ROSA para optar al grado de
doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por

Dra. MARGARITA CALONGE CANO, Dr. JOSÉ MARÍA HERRERAS
CANTALAPIEDRA y Dra. TERESA NIETO MIGUEL

2015



Universidad de Valladolid

Impreso 2T

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

(Art. 2.1. c de la Normativa para la presentación y defensa de la Tesis Doctoral en la UVa)

Dña. Margarita Calonge Cano, con D.N.I. nº 09255952-Q, Profesora del Departamento de Cirugía, Oftalmología, Otorrinolaringología y Fisioterapia (Área Oftalmología) de la Facultad de Medicina y Directora del Grupo de Superficie Ocular del Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), cuyo correo electrónico es calonge@ioba.med.uva.es; D. José María Herreras Cantalapiedra, con D.N.I. nº 9271358-N, Profesor del Departamento de Cirugía, Oftalmología, Otorrinolaringología y Fisioterapia (Área Oftalmología) de la Facultad de Medicina, cuyo correo electrónico es herreras@ioba.med.uva.es; y Dña. Teresa Nieto Miguel, con D.N.I. nº 12408016-E, Investigadora del Grupo de Superficie Ocular del IOBA, cuyo correo electrónico es tniptom@ioba.med.uva.es, como Directores de la Tesis Doctoral titulada: "Células madre mesenquimales de tejido adiposo como tratamiento de la superficie ocular en la deficiencia de células madre limbares / *Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to treat ocular surface failure due to limbal stem cell deficiency*" presentada por Dña. Sara Galindo de la Rosa alumna del programa de Doctorado en Ciencias de la Visión, impartido por el IOBA, autorizan la presentación de la misma, considerando que ES APTA para su defensa.

Valladolid, 1 de octubre de 2015

Los Directores de la Tesis,

Fdo.:

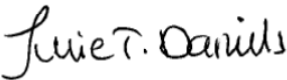
Dra. Margarita Calonge

Dr. José María Herreras

Dra. Teresa Nieto

SRA. PRESIDENTA DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO

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

1. Becario/ Applicant:	
Nombre y apellidos/ Name: Sara Galindo de la Rosa	
D.N.I./ National identity Card: 12388804S	
Centro de aplicación de la beca/ Home Institución: Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA)	
2. Centro en el que se ha realizado la estancia/ Host institution:	
Nombre/ Name: Institute of Ophthalmology, University College London (UCL)	
Dirección/ Address: 11-43 Bath Street EC1 9EL	
Localidad/ Country: London	
3. Investigador responsable en el centro de la estancia/ Responsible person in the Host	
Institución/ Institution: Department of Ocular Biology and Therapeutics, Institute of Ophthalmology (UCL)	
Nombre/ Name: Julie Daniels	
Cargo/ Post: Professor	
CERTIFICO: que el becario arriba mencionado ha realizado una estancia en este centro en las siguientes fechas: desde <u>10</u> / <u>09</u> / <u>2012</u> hasta <u>08</u> / <u>12</u> / <u>2012</u>	
THIS IS TO CERTIFY: that the above mentioned person has performed a stay in this Institution in the following dates: From: <u>10</u> / <u>09</u> / <u>2012</u> To: <u>08</u> / <u>12</u> / <u>2012</u>	
Lugar y fecha: London, 8th December 2012 City and date:	
Firma y Sello/ Signature & Stamp	Institute of Ophthalmology University College London Bath Street, London EC1V 9EL
	

ÍNDICE / INDEX

ABREVIATURAS / <i>ABBREVIATIONS</i>	I
FINANCIACIÓN / <i>FUNDING</i>	V
DIVULGACIÓN CIENTÍFICA / <i>SCIENTIFIC CONTRIBUTIONS</i>	IX
RESUMEN	XIII
ORGANIZACIÓN	XIV
INTRODUCCIÓN	3
1. Concepto de superficie ocular	3
1.1. La córnea	3
1.2. El limbo esclerocorneal	7
1.3. La conjuntiva	11
2. Síndrome de insuficiencia límbica (SIL)	13
2.1. Causas	13
2.2. Signos y síntomas	14
2.3. Diagnóstico	14
2.4. Tratamiento	16
2.5. Limitaciones del trasplante de células epiteliales limbares cultivadas <i>in vitro</i>	19
2.6. Modelos experimentales de SIL	20
3. Terapia celular	22
3.1. Células madre	22
JUSTIFICACIÓN.....	37
HIPÓTESIS	41
OBJETIVOS	41
MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
1. Aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales de tejido adiposo humano (hAT-MSCs)	45
2. Cultivo de la línea celular de epitelio corneal humano	47
3. Aislamiento y cultivo de fibroblastos limbares humanos	48

ÍNDICE / INDEX

4.	Análisis de la viabilidad y del ciclo celular de las hAT-MSCs	49
4.1.	Análisis de la viabilidad celular	50
4.2.	Análisis del ciclo celular	51
5.	Caracterización de las hAT-MSCs	51
5.1.	Análisis inmunofenotípico	51
5.2.	Diferenciación multilinaje	52
6.	Inducción de la diferenciación de las hAT-MSCs a células epiteliales corneales	55
6.1.	Condicionamiento de medios de cultivo	55
6.2.	Recubrimiento de placas de cultivo con colágeno IV	56
6.3.	Cultivo de las hAT-MSCs en condiciones de inducción de la diferenciación	56
7.	Análisis de la expresión génica mediante reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real con transcripción reversa (RT-PCR)	56
7.1.	Procesamiento de las muestras	56
7.2.	Extracción, homogeneización y purificación del ARN	57
7.3.	Cuantificación del ARN	57
7.4.	Síntesis del ADN complementario (ADNc): retrotranscripción	58
7.5.	Amplificación y cuantificación de la expresión génica relativa mediante PCR a tiempo real	58
8.	Análisis de la expresión proteica mediante <i>western-blotting</i>	62
8.1.	Extracción de proteínas	62
8.2.	Cuantificación de proteínas	62
8.3.	Electroforesis y <i>western-blotting</i>	62
9.	Análisis de la expresión proteica mediante inmunofluorescencia	63
9.1.	Procesamiento de las muestras	63
9.2.	Inmunofluorescencia	65
10.	Marcaje de las hAT-MSCs con 5-bromo-2-deoxiuridina	66
11.	Cultivo de las hAT-MSCs sobre membrana amniótica (MA)	67
12.	Modelo de daño corneal por causticación en ojos de cerdo <i>ex vivo</i>	67

12.1. Trasplante de MA con diferentes dosis de hAT-MSCs sobre el modelo <i>ex vivo</i> de daño corneal por causticación	68
13. Desarrollo de un modelo experimental de fracaso de la superficie ocular por SIL	70
13.1. Desarrollo de un modelo de SIL total en cerdo	70
13.2. Desarrollo de un modelo de SIL parcial y otro de SIL total en conejo	71
14. Evaluación de los signos clínicos en los modelos animales	72
14.1. Evaluación y seguimiento del modelo porcino de SIL	72
14.2. Evaluación y seguimiento del modelo de SIL parcial en conejo	73
14.3. Evaluación y seguimiento del modelo de SIL total en conejo	74
15. Trasplante de MA con o sin hAT-MSCs sobre la superficie ocular de los modelos animales	76
15.1. Trasplante en el modelo porcino de SIL	76
15.2. Trasplante en los modelos de SIL en conejo	76
16. Procesamiento de citologías de impresión corneal	77
17. Microscopía láser confocal en ojos de cerdo <i>ex vivo</i>	78
18. Estudio histopatológico	78
19. Análisis estadístico	80
RESULTADOS	85
1. Caracterización de la población celular estromal aislada a partir de los lipoaspirados	85
2. Caracterización de la línea celular de epitelio corneal humano y de los fibroblastos limbares humanos	89
3. Efecto de las condiciones de inducción de la diferenciación hacia epitelio corneal sobre las hAT-MSCs	90
3.1. Efecto en la morfología, la complejidad, la viabilidad y el ciclo celular	90
3.2. Efecto en el inmunofenotipo	92
3.3. Efecto en la expresión génica y proteica de marcadores de epitelio corneal diferenciado	93
4. Estudio de dosis celulares en el modelo <i>ex vivo</i> de daño corneal por causticación	97

ÍNDICE / INDEX

4.1. Estudios realizados levantando la MA	98
4.2. Estudios realizados sin levantar la MA	105
5. Modelo de SIL total en cerdo	108
5.1. Evolución clínica del modelo	108
5.2. Trasplante de MA	109
5.2. Estudio de la superficie ocular mediante microscopía laser confocal <i>in vivo</i>	110
5.4. Estudio histopatológico	113
6. Modelo de SIL parcial en conejo	115
6.1. Evolución clínica del modelo	115
6.2. Trasplante de MA	117
6.3. Trasplante de hAT-MSCs	120
6.4. Estudio histopatológico	122
6.5. Localización de las hAT-MSCs	123
6.6. Estudio fenotípico	124
7. Modelo de SIL total en conejo	133
7.1. Evolución clínica del modelo	133
7.2. Trasplante de hAT-MSCs	137
7.3. Estudio histopatológico	140
7.4. Localización de las hAT-MSCs	141
7.5. Estudio fenotípico	142
DISCUSIÓN	159
Estudios <i>in vitro</i>	155
Estudios <i>ex vivo</i>	159
Estudios <i>in vivo</i>	166
CONCLUSIONES	193
LIMITACIONES DEL TRABAJO.....	191
FUTURAS INVESTIGACIONES	192

ENGLISH SUMMARY

INTRODUCTION AND JUSTIFICATION	201
HYPOTHESIS.....	199
OBJECTIVES.....	199
METHODOLOGY.....	201
1. Isolation and expansion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (hAT-MSCs)	201
2. Immunophenotypic analysis	201
3. <i>In vitro</i> multilineage differentiation	202
4. Isolation and expansion of human limbal fibroblasts	202
5. Conditioning of culture media and coating of tissue culture plates with collagen IV	203
6. RNA isolation and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)	204
7. Western-blotting	204
8. Immunofluorescence	205
9. hAT-MSCs culture onto amniotic membrane (AM)	206
10. <i>Ex vivo</i> corneal wound model	206
11. Animal models of limbal stem cell deficiency (LSCD)	207
12. Clinical evaluation	208
13. Corneal impression cytologies and laser scanning confocal microscopy	208
14. Histopathology analysis	208
15. Statistical analysis	209
RESULTS.....	210
1. Characterization of undifferentiated hAT-MSCs	210
2. Effect of differentiation-inducing conditions on hAT-MSCs morphology, viability, and cell cycle	210
3. Effect of differentiation-inducing conditions on hAT-MSCs immunophenotype	212
4. Gene and protein expression analysis of corneal epithelial markers	213

ÍNDICE / INDEX

5. Cell dose study in the <i>ex vivo</i> corneal wound model	216
5.1. Studies performed lifting the AM	217
5.2. Studies performed without lifting the AM	217
6. Total LSCD porcine model	219
7. Partial LSCD model in rabbit	220
7.1. Clinical course of the model	220
7.2. Transplantation of AM	221
7.3. Transplantation of hAT-MSCs	222
7.4. Histopathology analysis	224
7.5. hAT-MSCs location	225
7.6. Phenotypic analysis	226
8. Total LSCD model in rabbit	227
8.1. Clinical course of the model	227
8.2. Transplantation of hAT-MSCs	228
8.3. Histopathology analysis	230
8.4. hAT-MSCs location	231
8.5. Phenotypic analysis	232
DISCUSSION	233
<i>In vitro</i> studies	233
<i>Ex vivo</i> studies	237
<i>In vivo</i> studies	238
CONCLUSIONS	245
REFERENCIAS / REFERENCES	247
ANEXO - MATERIALES / ANNEX - MATERIALS	261

ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS

A lo largo de la presente memoria de tesis doctoral se han utilizado diferentes abreviaturas. Aún sabiendo que en las figuras y tablas de un manuscrito científico no deben emplearse abreviaturas, en este trabajo se han utilizado con el fin de evitar repeticiones excesivas. Todas las abreviaturas empleadas se encuentran descritas en esta sección:

ABCG2	Proteína de membrana transportadora de ATP, ABCG2	<i>ATP binding cassette sub-family G member 2</i>
ADN / DNA	Ácido desoxirribonucleico	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
ARNm / mRNA	Ácido ribonucleico mensajero	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
AT-MSCs	Células madre mesenquimales de tejido adiposo	<i>Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells</i>
BCA	Ácido bicinconínico	<i>Bicinchoninic acid</i>
BM-MSCs	Células madre mesenquimales de médula ósea	<i>Bone marrow-derived mesenchymal stem cells</i>
BMP	Proteína morfogenética ósea	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BrdU	5-bromo-2'-deoxiuridina	<i>5-bromo-2'-deoxyuridine</i>
CD	Grupo de diferenciación	<i>Cluster of differentiation</i>
CK	Citoqueratina	<i>Cytokeratin</i>
CXCL12 / SDF-1	Quimiocina C-X-C ligando 12 / Factor derivado del estroma 1	<i>C-X-C motif chemokine ligand 12 / Stromal cell-derived factor 1</i>
CXCR4	Receptor de quimiocina C-X-C tipo 4	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	Factor de crecimiento epidérmico	<i>Epidermal growth factor</i>

ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS

FBS	Suero fetal bovino	<i>Fetal bovine serum</i>
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos	<i>Fibroblast growth factor</i>
FL / LF	Fibroblastos limbares	<i>Limbal fibroblasts</i>
FLcMB / LFcBM	Medio base condicionado con fibroblastos limbares	<i>Limbal fibroblast conditioned basal media</i>
FS	Dispersión frontal	<i>Forward scatter</i>
FSP-1 / S100A4	Proteína transmembrana S100A4	<i>S100 calcium binding protein A4</i>
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	<i>Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase</i>
hAT-MSCs	Células madre mesenquimales de tejido adiposo humano	<i>Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells</i>
HBSS	Solución salina de Hanks	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HCE	Línea celular epitelial corneal humana	<i>Human corneal epithelial cell line</i>
HCEcMB / HCEcBM	Medio base condicionado con células epiteliales corneales	<i>Human corneal epithelial cell conditioned basal medium</i>
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HLA	Complejo mayor de histocompatibilidad	<i>Human leukocyte antigen</i>
IL	Interleuquina	<i>Interleukin</i>
IFN-γ	Interferón gamma	<i>Interferon gamma</i>
ITS	Insulina, transferrina y selenio	<i>Insulin, transferrin and selenium</i>
KGF	Factor de crecimiento de queratinocitos	<i>Keratinocyte growth factor</i>
NGF	Factor de crecimiento neural	<i>Neural growth factor</i>
NK	Células <i>natural killer</i>	<i>Natural killer cells</i>
MA / AM	Membrana amniótica	<i>Amniotic membrane</i>
MB / BM	Medio base	<i>Basal medium</i>

ABREVIATURAS / ABBREVIATIONS

MFI	Índice de fluorescencia media	<i>Mean fluorescence index</i>
MMP-9	Metaloproteinasa de matriz 9	<i>Matrix metalloproteinase 9</i>
MSCs	Células madre mesenquimales	<i>Mesenchymal stem cells</i>
MUC5AC	Mucina 5AC	<i>Mucin 5AC</i>
P	Pase	<i>Passage</i>
PAS	Ácido peryódico de Schiff	<i>Periodic Acid-Schiff</i>
p63	Factor de transcripción p63	<i>Nuclear transcription factor p63</i>
PBS	Tampón fosfato salino	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	<i>Polymerase chain reaction</i>
RT-PCR	PCR con transcripción reversa	<i>Reverse transcription PCR</i>
SEM	Error estándar de la media	<i>Standard error of the mean</i>
SIL / LSCD	Síndrome de insuficiencia límbica	<i>Limbal stem cell deficiency</i>
SSC	Dispersión lateral	<i>Side scatter</i>
TBS	Tampón tris salino	<i>Tris-buffered saline</i>
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta	<i>Transforming growth factor beta</i>
TGFβRIII	Receptor tipo III del TGF- β	<i>TGF-β receptor type III</i>
TSG-6	Proteína del gen inducible por factor de necrosis 6	<i>Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein</i>
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TSP-1	Trombospondina 1	<i>Trombospondin 1</i>
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

FINANCIACIÓN / FUNDING

Este trabajo de investigación ha sido posible gracias a la financiación de los siguientes proyectos de investigación / Funding:

Células madre mesenquimales de tejido adiposo como nueva estrategia terapéutica para la reconstrucción de la superficie ocular: evaluación de su capacidad de diferenciación *in vitro* a fenotipo epitelial corneal. Junta de Castilla y León SAN126/VA12/09. 2009-2011. IP: Teresa Nieto Miguel.

Bioingeniería de tejidos a nivel ocular: desarrollo de complejos células madre biopolímeros para la reconstrucción de la superficie ocular. Junta de Castilla y León SAN126/VA11/09. 2009-2011. IP: Margarita Calonge Cano.

Células madre mesenquimales de tejido adiposo (TA-MSC): análisis de su potencial de diferenciación a células epiteliales de córnea y de su capacidad para la reconstruir la superficie ocular en un modelo animal. Ministerio de Ciencia e Innovación SAF2010-149000 (subprograma SP2). 2010-2013. IP: Margarita Calonge Cano.

Proyecto intramural del Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN): “Bio-engineered stem cell niches (BioSCniche) in ocular surface reconstruction for corneal blindness: from basic research to clinical trials.” Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III. 2010-2012. IP: Margarita Calonge Cano.

Desarrollo de un nuevo producto de terapia avanzada para la regeneración y reconstrucción de la superficie ocular. Artículo 83 de la LOU con los Laboratorios Ferrer Internacional S.A. 2012-2016. IP: Margarita Calonge Cano.

FINANCIACIÓN / FUNDING

A su vez, la realización de este trabajo de investigación ha recibido apoyo económico de las siguientes instituciones / *Institutions*:

Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN). Nº Expte CB06/01/0003. Ministerio de Economía y Competitividad. Instituto de Salud Carlos III. Concesión al Grupo de Investigación en Superficie Ocular del Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA) como grupo integrante. IP del Grupo IOBA en el CIBER-BBN: Margarita Calonge Cano. Duración: 03/08/2006-actualidad.

Centro en Red de Medicina Regenerativa y Terapia Celular de Castilla y León. Área de Oftalmología. Proyecto: Bioingeniería de tejidos en la superficie ocular. Cofinanciado por el Instituto de Salud Carlos III y la Junta de Castilla y León. IP del grupo integrante: Margarita Calonge Cano. Duración: 2007-presente.

Red Temática de Investigación Cooperativa en Salud: Red de Terapia Celular (TerCel). Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III. Coordinador: Jose María Moraleda Jiménez, Universidad de Murcia. Duración: 05/12/2006-actualidad.

Por otro lado, el desarrollo de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la financiación personal recibida por parte de las siguientes instituciones:

07/2008-05/2009: Beca de iniciación a la investigación. CIBER-BBN. Actividad investigadora desarrollada en el IOBA, Universidad de Valladolid, Valladolid.

06/2009-06/2013: Ayudas destinadas a financiar la contratación de personal investigador de reciente titulación, en el marco de la Estrategia Regional de Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación 2007-2013, cofinanciadas por el Fondo Social Europeo. Junta de Castilla y León, España. Ayudas concedidas para el desarrollo de tesis doctorales. Actividad investigadora desarrollada en el IOBA, Universidad de Valladolid, Valladolid.

07/2013-09/2013: Visión I + D S.L. Actividad investigadora desarrollada en el IOBA, Universidad de Valladolid, Valladolid.

09/2013-actualidad: Artículo 83 de la LOU con los Laboratorios Ferrer Internacional S.A. Actividad investigadora desarrollada en el IOBA, Universidad de Valladolid, Valladolid.

DIVULGACIÓN CIENTÍFICA / SCIENTIFIC CONTRIBUTIONS

La presente tesis doctoral ha dado lugar, hasta el momento, a la siguiente publicación científica / *Publication out of this thesis*:

Nieto-Miguel T*, **Galindo S***, Reinoso R, Corell A, Martino M, Pérez-Simón JA, Calonge M. *In vitro simulation of corneal epithelium microenvironment induces a corneal epithelial-like cell phenotype from human adipose tissue mesenchymal stem cells*. Current Eye Research. 2013 Sep;38(9):933-44.

**Los dos primeros autores han contribuido de igual forma en este trabajo y deben ser considerados como equivalentes.*

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

Galindo S, Vuelta E, Iglesias J, Plata-Cordero M, Regueiro M, Gonzalo-Orden M, Hilleto D, Nieto-Miguel T, Herreras JM, Calonge M. *Ocular surface failure due to LSCD. Development of an efficient animal model*.

Galindo S, Herreras JM, Rey E, López-Panigua M, de la Mata A, Plata-Cordero M, Nieto-Miguel T, Calonge M. *Improvement of limbal and corneal phenotype after transplantation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in two in vivo models of ocular surface failure*.

Parte del trabajo ha sido presentado en las siguientes reuniones científicas nacionales e internacionales / *Congress contributions*:

Nieto T, Corrales RM, Sáez V, Corell A, Reinoso R, Martino M, Pérez-Simón JA, García-Montes MT, Calonge M. *Corneal Epithelium Cell Marker Acquisition by Human Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells (hAT-MSc)*. Póster. "81th Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)". Fort Lauderdale, Florida, EEUU. Mayo de 2009. Invest Ophthalmol Vis Sci 2009, 50: ARVO E-abstract 2424.

Galindo S, Calonge M, De la Mata A, López M, Vuelta E, Iglesias J, Herreras JM, Gonzalo-Orden M, Nieto-Miguel T. *Human Adipose Tissue-Mesenchymal Stem Cells (hAT-MSC) to Reverse Corneal Blindness Due to Limbal Stem Cell Deficiency*. Póster. “IV Edition IOBA’s Day”. Valladolid, España. 6 de noviembre de 2009.

Galindo S, De la Mata A, López-Paniagua M, Reinoso R, Corell A, Martino M, Herreras JM, Plata-Cordero M, Iglesias J, Nieto-Miguel T, Calonge M. *Human Adipose Tissue-Mesenchymal Stem Cells (hAT-MSCs) as an alternative stem cell source for ocular surface reconstruction*. Comunicación Oral. “V Edition IOBA’s Day”. Valladolid, España. 28 de octubre de 2011.

Galindo S, Plata-Cordero M, Vuelta E, Iglesias J, Regueiro M, Gonzalo-Orden M, Hileeto D, Nieto-Miguel T, Herreras JM, Calonge M. *Ocular Surface Failure Due to Limbal Stem Cell Deficiency (LSCD): Development of Two Efficient Animal Models*. Póster. “84th Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)”. Fort Lauderdale, Florida, EEUU. Mayo de 2012. Invest Ophthalmol Vis Sci 2012; 53: ARVO E-abstract 3516.

Galindo S, Nieto-Miguel T, Reinoso R, Corell A, Martino M, Pérez-Simón JA, Calonge M. *In vitro simulation of corneal epithelium microenvironment induces a corneal epithelial-like cell phenotype from human adipose tissue mesenchymal stem cells*. Póster oral. “Conference of Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS-EU 2013)”. Estambul, Turquía. Junio de 2013.

Galindo S, Herreras JM, Plata-Cordero M, de la Mata A, López-Paniagua M, Rey E, Nieto-Miguel T, Calonge M. *Safety and preliminary efficacy of human adipose tissue mesenchymal stem cells (hAT-MSC) to restore the ocular surface in an in vivo experimental model of limbal stem cell deficiency (LSCD)*. Póster. “86th Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)”. Orlando, Florida, EEUU. Mayo de 2014. Invest Ophthalmol Vis Sci 2014; 55: ARVO E-abstract 5162.

Rey E, **Galindo S**, Herreras JM, Plata-Cordero M, de la Mata A, López-Paniagua M, Nieto-Miguel T, Calonge M. *Evaluación de la seguridad y la eficacia preliminar del trasplante de células madre mesenquimales de tejido adiposo humano para regenerar la superficie ocular dañada de un modelo de síndrome de insuficiencia límbica desarrollado en conejo*. Póster. AETEL (Asociación Española de Técnicos de Laboratorio). Córdoba, España. Mayo de 2014.

Galindo S, Herreras JM, Rey E, López-Paniagua M, de la Mata A, Plata-Cordero M, Nieto-Miguel T, Calonge M. *Recuperación del fenotipo limbar y corneal tras el trasplante de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en un modelo animal de síndrome de insuficiencia límbica*. Comunicación oral. Día del IOBA 2014. Valladolid, España. Diciembre de 2014.

Galindo S, Herreras JM, Rey E, López-Paniagua M, de la Mata A, Plata-Cordero M, Nieto-Miguel T, Calonge M. *Improvement of limbal and corneal phenotype after transplantation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in an in vivo model of ocular surface failure*. Póster. “87th Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)”. Denver, Colorado, EEUU. Mayo de 2015. Invest Ophthalmol Vis Sci 2015; 56: ARVO E-abstract 3474.

Calonge M, **Galindo S**, Nieto-Miguel T, López-Paniagua M, de la Mata A, Plata-Cordero M, Rey E, Herreras JM. *Ocular surface inflammation in an experimental model of partial and total limbal stem cell deficiency*. Póster. “87th Annual Meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)”. Denver, Colorado, EEUU. Mayo de 2015. Invest Ophthalmol Vis Sci 2015; 56: ARVO E-abstract 5638.

RESUMEN

En este trabajo, se ha abordado el estudio de la capacidad que tienen las células madre mesenquimales de tejido adiposo humano (hAT-MSCs) para reparar la superficie ocular en casos de fracaso de la misma por deficiencia de células madre límbicas. Para ello, se han realizado ensayos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. En primer lugar, se ha estudiado la capacidad que tienen estas células para diferenciarse *in vitro* a células con características similares a las epiteliales corneales. En segundo lugar, se ha estudiado la dosis celular más adecuada para su trasplante sobre la superficie ocular en un modelo de daño corneal por causticación en ojo de cerdo *ex vivo*. Por último, se han desarrollado tres modelos animales de síndrome de insuficiencia límbica (SIL) en los que se ha estudiado la tolerancia y la eficacia del trasplante de hAT-MSCs para regenerar la superficie ocular dañada (Figura 1).

Los resultados obtenidos mostraron que las hAT-MSCs pueden adquirir un fenotipo similar al de las células epiteliales corneales cuando estas son cultivadas *in vitro* con factores secretados por células epiteliales corneales diferenciadas.

Por otra parte, el modelo *ex vivo* de daño corneal por causticación resultó no ser idóneo para el estudio de la dosis de hAT-MSCs más adecuada para su trasplante sobre la superficie ocular.

Se desarrollaron tres modelos diferentes de SIL en dos especies animales: un modelo de SIL total en cerdo, un modelo de SIL parcial en conejo y un modelo de SIL total en conejo. En el modelo de SIL porcino se producía una reacción inflamatoria debida al proceso quirúrgico de sutura de la membrana amniótica sobre la superficie ocular tan intenso que este modelo hubo de descartarse para el posterior estudio de eficacia del trasplante de hAT-MSCs. En el modelo de SIL parcial desarrollado en el conejo se observó que las hAT-MSCs fueron bien toleradas tras su trasplante a la superficie ocular pero el daño era demasiado limitado como para permitir ver un efecto terapéutico. Por último, en el modelo de SIL total desarrollado en conejo se comprobó que las hAT-MSCs migraban hacia las zonas inflamadas de la superficie ocular, que frenaban el desarrollo

RESUMEN Y ORGANIZACIÓN

de los signos clínicos claves, la neovascularización y la opacidad corneal, y que disminuían dicha inflamación. Asimismo, tras el trasplante de hAT-MSCs sobre la superficie ocular dañada se observó una recuperación parcial de los fenotipos corneal y limbar que se habían visto modificados en los modelos de SIL parcial y total desarrollados en conejo.

ORGANIZACIÓN

Este trabajo de tesis doctoral opta a la Mención Internacional en el Título de Doctor. Por esta razón, ha sido organizada y desarrollada bajo las directrices de la Comisión de Doctorado de la Universidad de Valladolid, redactándose un resumen en inglés del trabajo realizado, en el que se incluyen la justificación del proyecto, los objetivos propuestos, la metodología, la descripción de los resultados obtenidos y la discusión de los mismos.

Parte de esta tesis doctoral fue desarrollada en el Instituto de Oftalmología del *University College London (UCL)*, durante una estancia de 3 meses (desde el 10 de septiembre hasta el 8 de diciembre de 2012) en el prestigioso grupo de investigación dirigido por la Prof. Julie T. Daniels. Durante dicha estancia, se realizó un estudio con el que poder identificar la dosis celular más adecuada para realizar un trasplante de hAT-MSCs sobre la superficie ocular. Para ello, se utilizó un modelo de daño corneal por causticación en ojos de cerdo *ex vivo* que había sido previamente desarrollado por este grupo de investigación. Este trabajo estuvo supervisado por la Dra. Julie T. Daniels y los resultados obtenidos forman parte de esta tesis doctoral.

Estudios <i>in vitro</i>	
Estudio de la capacidad de diferenciación de las hAT-MSCs hacia epitelio corneal	Cultivo de las hAT-MSCs con diferentes medios condicionados y sobre distintos sustratos
Estudios <i>ex vivo</i>	
Doctorado con mención internacional	
Estudio de la dosis de hAT-MSCs más adecuada para su trasplante a la superficie ocular	Trasplante de diferentes dosis celulares sobre un modelo de daño corneal por quemadura en botones corneoesclerales de cerdo
Estudios <i>in vivo</i>	
Desarrollo de un modelo de SIL	<ul style="list-style-type: none"> → Modelo porcino de SIL total → Modelo de SIL parcial en conejo → Modelo de SIL total en conejo
Estudio de la tolerancia y la eficacia del trasplante de hAT-MSCs sobre la superficie ocular del modelo de SIL	<ul style="list-style-type: none"> → Trasplante en el modelo de SIL parcial en conejo → Trasplante en el modelo de SIL total en conejo

Figura 1. Esquema de la organización de la memoria de la tesis doctoral.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Concepto de superficie ocular

La superficie ocular es una unidad anatómica, histológica, fisiológica y patológica compuesta por la película lagrimal, los epitelios que tapizan el globo ocular (el epitelio de la conjuntiva bulbar y tarsal, el epitelio limbar y el epitelio corneal), la película lagrimal suprayacente y los tejidos conectivos subyacentes (Figura 2). Sus funciones principales son la protección del globo ocular frente a agresiones externas y el mantenimiento de la integridad, la humectación y la transparencia corneal, lo cual participa en la visión. Las glándulas lagrimales y las glándulas de Meibomio, junto con la regulación nerviosa, hormonal e inmunológica de las mismas, juegan también un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis de la superficie ocular (Unidad Funcional Lagrimal).

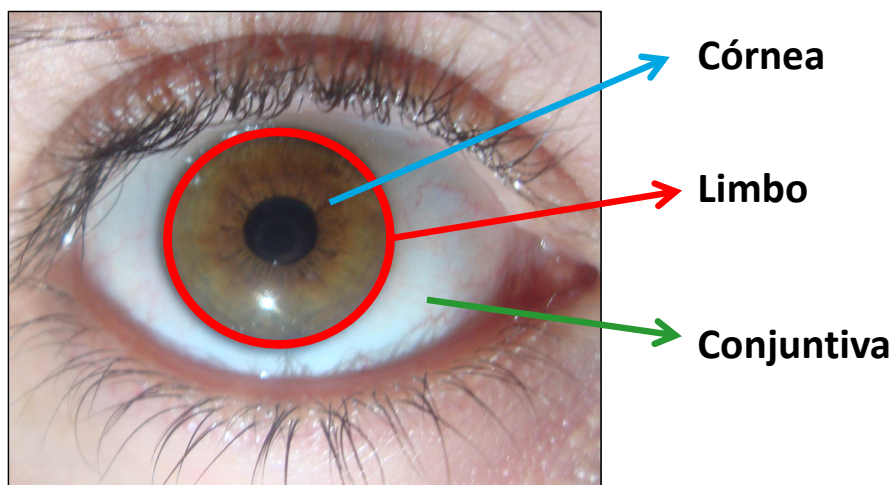


Figura 2. La superficie ocular. Localización anatómica de la conjuntiva, el limbo y la córnea en la superficie ocular.

1.1. La córnea

La córnea es un tejido transparente y altamente especializado responsable en parte de la refracción (constituyendo el 70% de la refracción global), transmisión y enfoque de la luz en la retina. Se trata de un tejido sin irrigación sanguínea ni linfática, lo que le

INTRODUCCIÓN

convierte en un tejido inmunoprivilegiado. Sus requerimientos fisiológicos son cubiertos por los fluidos que la rodean (el humor acuoso en su cara posterior y la película lagrimal en su cara anterior) y por el limbo y la conjuntiva adyacentes. Además, es el tejido con mayor número de terminaciones nerviosas de todo el organismo.¹

Desde el punto de vista óptico, la córnea es una lente convexo-cóncava (prolata). Su espesor es de 500 μm en la zona central, mientras que es de 650-700 μm en la periferia. Los diámetros de la córnea humana en su cara anterior son de 11,8 mm horizontalmente y de 11,2 mm verticalmente.²

Histológicamente, en un corte transversal, la córnea consta de 5 capas, de la más externa a la más interna: epitelio, capa de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio (Figura 3).

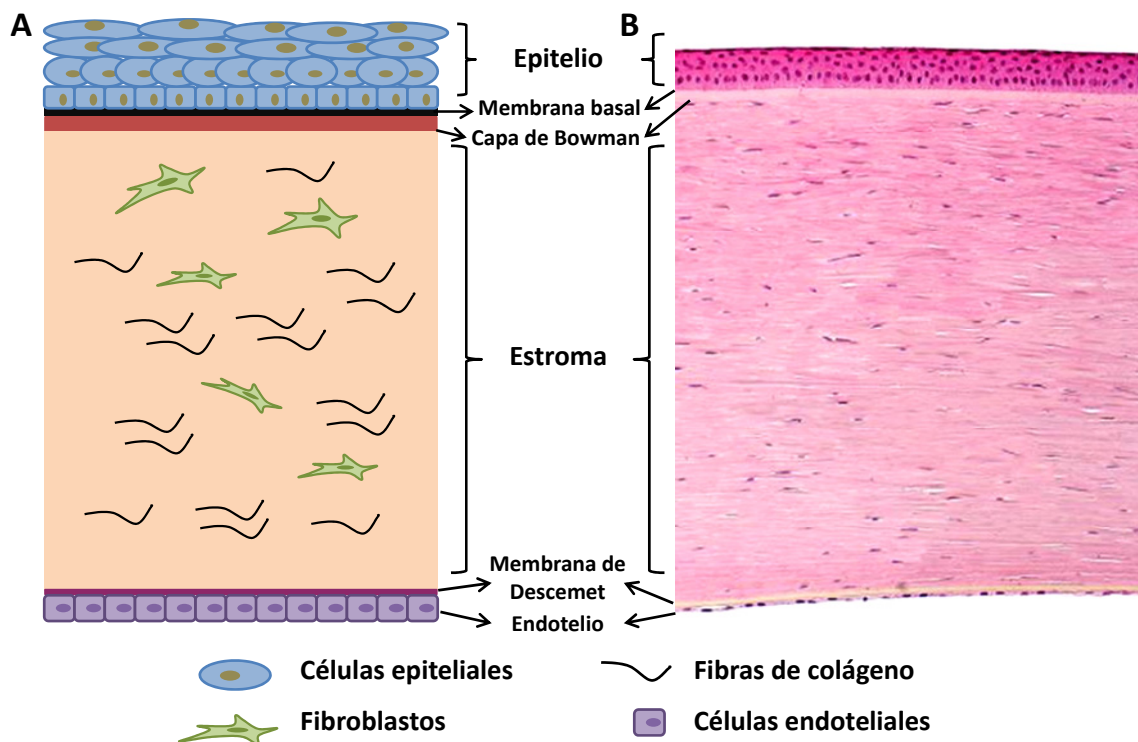


Figura 3. Estructura histológica de la córnea. (A) Esquema de un corte transversal corneal en el cual se representan las diferentes capas histológicas y los diferentes tipos celulares presentes en ellas. (B) Corte histológico transversal de una córnea humana teñida con hematoxilina-eosina. Imagen cedida por el laboratorio de Patología Ocular del IOBA, 10X aumentos.

El epitelio corneal

La córnea presenta un epitelio escamoso, estratificado y no queratinizado que está formado por entre 5 y 7 capas de células, aumentando el número de capas a medida que se aproxima al limbo corneoescleral. El espesor de este epitelio es de unos 50 μm y representa una fuerte barrera protectora frente al medio externo gracias a las estrechas uniones intercelulares y a la rápida capacidad de cicatrización que presenta.³ Se pueden distinguir tres tipos de células dentro del epitelio corneal. Las dos primeras capas de células superficiales son aplanadas y escamosas, las cuales se descaman cuando han envejecido. En su superficie presentan microvellosidades, para anclar la película lagrimal a la superficie y poseen, además, un gran número de uniones intercelulares estrechas. Estas células se caracterizan por la expresión de los marcadores de células epiteliales corneales diferenciadas citoqueratina 3 (CK3) y citoqueratina 12 (CK12).⁴⁻⁶ Las 3 capas de células siguientes se denominan células aladas o intermedias, las cuales poseen un gran número de interdigitaciones entre ellas. Por último, existe una única capa basal de células columnares que descansan sobre la membrana basal, a la que están firmemente unidas mediante hemidesmosomas. Poseen gran cantidad de uniones intercelulares de tipo desmosoma, uniones estrechas y uniones comunicantes. Estas células son mitóticamente activas y las células hijas se desplazan hacia la zona de células intermedias.

Las células epiteliales corneales descansan sobre una membrana basal formada por fibras de colágeno IV (la cadena $\alpha 3$ específicamente), V, VII, XVII y XVIII, además de por glicoproteínas y proteoglicanos encargados de mantener unidos los diferentes componentes de la membrana basal entre sí.⁷

La capa de Bowman

Esta capa es una estructura acelular y avascular, de 8 a 12 μm de espesor, situada debajo de la membrana basal del epitelio corneal. Está compuesta principalmente por fibras de colágeno tipo I y tipo III. Su función principal es actuar de barrera frente a microorganismos y células tumorales debido a su alta resistencia a traumatismos.

INTRODUCCIÓN

El estroma corneal

Esta capa constituye casi el 90% del espesor total de la córnea. Está compuesto principalmente por fibras de colágeno I y V, de tamaño uniforme y ordenadas en unas 200 láminas (lamelas) paralelas a la superficie, cada una de ellas compuesta de múltiples fibrillas de colágeno de diámetro uniformemente pequeño y separadas unas de otras por distancias uniformes, en las que se encuentran proteoglicanos del tipo queratán sulfato y dermatán sulfato.³ El componente celular principal del estroma corneal son los queratocitos (fibroblastos modificados), responsables de la síntesis y el mantenimiento de los proteoglicanos y el colágeno. Ante una agresión, estos queratocitos se activan, migran hacia el lugar de la lesión y se transforman en fibroblastos o miofibroblastos activos, los cuales contribuyen a la cicatrización mediante proliferación y síntesis de colágeno.⁸

La membrana de Descemet

La membrana de Descemet, de entre 8 y 12 μm de espesor, es una membrana basal producida por el endotelio. Está compuesta principalmente por fibronectina y colágeno IV, lo que le confiere elasticidad y resistencia frente a la perforación.

El endotelio corneal

El endotelio corneal es una monocapa de células hexagonales que desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la transparencia de la córnea, ya que ejerce una función barrera impidiendo el paso de fluidos al estroma, lo que causaría edema y, por lo tanto, opacidad corneal.⁹ Las células de esta monocapa presentan interdigitaciones intercelulares que les permiten cubrir espacios tras la muerte de células vecinas, ya que no poseen capacidad de renovación celular. Por esta misma razón, las células tienden a alargarse y aplanarse a lo largo de la vida del individuo, disminuyendo, por tanto, el espesor de esta capa con la edad. Su parte posterior, que se encuentra en contacto directo con el humor acuoso y presenta una superficie lisa, manteniendo así unas buenas condiciones ópticas.

1.2. El limbo esclerocorneal

El limbo se encuentra en la zona de transición entre la córnea (transparente) y la esclera y conjuntiva (opacas) formando un anillo de 1-2 mm de ancho que rodea por completo a la córnea. Es en este limbo esclerocorneal donde residen las células madre responsables de la regeneración continua del epitelio corneal, necesaria para el mantenimiento de una córnea transparente y sana. Estas células denominadas células madre epiteliales limbares se encuentran en un nicho especializado donde interaccionan componentes celulares y extracelulares para proporcionar un ambiente adecuado para el mantenimiento de su fenotipo indiferenciado.¹⁰⁻¹² Este nicho está formado por unas estructuras en forma de crestas y valles denominadas empalizadas de Vogt, las cuales aumentan las interacciones epitelio-estroma, favoreciendo la llegada de nutrientes y factores de crecimiento desde el estroma al epitelio y, además, sirven de protección a las células madre (Figura 4).^{13,14} De las células presentes en la capa epitelial basal de dichas estructuras, aproximadamente el 10% son células madre epiteliales limbares.¹¹ Además, el limbo actúa como barrera física entre la córnea y la conjuntiva, impidiendo que la conjuntiva vascularizada y translúcida invada la córnea y disminuya la visión.

INTRODUCCIÓN

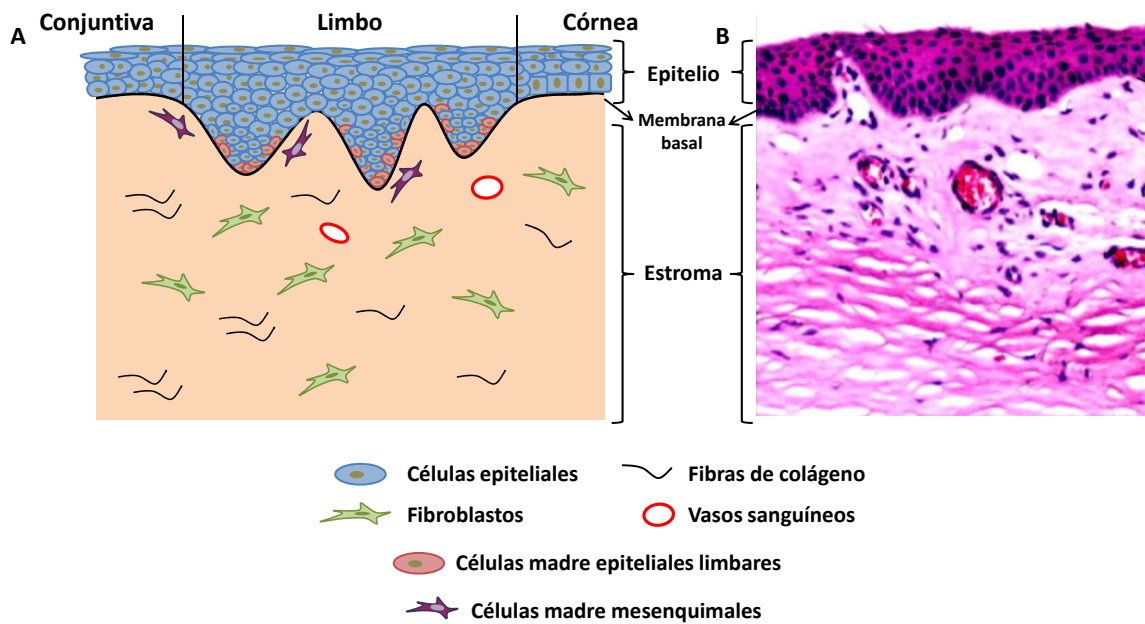


Figura 4. Estructura histológica del limbo. (A) Esquema de un corte transversal del limbo, en el cual se representan las diferentes capas histológicas y los diferentes tipos celulares presentes en ellas. (B) Corte histológico transversal de un limbo humano teñido con hematoxilina-eosina. Imagen cedida por el laboratorio de Patología Ocular del IOBA, 20X aumentos.

El epitelio limbar

El epitelio limbar está compuesto aproximadamente por 10 capas de células epiteliales. Las capas más superficiales de este epitelio están constituidas por células en estado de diferenciación avanzado. Las 6 capas siguientes están formadas por células amplificadas transitorias, las cuales se encuentran en un estado intermedio de diferenciación. En la capa más basal del epitelio se encuentran las células madre limbares responsables de la regeneración continua del epitelio corneal.¹⁵ Además, en el epitelio limbar se ha descrito la presencia de otros tipos celulares como linfocitos T, células presentadoras de antígenos (células de Langerhans) y melanocitos encargados de proteger a las células madre limbares de la radiación ultravioleta.¹⁶⁻¹⁸

La existencia de las células madre limbares en las denominadas empalizadas de Vogt del limbo esclerocorneal fue demostrada en 1989,^{10,11} basándose en la hipótesis propuesta previamente por Davanger y Evensen en 1971.¹⁹

Las células madre limbares son células de pequeño tamaño, presentan un ciclo celular corto, poseen una alta capacidad proliferativa *in vitro* o *in vivo* en respuesta a un daño, no expresan marcadores propios de células diferenciadas y tienen capacidad de autorrenovación, es decir, tienen la capacidad de dividirse de forma asimétrica generando dos células hijas, una de las cuales mantendrá las características de célula madre (autorrenovación) y la otra migrará para diferenciarse a epitelio corneal.

La hipótesis de migración X, Y, Z, emitida en 1983 por Richard Thoft antes de conocerse la existencia de células madre en el limbo, define la forma de renovación constante del epitelio corneal. Según esta teoría, las células descamadas en la córnea central (eje Z) son reemplazadas por las células epiteliales basales (eje X).²⁰ Estas células epiteliales basales serían a su vez reemplazadas por células de la periferia que van migrando y diferenciándose centripetamente (eje Y). Las células madre epiteliales limbares dan lugar, por división asimétrica, a las células amplificadas transitorias que van migrando centripetamente y continúan diferenciándose a células postmitóticas hasta generar las células escamosas superficiales del epitelio corneal (Figura 5).

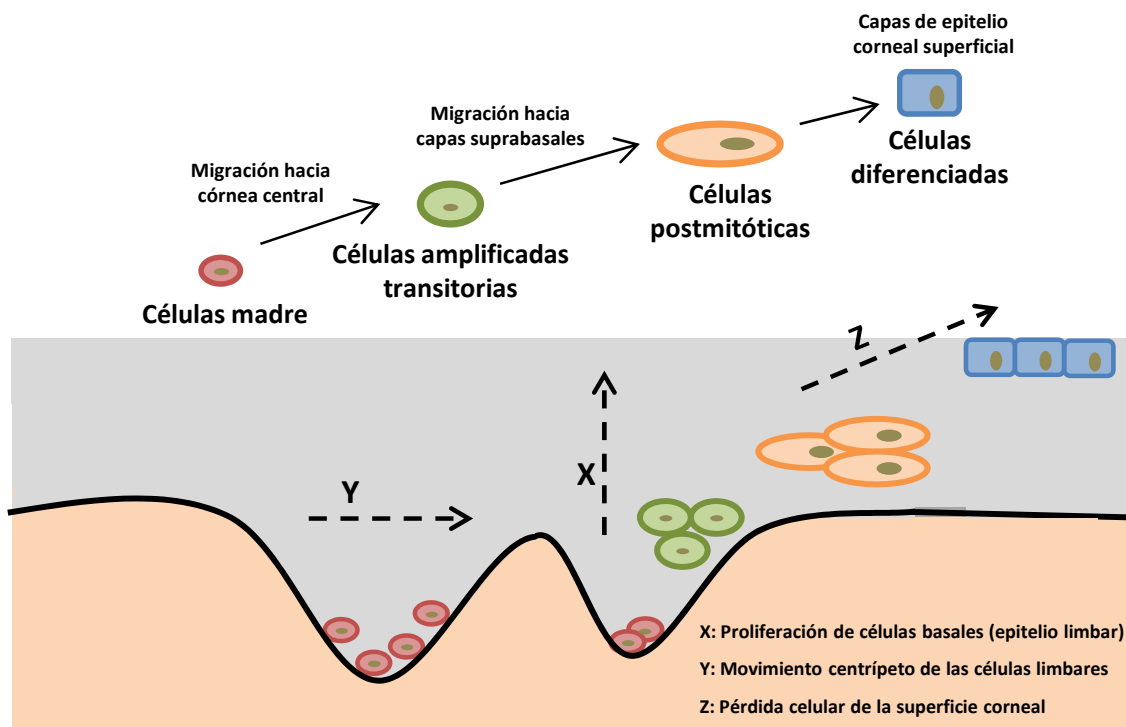


Figura 5. Renovación del epitelio corneal. Diferenciación de las células madre limbares a células amplificadas transitorias y migración centrípeta de estas desde el limbo a las capas superficiales de la córnea para formar un epitelio corneal especializado. Imagen modificada de la original de W. Li, Y. Hayashida, Y. Cheng, S. Tseng. *Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. Cell Res. 2007;17:26-36.*

Aunque no hay un único marcador molecular que identifique las células madre epiteliales limbares, se ha descrito la expresión por parte de estas células de una serie de marcadores propios, como la proteína transportadora de ATP ABCG2, el factor de transcripción p63 y las citoqueratinas 14 (CK14) y 15 (CK15).²¹⁻²⁴

Las células epiteliales del limbo descansan sobre una membrana basal rica en fibras de colágeno tipo IV (cadenas $\alpha 1$ y $\alpha 2$), VII, XVI y XVII, glicoproteínas y proteoglicanos.⁷ Aunque el colágeno IV está presente también en la membrana basal de la córnea, su expresión es predominante en la membrana basal del limbo.²⁵⁻²⁷

El estroma limbar

El estroma limbar es un tejido conectivo altamente inervado y vascularizado que está formado principalmente por fibras de colágeno IV y VII secretadas por las propias

células estromales. El componente celular mayoritario son los fibroblastos, con características similares a los queratocitos corneales. Además, se ha descrito la presencia de células madre mesenquimales, las cuales constituyen un 2% de las células presentes en el estroma y se sitúan cerca de la membrana basal del epitelio limbar.²⁸⁻³¹ Se cree que estas células podrían ser las encargadas del reemplazo de los queratocitos corneales y, además, se ha descrito su participación en el mantenimiento del fenotipo indiferenciado de las células madre epiteliales limbares.^{32,33}

1.3. La conjuntiva

La conjuntiva es una membrana mucosa que tapiza los párpados y se extiende recubriendo el globo ocular hasta el limbo. Se puede dividir en tres zonas: la conjuntiva tarsal que está firmemente anclada al tarso palpebral, la conjuntiva bulbar laxa que reviste el globo ocular y la conjuntiva del fórnix o fondo de saco que une ambas. Es un tejido altamente vascularizado y con un rico sistema linfático. Histológicamente, está compuesta por 2 capas claramente diferenciadas: la más externa, un epitelio estratificado no queratinizado y, la más interna, un estroma laxo (Figura 6). Las principales funciones de la conjuntiva son: 1) proteger la órbita y los párpados, 2) suministrar el componente acuoso y mucínico de la lágrima, 3) proporcionar un tejido inmune a la superficie ocular y 4) facilitar los movimientos oculares.³⁴

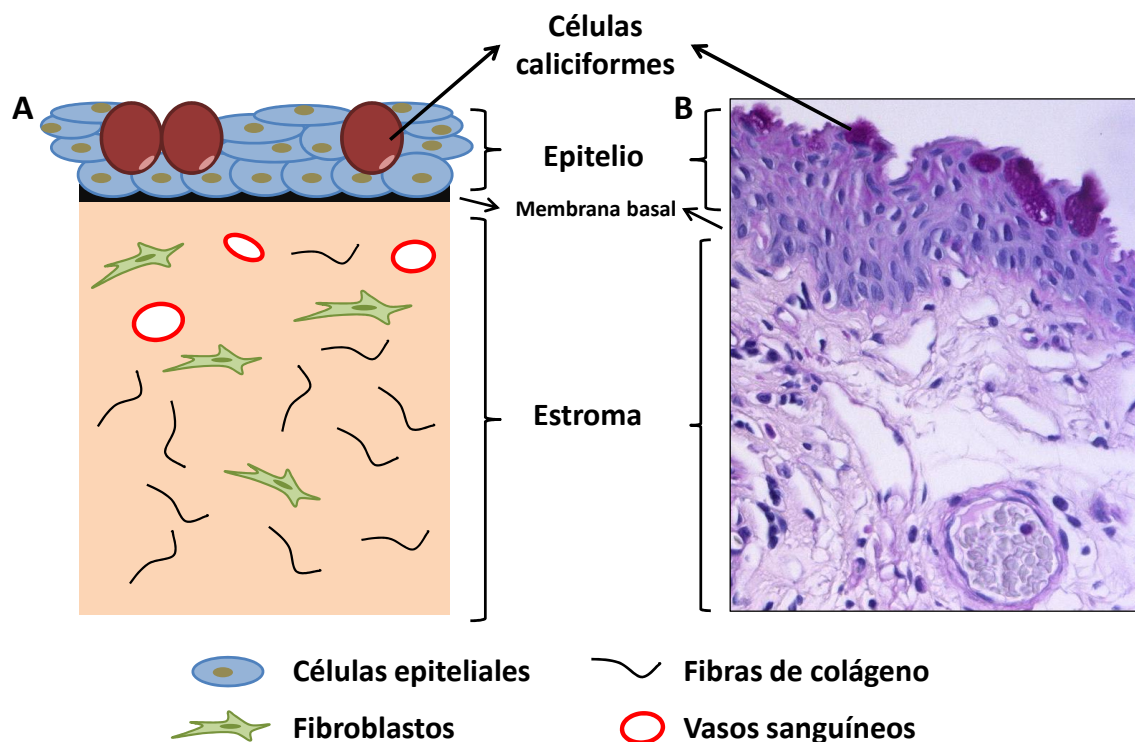


Figura 6. Estructura histológica de la conjuntiva. (A) Esquema de un corte transversal de la conjuntiva, en el cual se representan las diferentes capas histológicas y los diferentes tipos celulares presentes en ellas. (B) Corte histológico transversal de una conjuntiva humana teñida con ácido peryódico de Schiff (*Periodic Acid-Schiff*, PAS). Imagen cedida por el laboratorio de Patología Ocular del IOBA, 40X aumentos.

El epitelio conjuntival

El epitelio conjuntival es un epitelio secretor, escamoso, estratificado y no queratinizado. Está formado por entre 2 y 5 capas de células epiteliales, siendo mayor el número de capas en las zonas adyacentes al limbo esclerocorneal y al borde palpebral. La capa celular más externa cuenta con microvellosidades que participan en el anclaje de la capa mucínica de la lágrima a la superficie ocular. Las células epiteliales de la conjuntiva expresan los marcadores específicos de un epitelio estratificado no queratinizado CK4, CK7 y CK13.³⁵ Entre las células epiteliales se encuentran las células caliciformes, las cuales representan entre un 5-10% del total celular y son responsables de la producción de algunas de las mucinas de la lágrima, especialmente de la MUC5AC. La conjuntiva bulbar inferonasal y la conjuntiva tarsal son las zonas más ricas en células caliciformes. En el epitelio conjuntival también existen melanocitos, células de

Langerhans y linfocitos. Este epitelio se asienta sobre una membrana basal compuesta principalmente por colágeno IV.³⁴

El estroma conjuntival

El estroma de la conjuntiva es un tejido conectivo fibrovascular laxo que contiene gran cantidad de vasos sanguíneos y fibras nerviosas. El componente celular principal del estroma conjuntival son los fibroblastos, aunque también aparecen células inflamatorias como linfocitos, neutrófilos y células plasmáticas. El estroma de la conjuntiva es más delgado en el fórnix, zona donde se encuentran las glándulas lagrimales accesorias de Krause.³⁴

2. Síndrome de insuficiencia límbica

El Síndrome de insuficiencia límbica (SIL) es una entidad clínica producida por la disfunción total o parcial de las células madre epiteliales limbares y/o de su nicho, que impide la regeneración del epitelio corneal.^{36,37}

2.1. Causas

Las causas del SIL se pueden clasificar como primarias (hereditarias) o secundarias (adquiridas).^{36,37}

Las causas primarias son las de menor prevalencia y están relacionadas con enfermedades genéticas que desembocan en un nicho limbar insuficiente. Algunas de las enfermedades hereditarias que pueden desencadenar un SIL son aniridia congénita, displasias ectodérmicas, queratitis asociada a deficiencias endocrinas y queratopatías neurotróficas.

Las causas secundarias, que son las más comunes, se deben a factores externos o enfermedades inflamatorias que provocan daños a nivel celular. Las causas más frecuentes son las quemaduras químicas (causticaciones) y térmicas, las enfermedades

INTRODUCCIÓN

inflamatorias de origen inmune (síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide de las membranas mucosas, queratoconjuntivitis atópica, etc.), las cirugías múltiples que comprometen la región limbar, las secuelas de infecciones bacterianas severas y el uso abusivo de lentes de contacto, entre otras.

El SIL puede ser unilateral o bilateral. Según su extensión en la superficie ocular, puede tratarse de un SIL parcial o sectorial, en el que solo está dañada una región del limbo y el resto permanece sano o un SIL total, en el cual los 360° del limbo están afectados.

2.2. Signos y síntomas

Como consecuencia de la pérdida o disfunción de las células madre epiteliales limbares, el epitelio de la córnea no puede ser regenerado de forma eficiente. En esta situación, es el epitelio de la conjuntiva el encargado de reepitelizar la córnea, produciéndose una conjuntivalización o pannus. La penetración de neovasos (neovascularización) procedentes de la conjuntiva hacia la superficie de la córnea (avascular en estado sano) es uno de los signos característicos del SIL. Además, como consecuencia de la incapacidad de generar un epitelio corneal sano se originan ulceraciones corneales que pueden llegar a ser persistentes. En último término, el SIL puede producir una inflamación persistente y una opacificación de la parte anterior de la córnea (Figura 6). Todo ello puede desencadenar la pérdida parcial o completa de la visión por opacidad epitelial y estromal superficial, fotofobia, lagrimeo, síndrome de dolor crónico y, como consecuencia, una disminución importante de la calidad de vida.^{36,37}

2.3. Diagnóstico

El diagnóstico de esta enfermedad se basa en la observación de los signos clínicos que la definen. Mientras que una córnea sana es impermeable a la fluoresceína sódica, la tinción con este colorante pone de manifiesto los defectos epiteliales presentes en la córnea. Además, la aparición de una tinción punteada con fluoresceína puede indicar la presencia de un epitelio con fenotipo conjuntival en la córnea.³⁸ Al mismo tiempo, el diagnóstico del SIL puede ser confirmado por otras técnicas como la citología de

impresión corneal o mediante microscopía láser confocal *in vivo* (Figura 7). Por medio de la obtención de citologías de impresión corneal se confirma la presencia de células caliciformes, típicas de la conjuntiva, en el centro corneal, corroborando la invasión producida en la córnea por parte del epitelio conjuntival.³⁹ En ciertas situaciones como quemaduras químicas, la ausencia de células caliciformes en la córnea es común, pudiendo traducirse en falsos negativos.⁴⁰ Para abordar dichas situaciones, la detección de marcadores específicos en las citologías de impresión corneal puede servir para diferenciar entre un fenotipo de epitelio corneal (expresión de CK3 y CK12) o de epitelio conjuntival (expresión de CK7, CK13 y MUC5AC, entre otros).⁴¹ Mediante microscopía láser confocal *in vivo*, técnica no invasiva de contacto con la que se obtienen imágenes de alta resolución de la superficie ocular a nivel celular, se pueden contrastar los cambios en el fenotipo del epitelio corneal y la pérdida de la microestructura del nicho limbar.⁴²⁻⁴⁴ En una córnea sana, las células epiteliales aladas presentan un citoplasma oscuro de bordes brillantes. En cambio, en una situación de SIL, se observan más difícilmente los bordes celulares, las células con fenotipo conjuntival aparecen hiperreflectivas, se observa un aumento del tamaño de las células basales del limbo y la pérdida de la estructura de las empalizadas de Vogt. Además, con esta técnica también puede observarse la presencia de vasos sanguíneos y células inflamatorias hiperreflectivas en el estroma.^{44,45}

INTRODUCCIÓN

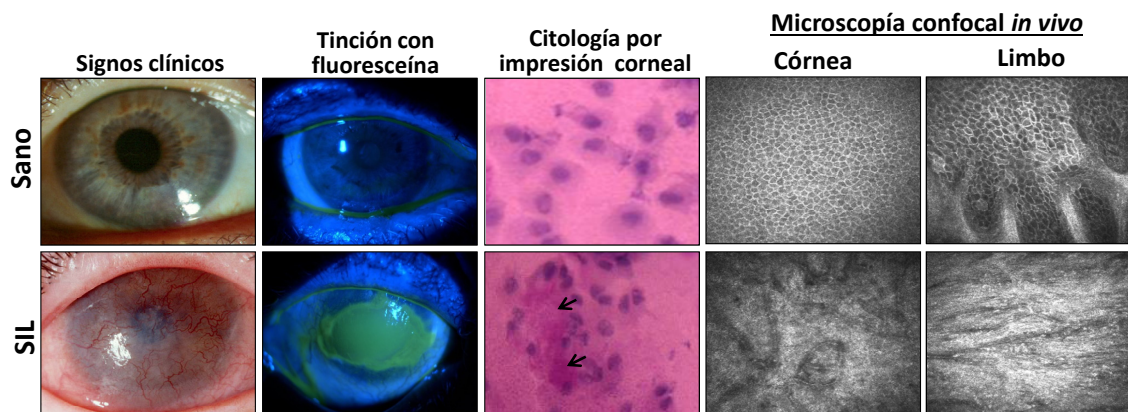


Figura 7. Signos clínicos y técnicas diagnósticas del SIL. Como signos clínicos se pueden observar la opacificación, la conjuntivalización y la neovascularización corneal superficial. Mediante la tinción con fluoresceína sódica (tinción verde) se ponen de manifiesto los defectos epiteliales corneales típicos. Las células caliciformes (específicas del tejido conjuntival) se observan en morado intenso (flechas negras) teñidas con PAS en las citologías por impresión corneal obtenidas en pacientes con SIL. Gracias a la microscopía confocal *in vivo* se observa la pérdida del fenotipo corneal y de la estructura del nicho limbar en pacientes con SIL. Imágenes cedidas por la Unidad Clínica de Inmunología Ocular del IOBA, a excepción de las imágenes de citología de impresión, cedidas por el laboratorio de Patología Ocular del IOBA.

2.4. Tratamiento

El primer paso en el manejo global del SIL es un tratamiento médico para optimizar el estado de la superficie ocular, ya que un microambiente más propicio favorecerá la supervivencia de las células madre limbares residentes y de las que pudieran ser trasplantadas. Para ello se trata en primer lugar médicamente la patología basal y la inflamación que presenta la superficie ocular antes de recurrir a los tratamientos quirúrgicos.

En pacientes con SIL parcial y siempre que se asegure la presencia de una población de células madre limbares suficiente para continuar regenerando el epitelio corneal, se puede realizar una queratoplastia o trasplante de córnea, la cual solo contiene un número finito de células epiteliales diferenciadas que necesitan ser renovadas. En los casos de SIL en los que estén afectados más de 90° del limbo, los trasplantes de córnea están condenados al fracaso. Debido a la ausencia de células madre en la córnea trasplantada, las células del epitelio de la misma se agotan en un lapso corto de tiempo. En estos casos, es necesario el aporte exógeno de una fuente de células madre.

Además, en aquellos casos en los que se presente una afectación de las capas más profundas de la córnea, debida normalmente a la patología inicial y no al SIL por sí mismo, se precisará la realización posterior de una queratoplastia si se desea recuperar la visión lo máximo posible.

Otro tratamiento de elección en pacientes con SIL parcial es el trasplante de membrana amniótica (MA) sobre la superficie ocular.⁴⁶ La MA es la capa más interna de la placenta y está compuesta por una monocapa epitelial, una membrana basal y un estroma, formado a su vez por tres capas mesenquimatosas (capa esponjosa, capa de fibroblastos y capa compacta). La MA tiene una serie de características que la hacen muy adecuada para su uso en Oftalmología.⁴⁷ Se trata de una membrana fuerte y resistente, pero flexible al mismo tiempo y muy adaptable a superficies curvas. La MA carece de vasos sanguíneos lo que, junto con la ausencia de expresión por parte de sus células de moléculas de HLA-A, B, C o DR, la confiere baja inmunogenicidad y evita su rechazo.⁴⁸ Además, la MA favorece la proliferación y migración celular, lo que contribuye a la epitelización⁴⁹ y previene la fibrosis.⁵⁰ Por otro lado, su acción antiinflamatoria y antiangiogénica puede ser muy beneficiosa en casos de SIL parcial.⁵¹ Por último, tiene un alto potencial antimicrobiano y antiviral.⁵² Debido a que este tratamiento tampoco aporta una fuente de células madre, sus funciones principales son el alivio sintomático y la mejora del estado de la superficie ocular en aquellos pacientes con SIL parcial.

El primer tratamiento quirúrgico en el que se aportó una fuente de células madre exógena fue el trasplante de tejido limbar, llevado a cabo por Kenyon y Tseng en 1989.⁵³ Este tratamiento se basa en la aportación de una porción de tejido limbar sano sobre el ojo afectado con SIL. Para ello, se lleva a cabo una limpieza previa de la superficie de la córnea, eliminando el epitelio enfermo o pannus. En casos unilaterales, los menos frecuentes, el tejido limbar puede ser obtenido del ojo contralateral sano del propio paciente (trasplante autólogo), lo que podría comprometer a este ojo a desarrollar un SIL debido a la gran cantidad de tejido retirado (unos 6 husos horarios). En los casos de SIL bilaterales, los de mayor prevalencia, no existe tejido limbar sano del

INTRODUCCIÓN

propio paciente, por lo que es necesario recurrir a tejido de donante cadáver (trasplante alogénico),⁵⁴ con el consiguiente riesgo de rechazo inmune. Los pacientes sometidos a estos trasplantes alogénicos deben ser inmunosuprimidos de forma prolongada, produciendo una elevada morbilidad y un importante aumento del gasto sanitario. Aunque esta técnica de trasplante tisular generó muy buenos resultados a corto plazo, más adelante se observó que su supervivencia a largo plazo era baja (no más de 3 años).^{55,56} Otra técnica de trasplante tisular, más reciente, consiste en fraccionar una biopsia del ojo contralateral y aplicar los fragmentos de tejido con pegamento de fibrina encima de la córnea dañada y, posteriormente, cubrir la superficie con MA.⁵⁷

Para afrontar los problemas de rechazo inmune y de la gran cantidad de tejido limbar necesario para su trasplante, se comenzaron a cultivar *in vitro* células procedentes de tejido limbar, tanto autólogo como alogénico. Cabe resaltar que, por un lado, el cultivo de las células epiteliales limbares implica la pérdida de inmunogenicidad^{58,59} y, por otra parte, el tamaño del tejido limbar necesario para su expansión *in vitro* es mucho menor que cuando este es trasplantado directamente. El trasplante no ya de tejido limbar, sino de células madre limbares expandidas *in vitro* fue llevado a cabo por primera vez por Pellegrini *et al.*⁶⁰ en 1997. Desde entonces, se han desarrollado multitud de estudios con el fin de optimizar el cultivo y el aislamiento de células madre limbares. Entre las técnicas utilizadas está la expansión de la población de células madre limbares sobre fibroblastos de ratón 3T3 que actúan de “*feeder layer*”, proporcionando una matriz para mejorar la adhesión celular, y factores de crecimiento que favorecen la proliferación celular. Por otro lado, se han empleado diferentes técnicas de aislamiento de las células limbares, bien a partir de pequeños explantes de tejido, o bien a partir de suspensiones celulares obtenidas tras la disgregación del epitelio limbar. Además, estas células han sido cultivadas *in vitro* para su posterior trasplante a la superficie ocular en MA y en matrices de fibrina (polímero biocompatible y biodegradable, formado mediante la coagulación del fibrinógeno, que promueve la adhesión y la proliferación celular).^{61,62} En los últimos años, se han estudiado diferentes soportes de diversa naturaleza para el cultivo y posterior trasplante de células a la superficie ocular. Entre

estos soportes se encuentran lentes de contacto y polímeros naturales o sintéticos. Algunos de los materiales más estudiados han sido polímeros naturales que se asemejan a la matriz extracelular del estroma corneal, como el colágeno, la fibroína de la seda y el quitosano, entre otros. Otros polímeros empleados para este fin han sido fabricados sintéticamente con ácido poliláctico o poliláctico-co-glicólico, policaprolactona, polimetacrilato, hidroxietilmetacrilato y polietilenglicol.^{61,63}

Otra de las estrategias terapéuticas estudiadas para el tratamiento del SIL ha sido el trasplante de células de mucosa oral expandidas *in vitro*, ya que poseen características comunes con las células epiteliales corneales.⁶⁴ A pesar de ello, y de la obtención de resultados esperanzadores en un primer momento, se ha visto que el trasplante de células de mucosa oral produce mayor vascularización que el trasplante de células madre epiteliales limbares.^{65,66} Además, en ocasiones, la patología de base causante del SIL también puede afectar a otras mucosas como la oral (penfigoide de las membranas mucosas, enfermedad de injerto contra huésped...), por lo que la eficacia de este tipo de trasplantes se vería comprometida en estos casos.

Actualmente, la estrategia terapéutica utilizada por muchos grupos de investigación clínica de todo el mundo, incluido el nuestro, es la del trasplante de células madre limbares expandidas *in vitro* sobre fibrina o MA.⁶⁷⁻⁷¹ No obstante, este tratamiento presenta diversas limitaciones y está bajo controversia.⁷²

2.5. Limitaciones del trasplante de células epiteliales limbares cultivadas *in vitro*

A pesar de ser el actual tratamiento de elección en casos de SIL más severos, el trasplante de células limbares cultivadas *in vitro* tiene una serie de limitaciones. En casos unilaterales, es posible realizar trasplantes autólogos de células madre epiteliales limbares cultivadas y expandidas *in vitro* a partir de una pequeña biopsia obtenida del ojo contralateral sano. Uno de los inconvenientes es que el paciente ha de ser sometido a una cirugía extra además de la realización del posterior trasplante. Pero quizás el principal inconveniente es que quedan excluidos, ya de entrada, todos los casos

INTRODUCCIÓN

bilaterales que, desgraciadamente, son la mayoría. Y, además, si se decidiera extraer la biopsia del ojo contralateral menos afectado, este podría aumentar la intensidad de su patología de base al eliminar una porción del limbo. Por ello, la alta incidencia de casos bilaterales hace necesaria la realización de trasplantes alogénicos de células epiteliales limbares cultivadas a partir de tejido obtenido de donantes cadáver. Los trasplantes alogénicos requieren la inmunosupresión del paciente trasplantado, con los consiguientes efectos secundarios y el incremento de los costes sanitarios. Además, tanto en un trasplante alogénico como en uno autólogo, la disponibilidad de células madre epiteliales limbares y la dificultad para cultivarlas y expandirlas son siempre factores limitantes. Esto hace que haya diversidad de métodos de obtención y expansión y, por lo tanto, una falta de consenso entre los diferentes laboratorios del mundo, lo que dificulta el establecimiento de una terapia definida y la realización de estudios comparativos. Además, no existe un marcador específico de células madre limbares, impidiendo la caracterización adecuada de los cultivos que se van a utilizar para el trasplante. Por todo ello, es absolutamente esencial encontrar una fuente extraocular de células madre que posea la capacidad de regenerar el epitelio corneal en los pacientes con SIL. Actualmente, se están desarrollando diversidad de ensayos preclínicos que estudian novedosos tratamientos para el SIL basados en el uso de otros tipos celulares.⁷² En los últimos años el empleo de células madre mesenquimales (MSCs) está ganando importancia en este campo. Debido a todas las características beneficiosas que presentan estas células y a su fácil disponibilidad y cultivo, las MSCs representan una interesante fuente alternativa de células madre para el tratamiento del SIL.

2.6. Modelos experimentales de SIL

Para abordar el estudio del SIL y de potenciales terapias para su tratamiento es necesario el conocimiento previo de la enfermedad y sus características. Una buena herramienta para ello es el empleo de modelos simulados de la enfermedad. En el campo que nos ocupa, ya se han desarrollado modelos *ex vivo* de daño corneal por causticación tanto en ojo de conejo,⁷³ como en ojo porcino,⁷⁴ y que ya han sido

utilizados en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas destinadas al trasplante de células epiteliales limbares. Además, el nicho limbar porcino ha sido descrito detalladamente, mostrando muchas similitudes con el nicho limbar humano.⁷⁴

Del mismo modo, para profundizar en las bases fisiopatológicas del SIL y poder así ensayar nuevas estrategias terapéuticas, se ha trabajado con diversidad de modelos experimentales de causticación corneal y de SIL desarrollados mediante la utilización de diferentes metodologías y en varias especies animales. Muchos de los trabajos publicados estudian la eficacia de diferentes tratamientos en modelos de causticación corneal, en los que no se ve afectado el limbo y, por tanto, no son realmente modelos de SIL. Estos modelos de causticación corneal han sido desarrollados en ratón, rata y conejo mediante la aplicación de NaOH sobre la córnea.⁷⁵⁻⁷⁸ Por otro lado, gran parte de los modelos experimentales de SIL consisten en una quemadura química en el limbo y, ocasionalmente, en la córnea, utilizando para ello principalmente NaOH, etanol o n-heptanol. En algunas ocasiones, además, la quemadura se ve complementada con la eliminación mecánica de los restos epiteliales mediante raspado con un cuchillito. Estos modelos han sido desarrollados en ratón, rata y conejo,⁷⁹⁻⁸³ y en ellos no se asegura la completa eliminación de las células limbares, ya que, aunque se suele corroborar la eliminación del epitelio corneal mediante tinción con fluoresceína sódica, las células madre epiteliales limbares se encuentran más protegidas en las empalizadas de Vogt y son más difíciles de eliminar. Los modelos de SIL más representados en la bibliografía son los basados en la eliminación quirúrgica del limbo o limbectomía, algunos de ellos combinados con una queratectomía o con una quemadura corneal. En estos modelos, desarrollados en ratón, conejo y cabra,⁸⁴⁻⁸⁸ se asegura en mayor medida la eliminación de las células madre limbares mediante la realización de la limbectomía. Además, la eliminación quirúrgica del tejido es más fácilmente controlable y reproducible que las quemaduras químicas. Por último, también se han desarrollado modelos de SIL en ratón mediante la administración tópica continuada de cloruro de benzalconio o mediante la exposición a luz ultravioleta.^{89,90} La mayoría de los modelos de SIL publicados hasta el momento son modelos totales de SIL, que afectan a los 360° del limbo, aunque existen algunos trabajos realizados en modelos parciales.^{91,92}

3. Terapia celular

Se considera producto de terapia celular somática todo aquel que contiene células o tejidos que han sido objeto de manipulación sustancial de modo que se hayan alterado sus características biológicas, funciones fisiológicas o propiedades estructurales pertinentes para el uso clínico previsto. También son considerados medicamentos de terapia celular las células o tejidos que no se pretenden destinar a la misma función esencial en el receptor y en el donante. Los medicamentos de terapia celular somática presentan propiedades para ser usados por seres humanos, o administrados a los mismos, con objeto de tratar, prevenir o diagnosticar enfermedades mediante la acción farmacológica, inmunológica o metabólica de sus células o tejidos (EC 1394/2007; BOE-7135/2010, orden SAS/1144/2010).

3.1. Células madre

Una célula madre es una célula no especializada que tiene la capacidad de dividirse de forma indefinida a lo largo de la vida del organismo y puede diferenciarse a un determinado tipo celular en presencia de las señales adecuadas en el microentorno que la rodea (Figura 8).

Las características que hacen a estas células diferentes al resto de células de un organismo son:

- Capacidad proliferativa: tienen capacidad de regenerarse y dividirse durante largos periodos de tiempo.
- Estado indiferenciado: son células no especializadas e inmaduras.
- Capacidad de diferenciación: pueden dar lugar (diferenciarse) al menos a un tipo celular especializado en las condiciones adecuadas.
- Autorrenovación: poseen la capacidad de dividirse de forma asimétrica, dando lugar a una célula hija idéntica que se mantendrá en estado indiferenciado y a

otra célula hija que avanzará hacia la diferenciación (célula amplificada transitoria).

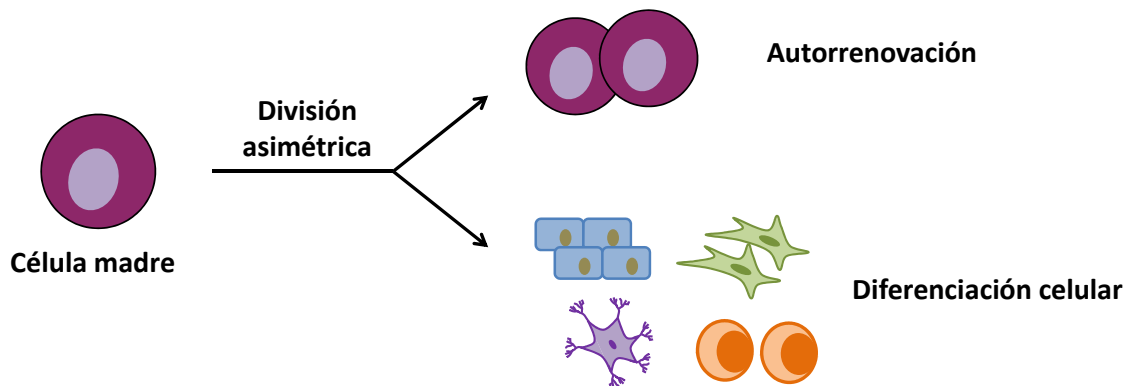


Figura 8. Características de las células madre. Las células madre se caracterizan por mantenerse indiferenciadas, autorrenovarse y originar células hijas capaces de diferenciarse a distintos linajes celulares. Imagen modificada de la original de Catherine Twomey, para la *National Academics* "Understanding Stem Cells: An overview of the Science and Issues".

Las células madre pueden ser clasificadas según su capacidad de diferenciación. Las células madre totipotentes son aquellas capaces de producir un individuo completo (tejido embrionario y extraembrionario), ya que pueden generar todas las células del organismo. Estas células se encuentran únicamente en el cigoto y en las células producidas durante las dos primeras divisiones del mismo. Las células madre pluripotentes tienen la capacidad de diferenciarse a células de tejidos procedentes de cualquiera de las 3 capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo). Las células madre multipotentes son aquellas que pueden generar diferentes tipos celulares, pero todos ellos procedentes de la misma capa embrionaria de la que proceden. Las células madre unipotentes pueden diferenciarse únicamente a un tipo celular del tejido del que proceden.

3.1.1. Células madre mesenquimales

Las MSCs son células madre adultas originadas a partir del mesodermo y que se encuentran en el estroma de numerosos tejidos en el individuo adulto. Aunque la médula ósea y el tejido adiposo son los tejidos más utilizados para la obtención de

INTRODUCCIÓN

MSCs, también se encuentran en tejidos como el músculo, el cartílago, el periostio, la pulpa dental, el cordón umbilical y la placenta, entre otros.^{93,94}

Caracterización

Las MSCs fueron descubiertas y aisladas por primera vez por Friedenstein *et al.*⁹⁵ Desde entonces, han ido ganando cada vez más importancia y se han ido descubriendo las atractivas propiedades que presentan para su uso en terapia celular. Durante este tiempo, se han utilizado diversidad de métodos de aislamiento y cultivo entre los diferentes grupos de investigación que han trabajado con ellas. Esto, junto con las diferentes fuentes utilizadas para su obtención y la heterogenicidad de las poblaciones obtenidas, hizo necesario que la Sociedad Internacional de Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy*; ISCT) estableciera unos criterios mínimos para poder definir a una población celular como MSCs:⁹⁶

- 1) Ser adherentes al plástico cuando se cultivan *in vitro* en una placa de cultivo en condiciones estándar.
- 2) Presentar un inmunofenotipo determinado. Más del 95% de la población debe expresar los marcadores CD105, CD73 y CD90, y menos del 2% de la población puede expresar los marcadores CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD19 o CD79 α y HLA de clase II (HLA-DR).

El marcador CD105 o endoglina es una proteína homodimérica transmembrana que se expresa de forma mayoritaria en el endotelio vascular. Esta proteína forma parte del complejo del receptor del factor de crecimiento transformante β (TGF- β).⁹⁷ La endoglina regula diversas funciones celulares como la adhesión, la migración, la permeabilidad, la apoptosis y la proliferación.⁹⁸

El marcador CD73 es una nucleotidasa (ecto-5-prima-nucleotidasa) que cataliza la conversión de mononucleótidos en nucleósidos. Es un dímero unido a través de un

glicosil-fosfatidil-inositol a la cara externa de la membrana plasmática en una gran variedad de tipos celulares.⁹⁹

El marcador CD90 o Thy-1 es una proteína de superficie de la familia de las inmunoglobulinas. Se expresa en tejido nervioso, conectivo, en líneas celulares estromales y en algunas células CD34+ de médula ósea. Esta proteína interviene en las interacciones célula-matriz extracelular o célula-célula en procesos inflamatorios.¹⁰⁰

El CD45 es una proteína tirosina fosfatasa presente en todos los leucocitos (es el marcador pan-leucocitario). Su función es la de regular la señalización del receptor antigénico en las células inmunes, especialmente en linfocitos T y B.¹⁰¹

El CD34 es una proteína transmembrana glicosilada expresada en las células progenitoras hematopoyéticas. Sus funciones están relacionadas con la morfogénesis y la migración de las células del sistema inmune.¹⁰²

Los marcadores CD14 y CD11b son proteínas de superficie expresadas por monocitos y macrófagos. El CD14 puede presentarse unido a la membrana celular mediante un glicosilfosfatidilinositol o de forma soluble. El CD11b es una integrina que forma parte del receptor del complemento CR3. Ambos marcadores llevan a cabo funciones de reconocimiento de patógenos bacterianos.^{103,104}

Los marcadores CD19 y CD79 α son proteínas de la familia de las inmunoglobulinas expresadas por los linfocitos B. Ambas proteínas forman parte del complejo del receptor en los linfocitos B.^{105,106}

El HLA de clase II o HLA-DR es el complejo mayor de histocompatibilidad, responsable de la presentación de antígenos al sistema inmune para la activación de linfocitos T en los casos en los que se reconozca dicho antígeno como extraño. Esta molécula es expresada principalmente por macrófagos, células dendríticas y linfocitos B. Está ausente en MSCs a menos que estas células hayan sido previamente estimuladas con interferon- γ (IFN- γ).¹⁰⁷

INTRODUCCIÓN

3) Presentar capacidad de diferenciación multilinaje. Por último, para que las células aisladas de los diferentes tejidos adultos puedan ser consideradas como MSCs, debe demostrarse, al menos, su capacidad de diferenciación *in vitro* hacia adipocitos, osteoblastos y condroblastos bajo las condiciones de cultivo específicas para la inducción de la diferenciación que corresponda en cada caso.

Capacidad de diferenciación *in vitro*

En un primer momento, las MSCs fueron definidas con respecto a su capacidad de diferenciación como multipotentes, es decir, con capacidad para diferenciarse únicamente a tejidos procedentes del mesodermo como son los tejidos óseo, cartilaginoso, adiposo o muscular, entre otros. Más adelante, se descubrió la capacidad de transdiferenciación de las MSCs. Las MSCs pueden diferenciarse a células adultas propias de tejidos originados del endodermo, como las células hepáticas, pancreáticas o pulmonares, o incluso a células de origen ectodérmico como las células de tipo epitelial o neuronal.⁹³

El proceso de diferenciación a un linaje u otro está determinado por la presencia de factores específicos en el microambiente en el que se encuentran las MSCs. Este microentorno vendrá marcado de forma natural por el tejido en el que se encuentren las células en el momento de su diferenciación y por las señales que estén recibiendo. La diferenciación puede ser inducida y controlada *in vitro* mediante la adición de determinados factores al medio de cultivo.^{93,94}

La diferenciación adipogénica *in vitro* puede ser inducida con medios suplementados con dexametasona, isometilbutilxantina e indometacina. Durante esta diferenciación se observa la aparición de vacuolas lipídicas en el citoplasma de las células.

En el caso de la diferenciación osteogénica, algunos de los factores necesarios para la diferenciación *in vitro* son el ácido ascórbico-2-fosfato, el β -glirerolfosfato y el factor de crecimiento de fibroblastos β (FGF- β). Durante este proceso de diferenciación se producen depósitos de minerales (calcio y fosfato).

Para inducir la diferenciación condrogénica *in vitro* es necesaria la agregación de gran cantidad de células (técnica de la micromasa), y su posterior cultivo con ácido ascórbico, ITS (insulina-transferrina-selenio), TGF- β y proteínas morfogenéticas óseas (BMPs). Los condrocitos van secretando matriz extracelular rica en proteoglicanos a medida que se van diferenciando.

La diferenciación *in vitro* a miocitos, o incluso a cardiomiocitos, puede inducirse cultivando las MSCs en presencia de azacitidina y anfotericina B.

La diferenciación neural se induce en presencia de DMSO, FGF y factor de crecimiento neural (NGF). Las MSCs han podido ser diferenciadas *in vitro* a neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y células de Schwann.

Existen publicaciones que han demostrado que las MSCs pueden diferenciarse *in vitro* hacia determinadas estirpes de células epiteliales mediante la realización de co-cultivos celulares y/o mediante la suplementación de los medios de cultivo con determinados cócteles de factores de crecimiento concretos como los factores de crecimiento epitelial (EGF), de queratinocitos (KGF) y de hepatocitos (HGF), y/o otros suplementos.¹⁰⁸⁻¹¹² Además, se ha demostrado que las MSCs pueden contribuir a la regeneración de tejidos epiteliales tales como el epitelio bronquial y alveolar,^{113,114} el epitelio glomerular y de los túbulos renales,^{115,116} el epitelio gastrointestinal,¹¹⁷ el epitelio pigmentario de la retina^{118,119} y el epitelio corneal,¹²⁰ entre otros.

Propiedades inmunológicas

Las MSCs poseen características no inmunogénicas, lo que permite la realización de trasplantes alogénicos sin necesidad de inmunosuprimir al receptor ya que no van a ser reconocidas por el organismo como extrañas. Esta característica se la confiere la baja expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) de tipo I (HLA-I) y la ausencia total de expresión del HLA de tipo II (HLA-II) y de las moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86.¹²¹ Estas moléculas, en condiciones normales, son las responsables de la presentación de antígenos al sistema inmune y de la activación

INTRODUCCIÓN

del mismo cuando los antígenos son reconocidos como extraños. Mientras que la ausencia de expresión de HLA-II hace que las MSCs escapen al reconocimiento por el sistema inmune, la baja expresión de HLA-I juega un papel protector frente a las células *natural killer* (NK), ya que estas últimas reconocen y destruyen células que no expresan moléculas HLA-I.¹²² Gracias a todo ello, las MSCs son bien toleradas tras su trasplante en un receptor, incluso aunque se trate de un trasplante alogénico o xenogénico.

Por otro lado, la ausencia de expresión por parte de las MSCs de las moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86 juega un papel importante en la modulación de la respuesta inmune mediada por los linfocitos T. Durante la activación del sistema inmune, los linfocitos T se activan a través de las moléculas de HLA-I y las moléculas coestimuladoras. En ausencia de estas últimas, los linfocitos T entran en un estado denominado anergia, en el cual no son activos.¹²³ Además, las MSCs pueden inducir la activación de linfocitos T reguladores.¹²⁴ Al mismo tiempo, se ha descrito que las MSCs también previenen la maduración y proliferación de células dendríticas¹²⁵ y la proliferación, diferenciación y migración de linfocitos B.¹²⁶

Las MSCs tienen capacidad inmunomoduladora no solo mediante el contacto célula-célula, sino también mediante la liberación de determinados factores de manera paracrina al medio extracelular. Algunos de los factores inmunosupresores secretados por las MSCs son la interleuquina (IL) 10 (IL-10), la IL-6 y el TGF- β . En condiciones inflamatorias se estimula la secreción, por parte de las MSCs, de otros factores antiinflamatorios como el óxido nítrico, la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) y la prostaglandina E2 (PGE2),¹²⁴ entre otros. En concreto, mediante la secreción de IDO las MSCs tienen la capacidad de promover la apoptosis de los linfocitos T activados mientras que inhiben la apoptosis de aquellos linfocitos T que se encuentran en un estado quiescente.¹²⁷ Además, factores como la IDO, la PGE2 y el TGF- β inhiben la proliferación y la secreción de citoquinas por parte de las células NK.^{107,128-130}

Propiedades tróficas

En presencia de un ambiente adverso debido a un daño en el tejido, las MSCs son estimuladas a producir gran diversidad de factores que intervienen en la regeneración tisular. Mediante la secreción de factores solubles son capaces de reducir no solo la inflamación, sino también la apoptosis y la fibrosis, así como de estimular la regeneración celular de los tejidos activando, entre otras cosas, a las células progenitoras endógenas.¹³¹

Algunos de los factores antiapoptóticos secretados por las MSCs son la IL-6, el TGF- β y el HGF; de esta manera, protegen a las células residentes en el área, favoreciendo su posterior proliferación para recuperar el tejido dañado. Por otro lado, las MSCs secretan factores anti-fibróticos como el HGF y el TSG-6 (*Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein*).¹³² Además, en determinadas condiciones, las MSCs tienen la capacidad de secretar factores angiogénicos como el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) y la metaloproteínasa 9 (MMP-9), que promueven la formación de vasos. En cambio, en otras situaciones, las MSCs pueden actuar como antiangiogénicas mediante la liberación de los factores angiostatina y trombospondina-1 (TSP-1), factor antiangiogénico que actúa inhibiendo el efecto angiogénico del VEGF.^{133,134} Por ello, el equilibrio entre estos factores ha de estar muy bien regulado para producir un efecto u otro, dependiendo del microentorno en el que se encuentren las células.

Migración o homing

Las quimiocinas son una familia de pequeñas glicoproteínas producidas en los tejidos durante una lesión. El aumento de estas quimiocinas inflamatorias en el tejido dañado es clave para la quimioatracción y migración de las células inflamatorias a estos tejidos diana. Se ha demostrado que las MSCs administradas de forma sistémica tienen la capacidad de migrar hasta los tejidos dañados para llevar a cabo allí sus acciones terapéuticas. Esta capacidad se debe a la expresión de diversidad de receptores de quimiocinas en la superficie de las MSCs. Una de las vías de quimioatracción de MSCs más importante es la mediada por la molécula CXCL12 o SDF-1 y su receptor CXCR4,

INTRODUCCIÓN

expresado en MSCs. Además, las MSCs expresan otras moléculas de adhesión como las integrinas y las selectinas, importantes en los procesos de adhesión que se produce durante la migración.^{129,135}

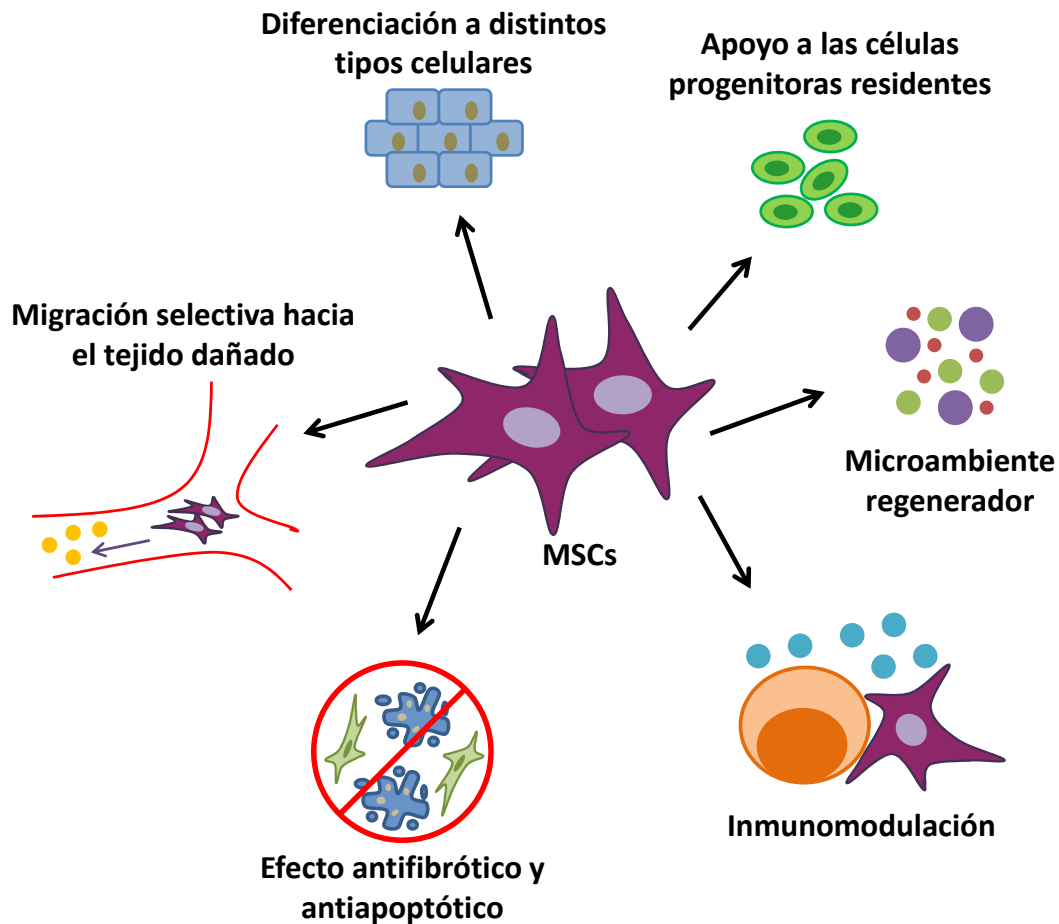


Figura 9. Esquema resumen de las propiedades de las MSCs. Las MSCs tienen capacidad de diferenciación multilineaje, ayudan a las células progenitoras residentes en los tejidos, secretan factores regeneradores, son inmunomoduladoras, antifibróticas y antiapoptóticas, y poseen la capacidad de migrar a tejidos dañados. Imagen modificada de la original de *Holan V, Javorkova E. Mesenchymal stem cells, nanofiber scaffolds, and ocular surface reconstruction. Stem Cell Rev. 2013;9:609-19.*

MSCs de tejido adiposo

En 2001, se identificaron y caracterizaron, por primera vez, las MSCs derivadas de tejido adiposo (*Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells; AT-MSCs*) a partir de un lipoaspirado humano.¹³⁶ Desde entonces, las AT-MSCs han representado una alternativa interesante a las MSCs de médula ósea (*Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells; BM-MSCs*).

Partiendo de un tamaño equivalente de tejido, se pueden obtener aproximadamente 500 veces más células a partir de tejido adiposo que de médula ósea. En clínicas estéticas de todo el mundo, se realizan numerosas liposucciones y el tejido graso obtenido es normalmente desechado, por lo que puede servir como una valiosa fuente de células madre apta para uso terapéutico y de investigación. Por otro lado, se ha descrito que las AT-MSCs son más estables morfológica y genéticamente que las BM-MSCs durante largos periodos de cultivo *in vitro*. Además, las AT-MSCs poseen mayor capacidad de proliferación, menor tasa de senescencia y mantienen mayor potencial de diferenciación a lo largo del cultivo comparadas con las BM-MSCs.¹³⁷ Por último, también se ha demostrado mayor capacidad inmunomoduladora por parte de las AT-MSCs en comparación con las BM-MSCs. Las AT-MSCs inhiben más eficazmente la producción de inmunoglobulinas y la diferenciación y maduración de los monocitos. Además, la secreción de la citoquina inmunosupresora IL-10 es estimulada en mayor medida por las AT-MSCs que por las BM-MSCs.¹³⁸

MSCs y regeneración corneal

En los últimos años, varios grupos de investigación han estudiado la capacidad de diferenciación *in vitro* de las BM-MSCs hacia células epiteliales corneales.¹³⁹ Gu *et al.*⁸³ observaron la expresión del marcador CK3 en algunas de las BM-MSCs de conejo que habían sido co-cultivadas con células madre limbares o con su medio condicionado. Jiang *et al.*⁸¹ demostraron que las BM-MSCs de rata expresaban el marcador CK12 cuando eran co-cultivadas durante 7 días con fibroblastos limbares de rata. Otro grupo de investigación observó que las BM-MSCs de rata, cultivadas en una córnea decelularizada, adquirirían una morfología similar a la de las células epiteliales expresando el marcador de epitelio corneal diferenciado CK3.¹⁴⁰ Además, varios grupos de investigación han demostrado que las BM-MSCs humanas pueden adquirir un fenotipo similar al epitelial corneal cuando se cultivan con un medio de cultivo para células madre limbares.^{82,141,142} Por último, se ha descrito que las AT-MSCs de ratón transfectadas con Pax-6 pueden adquirir una morfología similar a la epitelial y expresar el marcador de epitelio corneal CK12.¹⁴³

INTRODUCCIÓN

La capacidad de regeneración corneal de las BM-MSCs expandidas y trasplantadas ha sido estudiada utilizando membrana amniótica y/o matrices de fibrina en modelos animales de SIL en rata y conejo.^{80-83,87,144,145} En estos estudios, mientras que algunos de los autores atribuyen el potencial terapéutico regenerador corneal de las BM-MSCs únicamente a sus propiedades inmunomoduladoras, otros afirman que estas células, una vez trasplantadas, son además capaces de favorecer la regeneración de la superficie ocular diferenciándose a células con fenotipo propio de epitelio corneal. Por otro lado, también se ha demostrado que la inyección subconjuntival de BM-MSCs en un modelo de quemadura corneal en rata inhibe la neovascularización y promueve la regeneración del epitelio corneal,⁷⁷ y que las BM-MSCs trasplantadas sistémicamente en conejos con quemadura química corneal migran, se injertan en las córneas dañadas y favorecen su regeneración mediante proliferación y diferenciación.¹⁴⁶ Además, se ha comprobado que la aplicación tópica de BM-MSCs, o de su medio condicionado de crecimiento, en la superficie ocular de ratas con quemadura corneal contribuye a restablecer el nicho de las células madre epiteliales limbares mediante su actividad antiangiogénica y antiinflamatoria.¹⁴⁷ En otro estudio reciente, se ha demostrado también el papel antiangiogénico y antiinflamatorio de las BM-MSCs al ser expandidas sobre una membrana sintética, formada por nanofibras de ácido poliláctico, y posteriormente trasplantadas sobre la superficie ocular de un modelo de daño corneal en conejo.¹⁴⁸ Además, en dos trabajos en los que se administraron BM-MSCs por vía intraperitoneal o intravenosa en ratones se observó la acción antiinflamatoria de estas células en córneas que habían sido previamente dañadas mediante quemadura con etanol.^{79,149}

En diciembre de 2014, finalizó un ensayo clínico fase I-II llevado a cabo por nuestro grupo de investigación, en colaboración con la Unidad de Producción Celular del Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM) de la Universidad de Valladolid, con la finalidad de comprobar la hipótesis de que la eficacia del trasplante alogénico de BM-MSCs es al menos igual a la del trasplante alogénico de células madre epiteliales limbares para el tratamiento del SIL (EudraCT: 2010-203535-42; ClinicalTrials.gov:

NCT01562002). Los resultados obtenidos corroboraron dicha hipótesis y están en vías de publicación.

Estudios recientes han aportado indicios del papel beneficioso que también pueden tener las AT-MSCs en la regeneración de la córnea y, más concretamente, en la regeneración del epitelio corneal. Martínez-Conesa *et al.*¹⁵⁰ mostraron que las AT-MSCs expresan de forma basal marcadores típicos de epitelio corneal, indicando que éstas células podrían poseer cierta capacidad intrínseca para regenerar el epitelio corneal. Además, recientemente se ha publicado un estudio en el que se ha demostrado que la administración tópica de MSCs de grasa orbitaria promueve la recuperación del epitelio corneal en ratones a los que se les ha inducido una herida corneal mediante quemadura química,⁷⁵ y otros dos grupos de investigación han obtenido resultados positivos en la regeneración del epitelio corneal en modelos animales de quemadura corneal en rata y conejo a los que se les administraba AT-MSCs de forma tópica⁷⁶ o mediante inyección subconjuntival,⁷⁸ respectivamente. Otro trabajo reciente ha demostrado la capacidad de las AT-MSCs para disminuir los defectos epiteliales y el grado de opacidad de la córnea tras su trasplante a la superficie ocular en lentes de contacto esclerales en un modelo de quemadura corneal en conejo.¹⁵¹ Por último, existe un único estudio en humanos en el que se muestran resultados muy prometedores del potencial terapéutico de las AT-MSCs en la regeneración corneal. En este estudio se muestra que la administración tópica de AT-MSCs autólogas en un paciente con defectos epiteliales persistentes mejora de forma muy significativa el estado de la superficie ocular.¹⁵²

Por otro lado, varios grupos de investigación han demostrado la capacidad de las AT-MSCs para regenerar el estroma corneal. Se ha demostrado la capacidad de diferenciación de las AT-MSCs hacia queratocitos tanto *in vitro*,^{153,154} como *in vivo*.^{155,156}

JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACIÓN

La regeneración continua del epitelio corneal es esencial para el mantenimiento de la integridad y la transparencia de la córnea. De este cometido son responsables las células madre epiteliales limbares localizadas en la base de epitelio del denominado limbo esclero-corneal. La disfunción de estas células o de su nicho desencadena un cuadro clínico conocido como SIL cuyas principales secuelas son ceguera de origen corneal, dolor crónico y disminución notable de la calidad de vida.

Según la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades corneales son la segunda causa de pérdida de visión después de las cataratas, afectando a más de 10 millones de personas en todo el mundo.¹⁵⁷ Entre éstas, se estima que el SIL constituiría la causa de aproximadamente el 50% de los casos. Los pacientes con SIL son malos candidatos al trasplante de córnea y, de hecho, constituyen fracasos sistemáticos, ya que el epitelio del injerto donante, una vez agotado, no tiene posibilidades de regenerarse al no existir un limbo receptor sano. Por este motivo, el trasplante de células madre epiteliales limbares expandidas *in vitro* es, a día de hoy, el tratamiento de elección para estos pacientes. A pesar de representar este uno de los primeros y más claros éxitos de la medicina regenerativa, este tratamiento no está exento de limitaciones. En casos de SIL unilateral, es posible realizar trasplantes autólogos de células madre epiteliales limbares cultivadas y expandidas *in vitro* a partir de una pequeña biopsia obtenida del ojo contralateral sano. Sin embargo, la alta incidencia de casos bilaterales hace necesaria la realización de trasplantes alogénicos de células madre epiteliales limbares cultivadas a partir de tejidos obtenidos de donantes cadáver. Pese a que las células en cultivo pierden parte de su inmunogenicidad, los trasplantes alogénicos requieren la inmunosupresión del paciente trasplantado, con los consiguientes efectos secundarios y el incremento de los costes sanitarios. Además, tanto si se trata de un trasplante alogénico como de uno autólogo, la disponibilidad de células madre epiteliales limbares es siempre un factor limitante, por lo que es absolutamente esencial tratar de encontrar una fuente extraocular de células madre que posea la capacidad de regenerar el epitelio corneal en los pacientes con SIL.

JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, las MSCs han adquirido una gran relevancia en el campo de la terapia celular y la medicina regenerativa debido a su elevado potencial terapéutico. Las MSCs son células no inmunogénicas, por lo que los trasplantes alogénicos de las mismas no requieren la inmunosupresión del receptor. Poseen capacidad de diferenciación multi/pluri-potente, lo que les permite contribuir a la reparación de tejidos dañados mediante su integración, proliferación y diferenciación. Además, son capaces de migrar hacia los tejidos dañados o patológicos y, una vez allí, promover la regeneración tisular mediante la secreción de moléculas tróficas que reducen la inflamación, la apoptosis y la fibrosis, activando al mismo tiempo a las células progenitoras residentes.

Teniendo en cuenta todas estas premisas, nuestro grupo de investigación comenzó un ensayo clínico en el año 2012 con el objetivo de poder comprobar la hipótesis de que el trasplante de BM-MSCs era, al menos, igual de seguro y eficaz que el trasplante de células madre epiteliales limbares (EudraCT: 2010-203535-42; ClinicalTrials.gov: NCT01562002). No obstante, existen ya evidencias que apuntan a que el tejido adiposo es una fuente de MSCs más eficiente y segura que la médula ósea ya que es más abundante y accesible, la técnica de extracción es menos invasiva, proporciona un mayor rendimiento de obtención de MSCs (500 veces más que a partir de médula ósea), las AT-MSCs mantienen durante más tiempo la capacidad proliferativa y la pluripotencialidad que las BM-MSC, poseen menor tasa de senescencia y son más estables morfológica y genéticamente que las BM-MSCs durante largos periodos de cultivo *in vitro*.

En este contexto, esta tesis doctoral pretende establecer las bases que permitan demostrar que las AT-MSCs pueden servir para reparar la superficie ocular dañada por deficiencia de células madre de limbo.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Las hAT-MSCs son capaces de adquirir *in vitro* un fenotipo similar al epitelio corneal. Además, el trasplante de dichas células en la superficie ocular es capaz de mejorar el epitelio corneal fracasado por daño del nicho de sus células madre en un modelo experimental *in vivo* de síndrome de insuficiencia límbica.

OBJETIVOS

1. Evaluar el potencial de diferenciación *in vitro* de las hAT-MSCs a células con un fenotipo similar al epitelial corneal.
2. Determinar la dosis de hAT-MSCs más adecuada para la realización de un trasplante utilizando un modelo *ex vivo* de daño corneal.
3. Desarrollar un modelo experimental *in vivo* de fracaso de la superficie ocular por deficiencia de células madre de limbo.
4. Analizar la tolerancia y la eficacia del trasplante de hAT-MSCs para disminuir el daño corneal por deficiencia de células madre de limbo en el modelo experimental desarrollado en el objetivo 3.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los experimentos llevados a cabo durante el desarrollo de la presente tesis doctoral fueron aprobados por la Comisión de Investigación del IOBA, por el Comité Ético de Investigación Clínica de la Universidad de Valladolid y por el Comité Ético de Experimentación y Bienestar Animal de la Universidad de Valladolid. Además, la experimentación realizada siguió los principios de la Declaración de Helsinki para la utilización de tejidos humanos y las normas de ARVO (Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Visual Research) para el uso de animales en investigación en oftalmología. Todos los procedimientos realizados con animales se llevaron a cabo por personal acreditado con la categoría B o C para el manejo de animales de experimentación y fueron supervisados por veterinarios cualificados.

Los procedimientos detallados a continuación que comprendan la manipulación de células vivas se llevaron a cabo en el laboratorio de cultivos celulares del IOBA bajo condiciones de esterilidad, utilizando una campana de flujo laminar irradiada con luz ultravioleta y limpiando las superficies de la misma con una solución de etanol al 70% (v/v) en agua.

Los aparatos y materiales utilizados para realizar las técnicas descritas a continuación se encuentran detallados en el anexo.

1. Aislamiento y cultivo de hAT-MSCs

Las hAT-MSCs fueron aisladas a partir de lipoaspirados obtenidos en una clínica médico-estética (Clínica Europa) de Valladolid. El consentimiento informado fue correctamente cumplimentado y firmado por parte de todos los donantes conforme a la legislación vigente para la donación de tejidos y células humanas. Las hAT-MSCs, procedentes de 6 donante diferentes, fueron aisladas siguiendo el protocolo descrito previamente por Zuk *et al.*¹³⁶ El contenido de los lipoaspirados fue dividido en tubos de centrífuga de 50 ml, dejando volumen suficiente para completarlo con tampón fosfato salino (*Phosphate*

MATERIALES Y MÉTODOS

Buffered Saline, PBS) con el fin de lavar la muestra. Tras dos ciclos de lavado con PBS y centrifugación a 277 g durante 5 minutos, las muestras fueron incubadas con colagenasa tipo I al 0,075% durante 30 minutos a 37°C en agitación con el fin de disgregar el tejido adiposo. Posteriormente, la colagenasa fue inactivada con suero fetal bovino (FBS) y las muestras fueron centrifugadas a 277 g durante 5 minutos. La fracción en suspensión fue eliminada y el sedimento celular, debido a su alto contenido en células sanguíneas (eritrocitos en su mayoría), fue sometido a dos pasos de lisis eritrocitaria de 10 minutos cada uno con NH₄Cl 160 mM en agitación y a temperatura ambiente. La muestra obtenida fue filtrada en varios pasos a través de filtros de nailon de tamaño de poro decreciente (100 µm y 40 µm) para eliminar restos de tejido no disgregado (Figura 10). La fracción celular estromal resultante fue sembrada en frascos de cultivo y mantenida en un incubador a 37°C, al 5% de CO₂ y 95% de humedad con el medio de cultivo especificado en la Tabla 1. En condiciones normales, las hAT-MSCs fueron cultivadas hasta el pase (P) 3-4 en preconfluencia, de modo que cuando el cultivo alcanzó un 90% de confluencia las células fueron levantadas mediante incubación con tripsina-ácido etildiaminotetraacético (EDTA) al 0,05% y sembradas a una densidad aproximada de 3000-6000 células/cm². A partir de ahora en el presente trabajo estas condiciones serán nombradas como condiciones estándar para el cultivo de las hAT-MSCs.

Tabla 1. Medio de cultivo utilizado para las hAT-MSCs. DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco; FBS: suero fetal bovino.

	Concentración final
DMEM bajo en glucosa (1 g/L), piruvato sódico 1 mM, GlutaMAX™	1
FBS	10%
Penicilina - Estreptomicina	100 U/ml - 100 µg/ml

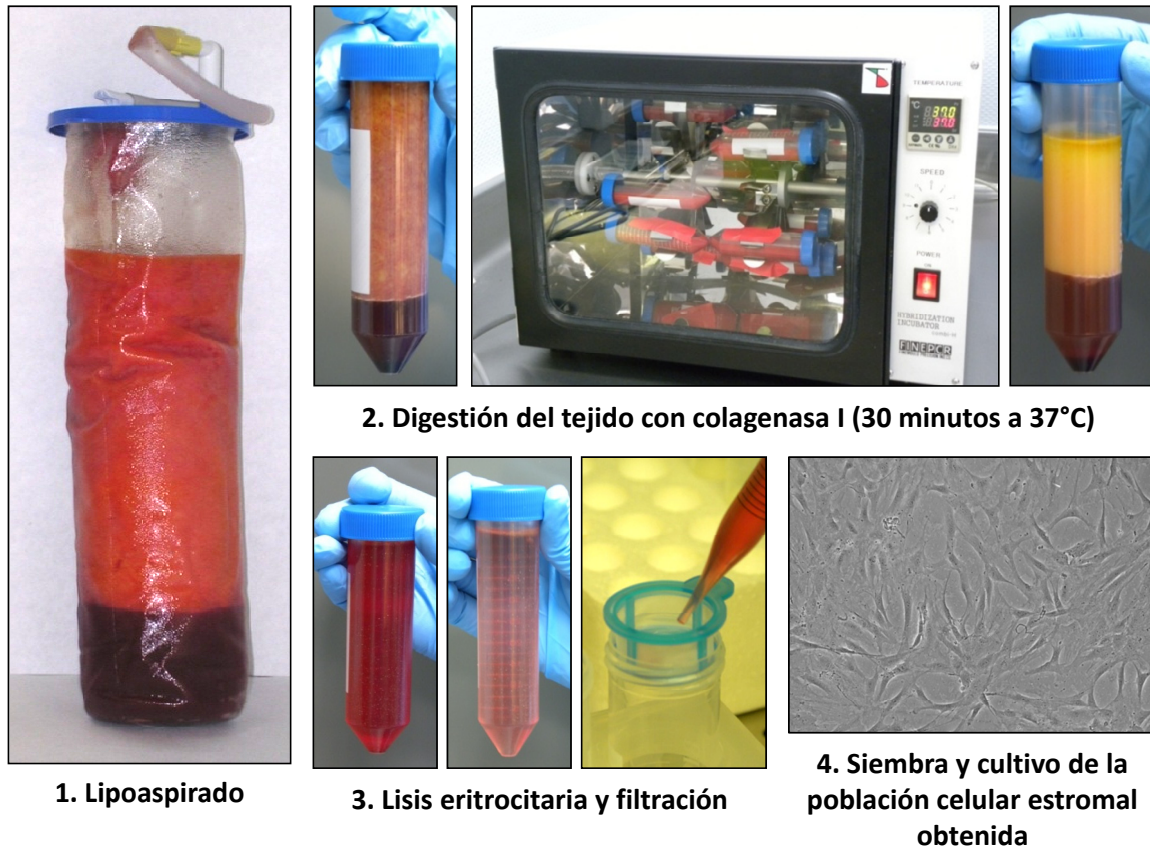


Figura 10. Metodología seguida para el aislamiento de hAT-MSCs a partir de lipoaspirados.

2. Cultivo de la línea celular de epitelio corneal humano HCE (*Human Corneal Epithelium*)

La línea celular de epitelio corneal humano HCE¹⁵⁸ fue amablemente cedida a nuestro laboratorio por el Dr. Arto Urtti (Universidad de Helsinki, Finlandia)¹⁵⁹. El cultivo de las células HCE se llevó a cabo en frascos de cultivo mantenidos con el medio descrito en la Tabla 2 en un incubador a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Cuando las células alcanzaron confluencia fueron levantadas de los frascos de cultivo con tripsina-EDTA al 0,25%.

Tabla 2. Medio de cultivo utilizado para la línea celular de epitelio corneal humano HCE. DMEM/F12: Medio Eagle modificado por Dulbecco/mezcla de nutrientes F12; FBS: suero fetal bovino; DMSO: dimetil sulfóxido; EGF: factor de crecimiento epidérmico.

	Concentración final
DMEM-F12-GlutaMAX™, 3,1 g/L glucosa y piruvato sódico 1mM	1:1
FBS	15%
DMSO	0,5%
Toxina colérica	0,1 µg/ml
EGF	0,01 µg/ml
Insulina	5 µg/ml
Penicilina - Estreptomicina	62,5 U/ml - 62,5 µg/ml

3. Aislamiento y cultivo de fibroblastos limbares humanos

Los fibroblastos limbares (FL) utilizados para condicionar el medio de cultivo de hAT-MSCs fueron obtenidos de botones corneo-limbo-esclerales de 10 donantes cadáver no aptos para trasplante a través del Banco de Ojos Barraquer (Barcelona, España) con el cual se tiene firmado un acuerdo de cesión para este fin. Tras retirar el exceso de tejido escleral, conjuntival y el iris, el botón corneal fue trepanado con un trepano de 7,5 mm de diámetro, reteniendo el anillo limboescleral. El epitelio limbar fue retirado mediante incubación con dispasa (1,2 U/ml), durante 2 horas a 37°C, y utilizado en otro proyecto llevado a cabo por nuestro grupo de investigación. El tejido estromal resultante fue troceado con unas tijeras en fragmentos de aproximadamente 1 mm² e incubado con 2 mg/ml de colagenasa I, durante toda la noche a 37°C. Una vez finalizada la incubación, se añadió FBS para detener la acción enzimática de la colagenasa I y el tejido se disgregó mecánicamente con la ayuda de una micropipeta de 1000 µl (Figura 11). La solución resultante se centrifugó a 277 g durante 5 minutos para decantar las células obtenidas, que fueron sembradas en frascos de cultivo y cultivadas hasta P3-4 en un incubador a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad en el medio de cultivo especificado en la Tabla 3.

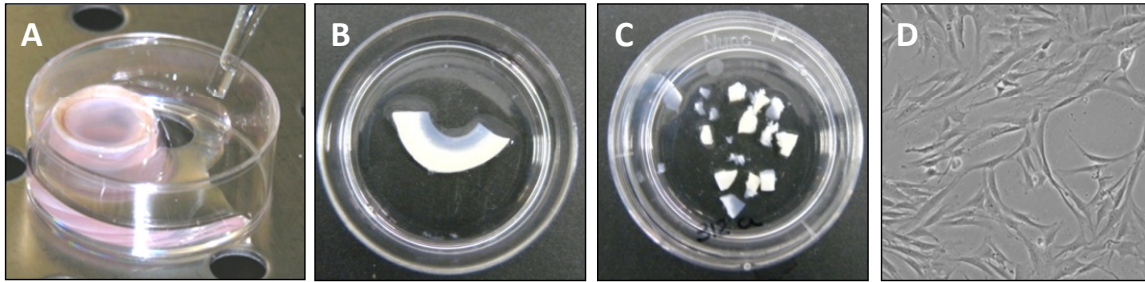


Figura 11. Metodología seguida para el aislamiento de FL a partir de botones corneo-limbo-esclerales. (A) Los botones corneo-limbo-esclerales fueron lavados y la córnea fue trepanada. (B) Los anillos limbares fueron divididos en dos y tratados con dispasa para la eliminación del epitelio. (C) Los anillos fueron disgregados mecánicamente e incubados con colagenasa I (toda la noche a 37°C). (D) Las suspensiones celulares obtenidas fueron sembradas y cultivadas.

Tabla 3. Medio de cultivo utilizado para los FL humanos. Medio Eagle modificado por Dulbecco, DMEM; suero fetal bovino, FBS; aminoácidos no esenciales, MEM NEAA (*Minimum Essential Media-Non Essential Amino Acids*).

	Concentración final
DMEM bajo en glucosa (1 g/L), piruvato sódico 1 mM, GlutaMAX™	1
FBS	10%
MEM NEAA	1%
Penicilina / Estreptomicina	100 U/ml / 100 µg/ml

4. Análisis de la viabilidad y del ciclo celular de las hAT-MSCs

La viabilidad y el ciclo celular de las hAT-MSCs fueron analizados mediante citometría de flujo.

La citometría de flujo es una técnica de análisis que se basa en el paso continuo de una suspensión celular a través de un haz de láser focalizado. La dispersión de la luz al paso de las células se puede relacionar con parámetros como el tamaño celular (luz dispersada frontalmente, Forward Scatter, FS) y la complejidad celular (luz dispersada lateralmente, Side Scatter, SSC). Además, se puede detectar, mediante diferentes filtros (FL1, FL2 y FL3), la fluorescencia emitida por las células previamente marcadas con diferentes fluoróforos, pudiendo obtener información tanto del porcentaje de células que emiten fluorescencia dentro de una población, como la intensidad media de

MATERIALES Y MÉTODOS

fluorescencia emitida por cada célula en la población analizada (*Mean Fluorescence Index*, MFI). Se utilizó el citómetro del Departamento de Inmunología de la Universidad de Valladolid bajo el asesoramiento del Prof. Alfredo Corell.

4.1. Análisis de la viabilidad celular

Durante el proceso de apoptosis o de muerte celular programada se producen una serie de cambios morfológicos en las células, uno de los cuales es el cambio de orientación de los fosfolípidos en la bicapa lipídica de la membrana plasmática. La fosfatidilserina se encuentra de forma normal orientada hacia el interior de la célula en la membrana plasmática. Durante las primeras fases de la apoptosis, la membrana mantiene su integridad pero la fosfatidilserina se ve expuesta hacia el exterior de la célula. La proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio, anexina, tiene especial afinidad por la fosfatidilserina y se unirá a ésta en los primeros estadios del proceso apoptótico. El yoduro de propidio, con afinidad por el ADN, solo podrá unirse a este cuando la membrana plasmática se haya roto, fenómeno que ocurre en las fases más avanzadas de la apoptosis. Por tanto, las células marcadas con anexina únicamente son células que se encuentran en apoptosis temprana. Las células teñidas por ambas moléculas se corresponden con células en apoptosis tardía. Por el contrario, la ausencia de tinción indica que las células son viables y la unión de las células con yoduro de propidio únicamente indica que las células están muertas.

Para estudiar la viabilidad celular se utilizó el kit Annexin V-FITC. En primer lugar, las hAT-MSCs en P3-4 fueron levantadas de los frascos de cultivo y resuspendidas en medio de cultivo. Se traspasaron 200.000 células a un tubo de centrifuga y se realizó un lavado con PBS a 4°C y una posterior centrifugación a 277 g durante 5 minutos para eliminar los restos de medio de cultivo. Posteriormente, las células fueron resuspendidas en 100 µl de la solución de unión proporcionada en el kit y se añadieron 2,5 µl de anexina V-FITC y 5 µl de yoduro de propidio (250 µg/ml). Se realizó un movimiento suave con la mano para mezclar bien el contenido del tubo con las células y la mezcla se incubó

durante 10 minutos en hielo y en oscuridad. Finalmente, se añadieron 400 μ l de la solución de unión y se analizó la población celular en un citómetro de flujo.

4.2. Análisis del ciclo celular

Las células poseen una cantidad determinada de ADN ($2n$ o $4n$) dependiendo de la fase del ciclo celular en la que se encuentren. Cuando las células se encuentran en la fase quiescente G_0/G_1 su contenido en ADN es $2n$. Cuando las células están en la fase de división G_2/M su contenido de ADN es el doble ($4n$), e intermedio durante la fase de síntesis (fase S). El yoduro de propidio tiene alta afinidad por el ADN y, por ello, se puede relacionar la cantidad de yoduro de propidio unido al ADN de las células con el porcentaje de células que se encuentran en cada una de las diferentes fases del ciclo celular.

Para llevar a cabo el análisis del ciclo celular, tras levantar las hAT-MSCs en P3-4, se traspasaron 200.000 células a un tubo de centrifuga, se realizó un lavado con PBS a 4°C y se centrifugaron a 277 g durante 5 minutos. Las células fueron resuspendidas en 50 μ l de detergente DNA Prep LPR (Coulter® DNA Prep™ Reagents Kit) para permeabilizarlas. Finalmente, se añadió 1 ml de DNA Prep Stain, consistente en yoduro de propidio, y la mezcla se incubó durante 30 minutos a 37°C en oscuridad antes de que las células fueran analizadas en el citómetro de flujo. El índice medio de proliferación se calculó como el ratio de $(S + G_2/M)/(S + G_2/M + G_0/G_1)$, siendo S, G_2/M y G_0/G_1 el porcentaje de células en fase S, G_2/M y G_0/G_1 , respectivamente.

5. Caracterización de las hAT-MSCs

5.1. Análisis inmunofenotípico

Para caracterizar la población celular obtenida en nuestro laboratorio a partir de los lipoaspirados humanos, se analizó mediante citometría de flujo la expresión/ausencia de expresión del panel de marcadores establecido por la ISCT como definatorio de las MSCs.⁹⁶ Tras levantar las células adheridas en los frascos de cultivo se traspasaron

MATERIALES Y MÉTODOS

200.000 células a tubos de citometría, se realizaron 2 lavados con PBS a 4°C para eliminar los restos de medio de cultivo y se centrifugaron a 277 g durante 5 minutos. Para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos, las muestras fueron incubadas durante 15 minutos con 40 µg/ml de inmunoglobulina G a temperatura ambiente. Después, las células fueron incubadas durante 30 minutos a 4°C en oscuridad con 10 µl de cada uno de los anticuerpos CD14-FITC, CD19-FITC, CD34-PC7, CD45-FITC, HLA-DR-FITC, CD73-PE, CD90-PE y CD105-APC (Tabla 4), y con los correspondientes controles de isotipo IgG1-FITC, IgG1-PE, IgG1-APC, IgG1-PC7 y IgG2a-FITC. Por último, se realizó un lavado con PBS a 4°C, se centrifugaron las células a 277 g durante 5 minutos y se resuspendieron las muestras en 500 µl de PBS frío para analizarlas en el citómetro. De cada muestra fueron analizados 5×10^4 eventos o células.

Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados para la caracterización inmunofenotípica de las hAT-MSCs por citometría de flujo.

Anticuerpos	Especificidad	Clon
CD14-FITC	Monocitos y macrófagos	RM052
CD19-FITC	Linfocitos B	SJ25C1
CD34-PC7	Células madre hematopoyéticas	581
CD45-FITC	Marcador pan-leucocitario	J33
HLA-DR-FITC	Células presentadoras de antígenos	357
CD73-PE	MSCs	AD2
CD90-PE	MSCs	F15-42-1-5
CD105-APC	MSCs	2H6F11

5.2. Diferenciación multilinaje

Como último paso para caracterizar la población celular estromal aislada de lipoaspirados humanos, se estudió su capacidad de diferenciación hacia adipocitos, osteoblastos y condroblastos.

Diferenciación adipogénica

Para inducir la diferenciación adipogénica, se sembraron las células a una densidad de 10.000 células/cm² en placas de Permanox® de 2 pocillos y se cultivaron con el medio inductor de diferenciación *StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit* durante 15 días, realizando cambios de medio de cultivo cada 2-3 días. Como control negativo se incubaron células con el medio de cultivo de MSCs habitual (Tabla 1). Transcurridos 15 días, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con metanol frío a -20°C durante 10 minutos. La diferenciación hacia adipocitos se puso de manifiesto mediante tinción con Oil Red O. Para llevar a cabo esta tinción, el Oil Red O fue disuelto al 0,3% en isopropanol y filtrado a través de un poro de 0,22 µm para eliminar partículas grandes no disueltas. Las células fueron incubadas con la solución de Oil Red O al 0,3% durante 20 minutos en agitación y posteriormente lavadas con agua destilada. Las células se contratiñeron con hematoxilina de Gill III durante 20 minutos, se lavaron las muestras con agua corriente para retirar el exceso de colorante y, por último, se montaron los portaobjetos con medio de montaje consistente en glicerol-gelatina antes de visualizarlos en el microscopio óptico. El colorante Oil Red O tiene alta afinidad por los lípidos, por lo que se pueden observar teñidas de rojo las grandes vacuolas lipídicas formadas en el citoplasma celular durante la diferenciación de las hAT-MSCs hacia adipocitos.

Diferenciación osteogénica

Para inducir la diferenciación osteogénica, se sembraron las células a una densidad de 10.000 células/cm² en placas de Permanox® de 2 pocillos y se cultivaron con el medio inductor de diferenciación *StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit* durante 29 días, realizando cambios de medio de cultivo cada 2-3 días. Además, como control se sembraron células que fueron incubadas con el medio de cultivo de MSCs habitual (Tabla 1). Transcurridos 29 días, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con metanol frío a -20°C durante 10 minutos. Por último, la diferenciación hacia osteoblastos se puso de manifiesto con la tinción Von Kossa, la cual es específica para calcio, de modo que,

MATERIALES Y MÉTODOS

en las células diferenciadas hacia osteoblastos aparecen depósitos de calcio teñidos en negro por dicho colorante. Una vez fijadas, las células se incubaron durante 1 hora con nitrato de plata al 5% en agua destilada con exposición a la luz del sol y, posteriormente, se lavaron con agua destilada. Después, las muestras fueron incubadas con tiosulfato de sodio al 5% en agua destilada durante 2 minutos, se lavaron con agua destilada, se contratiñeron con hematoxilina de Gill III durante 4 minutos y se montaron con glicerol-gelatina tras un lavado con agua destilada antes de ser visualizada en el microscopio óptico.

Diferenciación condrogénica

Para llevar a cabo la diferenciación condrogénica, se utilizó la técnica de la micromasa que consiste en mantener las células agrupadas formando un precipitado para favorecer la diferenciación. Se traspasaron 1.000.000 de células a un tubo de centrifuga de 15 ml y se centrifugaron a 277 g durante 5 minutos. El sedimento celular obtenido se mantuvo durante 27 días con el medio inductor de diferenciación *StemXVivo™ Chondrogenic Base Media* y *StemXVivo™ Chondrogenic Supplement*, realizando cambios de medio de cultivo cada 2-3 días. Además, como control se incubaron precipitados celulares con el medio de cultivo estándar de MSCs (Tabla 1). Transcurrido este tiempo, el sedimento celular fue fijado con formaldehído al 4% durante 3 horas a temperatura ambiente. Tras lavar las muestras con PBS para eliminar los restos de fijador, se incubaron con sacarosa al 5% durante 20 minutos y, posteriormente, con sacarosa al 30% durante toda la noche a 4°C para crioprotegerlas. Finalmente, las muestras fueron incluidas en un medio criosolidificable (OCT-Compound) y cortadas en secciones de 5 µm en el criostato. Para comprobar la diferenciación condrogénica, durante la cual las células sintetizan y secretan mucopolisacáridos a la matriz extracelular, se utilizó la tinción de azul alcian, la cual tiñe los mucopolisacáridos de color azul. Para llevar a cabo esta tinción se incubaron las secciones con ácido acético al 3% durante 3 minutos y, seguidamente, se realizó una incubación de 15 minutos con azul alcian al 1% disuelto en ácido acético. Tras lavar las muestras con agua destilada, las células se contratiñeron

con hematoxilina de Gill III durante 30 segundos y, por último, se lavaron y montaron con glicerol-gelatina para visualizarlas en el microscopio óptico.

6. Inducción de la diferenciación de las hAT-MSCs a células epiteliales corneales

Para estudiar la capacidad de diferenciación de las hAT-MSCs a células de epitelio corneal, se cultivaron en presencia de señales y/o factores característicos del microambiente del nicho corneo-limbar. Las hAT-MSCs fueron sembradas en confluencia elevada (40.000 células/cm²), factor descrito como inductor de diferenciación,¹⁶⁰ y se utilizaron dos sustratos diferentes para su cultivo, plástico y colágeno IV. Como medios de cultivo inductores de la diferenciación se emplearon medios condicionados (200 µl/cm²) con sobrenadantes de la línea celular de epitelio corneal humano HCE y de cultivos primarios de FL humanos.

6.1. Condicionamiento de medios de cultivo

Con el fin de condicionar el medio de cultivo de las hAT-MSCs, o en adelante medio basal (MB), con sobrenadantes del cultivo de células HCE, estas últimas fueron cultivadas en preconfluencia con 200 µl/cm² de MB durante 24 horas, momento en el cual se recogió el MB condicionado con las células HCE (HCEcMB). Este proceso se repitió durante 4 días consecutivos. Los medios condicionados obtenidos en los diferentes días de cultivo fueron mezclados, filtrados a través de un filtro de poro de 0,22 µm y almacenados a -80°C y en oscuridad hasta su uso.

En el caso del condicionamiento del MB con FL, se llevó a cabo un protocolo previamente descrito,¹⁶¹ con algunas modificaciones. En este caso, la mitosis de los FL fue inhibida mediante la incubación con 10 µg/ml de mitomicina C durante 2 horas a 37°C. Los FL inactivos fueron lavados con PBS, levantados de los frascos de cultivo con tripsina-EDTA 0,05% y sembrados en una proporción de 50.000-60.000 FL/cm². Diariamente, y durante 7 días consecutivos, se recogió el medio resultante del cultivo

MATERIALES Y MÉTODOS

de los FL con 200 $\mu\text{l/ml}$ de MB (FLcMB). Los medios condicionados obtenidos en los diferentes días de cultivo fueron mezclados, filtrados a través de un filtro de poro de 0,22 μm y almacenados a -80°C y en oscuridad hasta su uso.

6.2. Recubrimiento de placas de cultivo con colágeno IV

Para el cultivo de las hAT-MSCs en condiciones de inducción de la diferenciación hacia epitelio corneal se emplearon placas tapizadas con colágeno IV.¹⁶² Para ello, las placas de cultivo de poliestireno se incubaron durante 6 horas a 37°C con 100 $\mu\text{l/cm}^2$ de una solución de colágeno IV a una concentración de 0,5 mg/ml. Posteriormente, la solución de colágeno IV sobrante se retiró de las placas de cultivo, se lavó la superficie de las mismas con agua destilada y se esterilizaron durante 4 horas bajo radiación UV o con etanol al 70% durante 30 minutos.

6.3. Cultivo de las hAT-MSCs en condiciones de inducción de la diferenciación

Las hAT-MSCs fueron cultivadas en condiciones inductoras de la diferenciación hacia epitelio corneal durante 24 horas, 8, 15 y 22 días para estudiar su fenotipo a nivel de ARNm. Además, mediante citometría de flujo, *western-blotting* e inmunofluorescencia se estudió la expresión proteica de las hAT-MSCs cultivadas durante 15 días en las condiciones de inducción de la diferenciación.

7. Análisis de la expresión génica mediante reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real con transcripción reversa (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR*)

7.1. Procesamiento de las muestras

La extracción de ARN total se llevó a cabo en las hAT-MSCs antes y después de su cultivo en condiciones de diferenciación hacia epitelio corneal. Para ello, las células fueron levantadas de las placas de cultivo mediante rascado con tampón de lisis celular, compuesto por β -mercaptoetanol y tampón "RLT Rneasy[®] Mini Kit" (1:100).

Posteriormente, los lisados celulares fueron recogidos en dicho tampón y congelados a -80°C hasta su posterior uso.

7.2. Extracción, homogeneización y purificación del ARN

Para llevar a cabo la homogeneización y purificación del ARN total de las muestras se utilizó el kit de extracción comercial RNeasy® Mini Kit.

Para ello, se colocaron las muestras en columnas Qiasredder, las cuales contienen un polímero sintético de fibras cortantes con efecto triturador, y se centrifugaron durante 2 minutos a 15.000 g. Una vez homogeneizadas las muestras, se añadieron 700 μl de etanol al 70% para favorecer la posterior unión del ARN a la columna. De esta mezcla, se dispusieron 700 μl en las columnas RNeasy-mini column, en las cuales el ARN total se une a una membrana de silica gel. Seguidamente, se realizó una centrifugación a 9.000 g durante 30 segundos y se desechó el eluido, consiguiendo que el ARN quedase adherido a la columna de cromatografía. Posteriormente, se procedió a lavar la columna tres veces. Primero se añadieron 700 μl de tampón RW1 y se centrifugó a 9.000 g durante 30 segundos. Seguidamente, se añadieron 500 μl de tampón RPE y se centrifugó a 9.000 g durante 30 segundos. Por último, se añadieron otros 500 μl de tampón RPE y se centrifugó a 15.000 g durante 30 segundos. Seguidamente, con el fin de secar las columnas cromatográficas, las muestras se centrifugaron a 15.000 g durante 1 minuto. Para eluir el ARN enlazado en dicha columna, se añadieron 100 μl de agua libre de ARNasas, se realizó una incubación de 10 minutos y se centrifugó a 9.000 g durante 1 minuto. El ARN purificado fue conservado a -80°C hasta su uso. Para eliminar posibles contaminaciones de las muestras con ADN genómico, el ARN se trató durante 15 minutos a temperatura ambiente con una ADNasa (*RNAase-Free Dnase Set*) de forma previa a la disolución del ARN en agua.

7.3. Cuantificación del ARN

Una vez purificado el ARN, se realizó la cuantificación del mismo. Para ello, se utilizó el kit comercial *Quant-iT RNA Assay*. Este kit consta de un reactivo (*Quant-iT RNA*

MATERIALES Y MÉTODOS

reagent), el cual se une al ARN emitiendo una cantidad de fluorescencia proporcional a la cantidad de ARN, y de un tampón de dilución (*Quant-iT RNA buffer*) que en una dilución 1:200 constituye la solución de trabajo. Además, incluye dos soluciones estándar (*Quant-iT Standard 1* y *2*) de concentración conocida de ARN para calibrar el lector. Se preparó un tubo con 190 μl de solución de trabajo y 10 μl de *Quant-iT Standard 1*. Del mismo modo, se preparó otro tubo con el *Quant-iT Standard 2*. Por otro lado, se preparó un tubo para cada muestra con 199 μl de solución de trabajo y 1 μl de muestra. Se incubaron durante 10 minutos y se midió la fluorescencia en el Qubit-fluorómetro. En primer lugar, se midió la cantidad de ARN en las muestras estándares para calibrar el aparato, y a continuación en las muestras problema a cuantificar.

7.4. Síntesis del ADN complementario (ADNc): retrotranscripción

Durante esta etapa, el ARN de las muestras se retrotranscribió a ADNc utilizando el kit de síntesis *SuperScript® Vilo™*. Con este kit, se genera una hebra de ADNc gracias a la acción de la enzima *SuperScript III Reverse Transcriptase* de alta temperatura. El ADNc fue sintetizado a partir de 1 μg de ARN. Para llevar a cabo esta reacción se preparó una disolución con el ARN y los reactivos del kit en una proporción 7 (ARNm disuelto en agua): 1 (5X *Vilo Reaction Mix*): 2 (10X *SuperScript Enzyme Mix*). Dicha disolución fue sometida a un ciclo de 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 42°C y, finalmente, 5 minutos a 85°C en un termociclador. El ADNc fue conservado a -20°C hasta su uso.

7.5. Amplificación y cuantificación de la expresión génica relativa mediante PCR a tiempo real

La expresión génica se cuantificó mediante la utilización de sondas TaqMan®. Estas sondas están formadas por una combinación de nucleótidos que se unen de forma específica, debido a su complementariedad, a una secuencia diana que se encuentra entre los cebadores que permiten la amplificación del gen de interés. Las sondas TaqMan® llevan acoplado un fluoróforo en el extremo 5' y un *quencher* (amortiguador) en el extremo 3'. Un fluoróforo es una molécula que pasa a un estado excitado al absorber energía y, posteriormente, la emite en forma de fluorescencia al volver a su

estado inicial. Los *quencher*s son moléculas que aceptan la energía de un fluoróforo y la disipan, principalmente, en forma de calor.

En este caso, se utilizó un fluoróforo tipo FAM, que se excita a 492 nm y emite a 515 nm, y un *quencher* tipo MGB (*minor groove binder*). Este *quencher* disipa la energía por un mecanismo denominado *quenching* colisional, es decir, cuando el fluoróforo está en contacto o muy próximo al *quencher* se produce la transferencia de energía a este, el cual la disipa en forma de calor. De esta manera, cuando la ADN polimerasa empieza a amplificar a partir del cebador unido al ADN, desplaza el extremo 5' de la sonda, el cual es degradado por la actividad exonucleasa 5'→3' de la polimerasa. Este proceso libera el fluoróforo al medio separándolo del *quencher*, lo que ocasiona un aumento irreversible de la fluorescencia (Figura 12). Para llevar a cabo la amplificación génica de las muestras, se utilizó el tampón de reacción TaqMan Universal PCR Master Mix. Este preparado comercial contiene AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, que es una ADN polimerasa termoestable. Esta enzima tiene actividad 5'→3' exonucleasa, pero ha perdido la actividad 3'→5' exonucleasa. Además, el preparado contiene dNTPs (desoxiribonucleótidos trifosfato) con dUTPs (2'-desoxiuridina-5'-triosfato), y AmpErase UNG (enzima que se añade al tampón de reacción para degradar productos generados por amplificaciones anteriores y evitar así falsos positivos).

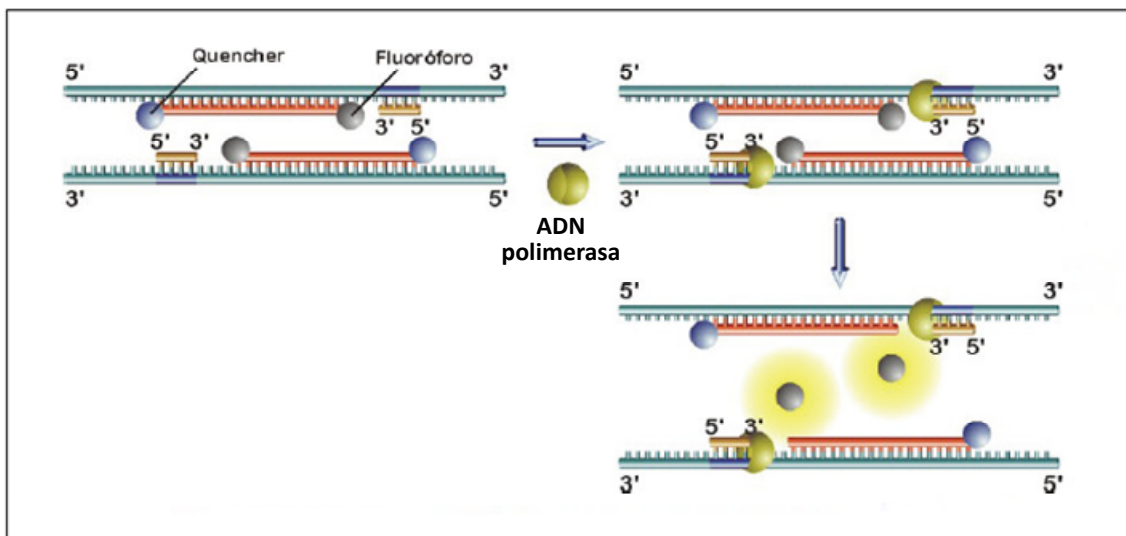


Figura 12. Estructura y mecanismo de acción de las sondas TaqMan®. Las sondas TaqMan® están formadas por una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una región de un gen específico. Estas sondas llevan acoplado un fluoróforo en el extremo 5' y un *quencher* (amortiguador) en el extremo 3'. En primer lugar, las sondas se unen a la región específica del ADNc, para la cual son complementarias, situada entre los cebadores que permiten la amplificación del gen de interés. Posteriormente, la ADN polimerasa comienza a amplificar el ADNc a partir del extremo 3' de los cebadores, mientras desplaza el extremo 5' de la sonda, el cual es degradado por su actividad exonucleasa 5' → 3'. Este proceso libera el fluoróforo al medio separándolo del *quencher*, lo que ocasiona un aumento irreversible de la fluorescencia. Imagen tomada de www.cultek.com.

Se utilizan placas de 96 pocillos y se colocaron en cada pocillo 18 µl de la solución preparada a partir de: H₂O libre de nucleasas, 20X *Target Primers-Probe* (Tabla 5) y 2X *Taqman Universal PCR Master Mix* en una proporción 7:1:10, respectivamente. Posteriormente, se añadieron a cada pocillo 2 µl de ADNc de cada una de las muestras y se analizaron por duplicado. Las placas fueron incubadas en el termociclador y sometidas a 1 ciclo de 2 minutos a 50°C, seguido de 1 ciclo de 10 minutos a 95°C y de otro de 1 minuto a 60°C. Por último, las muestras fueron sometidas a 40 ciclos formados cada uno de ellos por una fase de 15 segundos a 95°C y por otra de 1 minuto a 60°C.

Tabla 5. Sondas Taqman empleadas en el estudio de la expresión génica a nivel de ARNm mediante RT-PCR a tiempo real.

Nombre del gen	Siglas	Referencia de Applied Biosystems
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	<i>GAPDH</i>	4352934E
Citoqueratina 3	<i>CK3</i>	Hs00365080_m1
Citoqueratina 12	<i>CK12</i>	Hs00165015_m1

Los niveles de expresión del gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) fueron utilizados como control endógeno de cada reacción. Como controles negativos se utilizaron dos pocillos en los que se colocaron todos los componentes a excepción de la muestra de ADNc.

El análisis de los resultados se realizó siguiendo el método comparativo de ciclos umbrales, método comparativo Ct, del inglés *cycle threshold*, entendiéndose por Ct el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativa con respecto a la señal base y que, además, es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas de ADNc. El método comparativo Ct calcula la cantidad de expresión de los genes relativa a un calibrador y la normaliza con un valor endógeno, utilizando la siguiente fórmula:

$$C_t = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Donde $\Delta Ct = Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ gen de referencia}$

Y el $\Delta\Delta Ct$ se calcula mediante: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ calibrador}$

Para realizar estos cálculos, una vez finalizada la reacción de PCR, fue necesario establecer el umbral de detección Ct dentro de la fase exponencial de todas las curvas de amplificación. Posteriormente, se analizaron los resultados utilizando la expresión de *GAPDH* como gen de referencia (control endógeno) y tomando como calibrador la expresión de los respectivos genes en las hAT-MSCs cultivadas sobre plástico y con MB.

8. Análisis de la expresión proteica mediante *western-blotting*

8.1. Extracción de proteínas

Las hAT-MSCs cultivadas en condiciones de inducción de diferenciación hacia epitelio corneal fueron lisadas mediante rascado en hielo con tampón de radioinmunoprecipitación (RIPA; 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% de ácido desoxicólico, 1% Tritón X-100, 0,1% de SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) y 1 mM EDTA) suplementado con inhibidores de proteasa y fosfatasa (100 µg/ml de fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 0,033 U/ml de aprotinina, 1 mM de ortovanadato sódico). Posteriormente, el lisado celular se homogeneizó en un sonicador durante 20-30 segundos, se incubó durante 30 minutos en hielo, se centrifugó a 15.000 g a 4°C durante 30 minutos y, por último, se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

8.2. Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas totales se utilizó la técnica del BCA (ácido bicinconínico), utilizando el BCA™ Protein Assay Kit. Esta técnica se basa en que las proteínas reducen el ión Cu^{+2} y producen el ión Cu^{+} . El ión Cu^{+} es quelado por dos moléculas de BCA produciendo un producto de color púrpura. De esta forma, se determinó la concentración proteica en función de la absorbancia colorimétrica en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 562 nm. El método de cuantificación se realizó mediante interpolación con una curva patrón obtenida tras la lectura de diluciones seriadas de albúmina sérica bovina de concentraciones conocidas.

8.3. Electroforesis y *western-blotting*

Las proteínas obtenidas de los lisados celulares se mezclaron con solución Laemmli en proporción 1:1 y se incubaron a 110°C durante 5 minutos para producir la desnaturalización de las mismas. Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (10%) con dodecilsulfato sódico (*SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE*), las

proteínas (20 µg) fueron separadas en función de su peso molecular, utilizando los siguientes parámetros: 15 minutos a 70 V y 90 minutos a 110 V. Posteriormente, las muestras fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa, utilizando una intensidad de 350 mA durante 90 minutos en frío. A continuación, las membranas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con solución de bloqueo (5% de leche entera, 4% de FBS y 0,05% de Tween-20 en tampón tris salino (TBS)) y, seguidamente, con los anticuerpos primarios CK3, CK12 y GAPDH (Tabla 6) diluidos en la solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Por último, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios donkey anti-mouse-HRP (*horseradish peroxidase*) (1:5.000) o donkey anti-rabbit-HRP (1:2.000) durante 1 hora a temperatura ambiente. El revelado de la actividad peroxidasa se realizó por quimioluminiscencia usando los reactivos Immun-Star™ HRP Peroxide Buffer e Immun-Star™ HRP Luminol/Enhancer (Immun-Star™ HRP Kit) y el sistema de documentación de geles Chemi-Doc® XRS. Las bandas correspondientes a las proteínas en estudio se identificaron utilizando el marcador estándar de peso molecular conocido. Las imágenes de las bandas obtenidas fueron cuantificadas mediante densitometría con el programa *Quantity One* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU). Los datos obtenidos fueron normalizados con la expresión de GAPDH (control endógeno) para cada muestra. Como condición control, se utilizaron las células cultivadas sobre plástico con MB.

9. Análisis de la expresión proteica mediante inmunofluorescencia

9.1. Procesamiento de las muestras

Caracterización de células HCE y de FL

Para caracterizar las muestras celulares procedentes del cultivo de la línea celular HCE y de los cultivos primarios de FL se analizó la expresión proteica de determinados marcadores mediante inmunofluorescencia. En el caso de las HCE, se analizaron los marcadores específicos de epitelio corneal CK3 y CK12. En el caso de los FL se analizó la expresión de las proteínas CD90, S100A4 (FSP1) y vimentina, como marcadores de

MATERIALES Y MÉTODOS

fibroblastos, y de pan-citoqueratina (pan-CK) para descartar la contaminación epitelial en dichos cultivos primarios. Las células fueron sembradas en placas de Permanox® de 8 pocillos (1,8 cm²/pocillo), en una proporción de 12.500 células/cm² en el caso de la línea celular HCE y de 5.000 células/cm² para los FL. Transcurrida una noche de incubación a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad con el medio de cultivo correspondiente, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con metanol frío a -20°C durante 10 minutos. Las muestras fueron congeladas a -20°C hasta su uso.

hAT-MSCs inducidas a diferenciación

Para estudiar la capacidad de diferenciación de las hAT-MSCs a células epiteliales corneales, se analizó la expresión proteica de los marcadores CK3 y CK12 en las hAT-MSCs antes y después de la inducción de la diferenciación. Para ello, las hAT-MSCs cultivadas en condiciones estándar se sembraron en una proporción de 10.000 células/cm² en placas de Permanox® de 8 pocillos. Las hAT-MSCs cultivadas en condiciones de inducción de la diferenciación se sembraron a 40.000 células/cm² en el mismo tipo de placas y se mantuvieron en cultivo durante 15 días bajo condiciones inductoras de diferenciación. En ambos casos, las células fueron fijadas con metanol frío a -20°C durante 10 minutos.

Muestras histológicas procedentes de los modelos *ex vivo* e *in vivo*

Las muestras histológicas procedentes de los modelos *ex vivo* e *in vivo* fueron procesadas, incluidas, cortadas y desparafinadas como se indica en apartado correspondiente al estudio histopatológico. Además, debido a que el fijador utilizado podía enmascarar los epítomos de las proteínas, las muestras fueron sometidas a un proceso de desenmascaramiento antigénico mediante incubación con tripsina al 0,1% durante 20 minutos a 37°C. El marcador analizado en las muestras procedentes del modelo *ex vivo* fue 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) para la localización de las hAT-MSCs previamente marcadas con dicha molécula. Con el fin de desnaturalizar el ADN y facilitar la entrada del anticuerpo para detectar la expresión de la BrdU, fue necesario

incubar previamente las muestras durante 30 minutos a temperatura ambiente con HCl 2 M. Posteriormente, las muestras fueron incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente con tampón de borato sódico (10 mM NaOH, pH 8,5) para neutralizar los restos de HCl. En las muestras procedentes de los modelos de SIL en conejo, además del análisis de la expresión de BrdU para localizar las hAT-MSCs en los tejidos, se analizó la expresión de CK3 y E-cadherina como marcadores de epitelio corneal diferenciado, CK15 y p63 como marcadores de células madre de epitelio limbar y CK7 y lectina (que se une específicamente a mucinas¹⁶³) conjugada con FITC como marcadores de epitelio conjuntival.

9.2 Inmunofluorescencia

Todo el proceso se realizó en cámara húmeda. Las muestras fueron lavadas dos veces con PBS durante 5 minutos y permeabilizadas con tritón al 0,3 % en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS seguidos de una incubación de 1 hora con solución de bloqueo (suero de burro o de cabra al 5% en PBS) a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla 6) durante toda la noche a 4°C y una vez finalizado este paso, fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente (Alexa Fluor® 488 donkey anti-mouse 1:200 o Alexa Fluor® 488 donkey anti-rabbit 1:300 o PECy5 goat anti-mouse 1:100) durante 1 hora a temperatura ambiente y lavadas tres veces con PBS durante 5 minutos. Las muestras en las que se estudió la expresión de CK7 fueron incubadas con lectina (1:500) durante 30 minutos a temperatura ambiente, tras la incubación con el anticuerpo secundario, para poner de manifiesto la presencia de células caliciformes. Seguidamente, los núcleos fueron teñidos con ioduro de propidio (1:12.000) durante 10 minutos en el caso de los cultivos celulares, o con el colorante Hoechst (1:1.000) en los cortes histológicos. Finalmente, se realizaron dos lavados con PBS y se montaron los portaobjetos con medio de montaje Vector®. Las muestras fueron visualizadas en un microscopio invertido de fluorescencia. En todos los experimentos, se incluyeron controles negativos en los que se omitió la incubación con los anticuerpos primarios.

Tabla 6. Anticuerpos primarios utilizados para realizar las técnicas de inmunofluorescencia (IMF) y *western-blotting* (WB).

Nombre del anticuerpo	Especificidad	Clon	Dilución
Anti-Ab-1 (CD90)	Fibroblastos	AS02	1:40 (IMF)
Anti-BrdU	hAT-MSCs marcadas (MA <i>ex vivo</i>)	BU-33	1:500 (IMF)
Anti-BrdU-DyLight 650	hAT-MSCs marcadas		1:100 (IMF)
Anti-E-cadherina	Células epiteliales	36	1:100 (IMF)
Anti-CK3	Células epiteliales corneales	AE5	1:50 (IMF); 1:500 (WB)
Anti-CK7	Células epiteliales conjuntivales	OV-TL 12/30	1:50 (IMF)
Anti-CK12	Células epiteliales corneales	H60	1:50 (IMF); 1:200 (WB)
Anti-CK15	Células madre limbares	LHK15	1:50 (IMF)
Anti-GAPDH	<i>Housekeeping</i>	10B8	1:500 (WB)
Anti-pan-CK	Células epiteliales	80	1:50 (IMF)
Anti-p63	Células madre limbares	4A4	1:50 (IMF)
Anti-S100A4 (FSP1)	Fibroblastos	1B10	1:100 (IMF)
Anti-vimentina	Fibroblastos	V9	1:500 (IMF)

10. Marcaje de las hAT-MSCs con 5-bromo-2-deoxiuridina

La BrdU es un análogo sintético del nucleótido timidina, que puede ser incorporado a la cadena de ADN durante la fase S del ciclo celular sustituyendo a la timidina. En la actualidad, esta molécula se utiliza para identificar células de ciclo celular corto y/o para marcar una población celular para su posterior localización.⁸³ Las hAT-MSCs fueron marcadas con BrdU antes de ser trasplantadas a los modelos *ex vivo* e *in vivo*, descritos más adelante. Cuando las células alcanzaron el 70% de confluencia, se incubaron con BrdU 10 μ M durante 24 horas a 37°C antes de su utilización. Una vez marcadas, se identificó la localización de las hAT-MSCs en los tejidos mediante inmunofluorescencia frente a BrdU.

11. Cultivo de las hAT-MSCs sobre MA

Se utilizaron MA humanas procedentes de cesáreas programadas que fueron cedidas por el Establecimiento de Tejidos de la Clínica San Francisco de León con el cual se tiene firmado un acuerdo de cesión para este fin. Las MA fueron procesadas de acuerdo con el protocolo previamente descrito por Tseng *et al.*,¹⁶⁴ con algunas modificaciones. Una vez recogidas, las MA fueron lavadas con suero fisiológico y antibióticos (30 µg/ml tobramicina, 75 µg/ml vancomicina, 120 µg/ml sulfametoxazol y 25 µg/ml trimetoprima), cortadas en piezas de unos 4 cm x 4 cm y almacenadas a -80°C en DMEM-glicerol (1:1) hasta su uso. Antes de ser utilizadas, las MA fueron descongeladas, lavadas 3 veces con solución de Hanks (*Hanks Balanced Salt Solution*, HBSS) durante 10 minutos en agitación para eliminar los restos de glicerol y, posteriormente, desepitelizadas mediante rascado tras previa incubación con tripsina-EDTA 0,25% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las MA fueron cortadas en fragmentos de 2,5 cm x 2,5 cm y colocadas en placas de cultivo de 6 pocillos con la membrana basal hacia arriba. Las hAT-MSCs fueron sembradas sobre la membrana basal de las MA en las proporciones de 250.000, 1.000.000 y 10.000.000 hAT-MSCs por MA. Las células fueron sembradas en un volumen inicial de medio de cultivo de 250 µl para favorecer su adhesión a la MA y transcurridas 2 horas se añadieron 200 µl /cm² de medio de cultivo de hAT-MSCs.

12. Modelo de daño corneal por causticación en ojos de cerdo *ex vivo*

Basándonos en trabajos previos publicados por otros grupos de investigación en córneas de cerdo y de conejo,^{73,74,165} se desarrolló un modelo de daño corneal en ojos de cerdo *ex vivo* con el fin de evaluar el trasplante de diferentes dosis de hAT-MSCs en él. Para ello, se utilizaron ojos de cerdo procedentes del matadero local, a los cuales se les retiraron los restos de músculo y grasa y fueron lavados con povidona iodada al 2% y con una solución de PBS suplementada con antibióticos y antifúngicos (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 0,25 µg/ml de fungizona). Posteriormente, se indujo un daño corneal mediante la inmersión de las córneas en n-heptanol puro¹⁶⁶

MATERIALES Y MÉTODOS

durante 1 minuto, seguida de varios lavados en PBS para eliminar los restos del mismo. Para confirmar la eliminación completa del epitelio corneal y limbar, las córneas fueron sumergidas en colorante azul tripán, el cual tiñe las células muertas. Posteriormente, se rascó el epitelio con un cuchillito, asegurando la retirada de todo el epitelio teñido de azul. El botón corneoescleral fue separado del resto del globo con unas tijeras dejando unos 8 mm de esclera y los restos de iris fueron eliminados. Por último, se añadió agar fundido en la parte posterior del botón corneoescleral para que, una vez solidificado, mantuviera la forma convexa del botón en las placas de cultivo (Figura 13).

12.1. Trasplante de MA con diferentes dosis de hAT-MSCs sobre el modelo *ex vivo* de daño corneal por causticación

Para determinar la dosis de hAT-MSCs más adecuada para su trasplante a la superficie ocular, se trasplantaron sobre el modelo de daño corneal *ex vivo* diferentes dosis de hAT-MSCs sembradas sobre MA (Figura 13). Las dosis celulares estudiadas fueron 250.000, 1.000.000 y 10.000.000 hAT-MSCs. Las MA fueron trasplantadas siempre con las hAT-MSCs en contacto con la córnea. Como controles se utilizaron córneas de cerdo sanas, córneas con daño epitelial sin trasplante y córneas con daño epitelial con trasplante de MA sin células. Una vez realizado el trasplante de las MA con o sin hAT-MSCs en el modelo *ex vivo*, se añadió medio de cultivo hasta cubrir la zona del limbo de los botones corneoesclerales, permitiendo que la superficie corneal quedara en la interfase aire-líquido. El medio utilizado durante los 2-3 primeros días de cultivo fue el medio habitual de hAT-MSCs con mayor concentración de antibióticos y antifúngicos (1.000 U/ml de penicilina, 1.000 µg/ml de estreptomina y 2,5 µg/ml de fungizona). A partir de este momento, el medio de cultivo empleado fue el medio de cultivo de hAT-MSCs con la concentración habitual de antibióticos y antifúngicos y fue renovado cada 2-3 días. Diariamente se añadieron 1-2 gotas de medio de cultivo sobre la superficie de la córnea para mantener las muestras húmedas. Transcurridas dos semanas desde la realización del trasplante, la MA fue levantada de los botones con pinzas y fijada con formaldehído tamponado al 4% para posteriormente detectar, mediante inmunofluorescencia frente a BrdU, la presencia/ausencia de hAT-MSCs sobre ella.

Además, se estudió el grado de defecto epitelial corneal mediante tinción con tiras de fluoresceína sódica. Para ello, se pusieron en contacto tiras de fluoresceína mojadas con una gota de PBS con la superficie corneal de los botones corneoesclerales y, posteriormente, se lavaron con PBS para eliminar el exceso de fluoresceína sódica. Seguidamente, se realizaron fotografías con luz azul cobalto y filtro amarillo, y se cuantificó el área del defecto epitelial mediante planimetría utilizando el programa de análisis de imagen Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Asimismo, los botones corneoesclerales fueron fijados en formaldehído tamponado al 4%, incluidos en parafina y cortados en el microtomo (cortes de 4 μm de espesor) con el fin de realizar el estudio histológico de los mismos y poder determinar el grado de recuperación del epitelio corneal alcanzado con las diferentes dosis de hAT-MSCs. Conjuntamente, mediante inmunofluorescencia frente a BrdU, se estudió la presencia y la ubicación de las hAT-MSCs trasplantadas en los cortes histológicos.

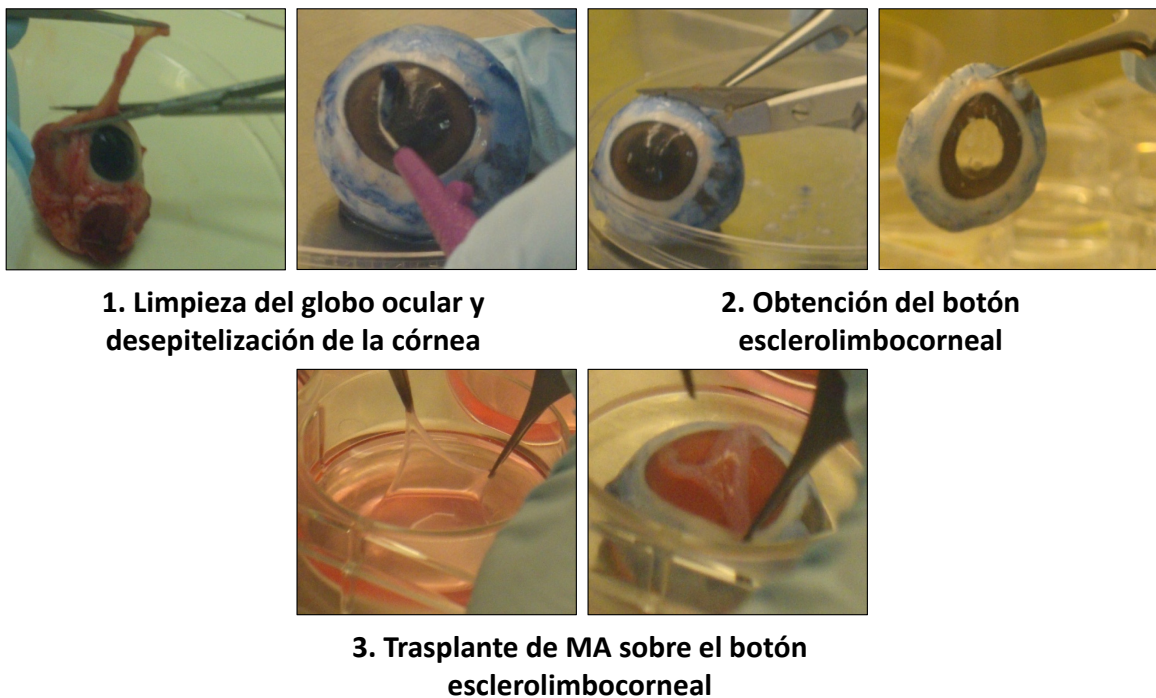


Figura 13. Metodología seguida para el desarrollo del modelo de daño corneal en ojo de cerdo *ex vivo* y para el trasplante de MA sobre su superficie.

13. Desarrollo de un modelo experimental de fracaso de la superficie ocular por SIL

Para el estudio de la tolerancia y la eficacia del trasplante de hAT-MSCs para el tratamiento de SIL es necesario disponer de modelos animales de esta enfermedad. En el presente trabajo se han desarrollado 3 modelos diferentes de SIL en dos especies animales: cerdo (modelo de SIL total) y conejo (modelo de SIL parcial y modelo de SIL total). Todos los procedimientos quirúrgicos llevados a cabo en los animales fueron realizados por el mismo cirujano experto.

13.1. Desarrollo de un modelo de SIL total en cerdo

Los ensayos desarrollados en el cerdo *in vivo* se realizaron en el animalario de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León y en colaboración con el Establecimiento de Tejidos Fundación Clínica San Francisco de León.

Para el desarrollo del modelo de SIL total en cerdo (*Sus scrofa*) se utilizaron 4 animales hembras de 4 semanas de edad, los cuales fueron sedados mediante inyección intramuscular de midazolam 0,35 mg/kg, ketamina 5 mg/kg y atropina 0,02 mg/kg y, posteriormente, anestesiados mediante inyección intravenosa de propofol 4-6 mg/kg. Los animales fueron intubados y la anestesia fue mantenida mediante administración de isofluorano al 2% en 300 ml de oxígeno por vía inhalatoria. La córnea del ojo derecho de cada animal fue desepitelizada mediante contacto con un hisopo empapado con n-heptanol¹⁶⁶. Esta desepitelización fue confirmada mediante tinción con fluoresceína sódica. Posteriormente, para eliminar las células madre limbares se realizó un daño criogénico en los 360° del limbo poniendo en contacto la zona limbar con un dispositivo metálico, diseñado especialmente para tal efecto, previamente introducido en nitrógeno líquido (Figura 14). Por último, mediante sutura con seda 5.0, se realizó una tarsorrafia (sutura de los párpados) en el ojo lesionado y se mantuvo durante la primera semana. Tras la lesión, se administraron 40 mg de triamcinolona de forma

transeptal en una única dosis y antibióticos (cefalosporina) y analgésicos (0,01 mg/Kg buprenorfina) sistémicos que se mantuvieron durante la primera semana tras la cirugía.



1. Desepitelización corneal con n-heptanol

2. Lesión criogénica del limbo

Figura 14. Metodología seguida para el desarrollo del modelo *in vivo* de SIL en cerdo.

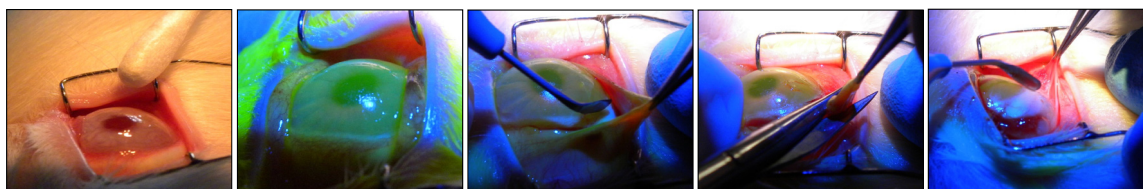
13.2. Desarrollo de un modelo de SIL parcial y otro de SIL total en conejo

Todos los procedimientos realizados en conejo se llevaron a cabo en el animalario de la Universidad de Valladolid.

Se desarrollaron dos modelos de SIL en conejo (*Oryctolagus cuniculus*), uno parcial y otro total. Para el desarrollo de estos modelos se utilizaron 12 conejos adultos New Zealand White hembra de 4-4,5 kg de peso. En 6 de ellos se indujo un SIL parcial y en los otros 6 un SIL total. En primer lugar, los conejos fueron anestesiados mediante una única inyección intramuscular de ketamina 50 mg/kg y xilacina 7 mg/kg, complementado con 3 gotas de anestésico combinado tópico ocular (tetracaína 1 mg/ml y oxibuprocaina 4 mg/ml) y analgésico sistémico (buprenorfina 0,02 mg/Kg). A continuación, se indujo el SIL en el ojo derecho de cada conejo mediante desepitelización de la córnea con n-heptanol, la cual fue confirmada mediante tinción con fluoresceína sódica. Seguidamente, se realizó una limbectomía quirúrgica parcial, de 180° del limbo (de VII a I según los husos horarios en el ojo derecho, incluyendo limbo superior y temporal) o una limbectomía total de los 360° del limbo para eliminar las células madre epiteliales del nicho limbar parcialmente, o en su totalidad, respectivamente (Figura 15), retirando 1-1,5 mm de la conjuntiva adyacente. Posteriormente, se administraron antiinflamatorios y antibióticos tópicos (2 gotas de una solución compuesta por neomicina 3500 UI/ml, polimixina B 6000 UI/ml y dexametasona 1 mg/ml, y aplicación de un ungüento compuesto por tobramicina 3

MATERIALES Y MÉTODOS

mg/g), y antibióticos (enrofloxacin 5 mg/Kg) y analgésicos (buprenorfina 0,02 mg/Kg) sistémicos el día de la cirugía y diariamente durante los cuatro días posteriores a la cirugía.



1. Desepitelización corneal con n-heptanol

2. Limbectomía quirúrgica

Figura 15. Metodología seguida para el desarrollo del modelo *in vivo* de SIL en conejo.

14. Evaluación de los signos clínicos en los modelos animales

14.1. Evaluación y seguimiento del modelo porcino de SIL

Los signos clínicos neovascularización, opacidad corneal y defecto epitelial fueron evaluados semanalmente durante el primer mes y cada 2-3 semanas durante el segundo y el tercer mes de seguimiento (Figura 16). El defecto epitelial fue puesto de manifiesto mediante tinción con fluoresceína sódica y lámpara de luz azul cobalto para la toma de fotografías. Además, durante estas revisiones se recogieron citologías de impresión corneal mediante papel de filtro de acetato de celulosa que fueron fijadas posteriormente en etanol al 96%. El seguimiento completo de los animales fue de 12 semanas desde el momento de la inducción del modelo. Transcurrido este tiempo, los animales fueron anestesiados y se realizó la eutanasia de los mismos mediante inyección intravenosa de 200 mg/kg de pentobarbital sódico. Los globos oculares fueron enucleados y transportados al IOBA en frascos que contenían gasas humedecidas con suero fisiológico, donde se realizaron los estudios de microscopía láser confocal y de histopatología.

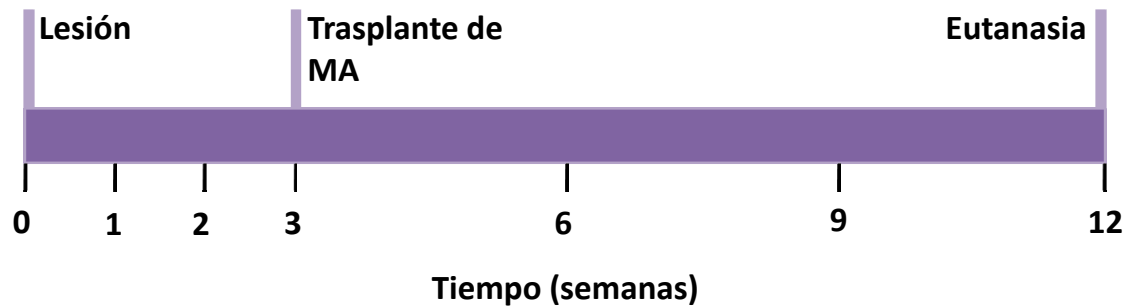


Figura 16. Esquema cronológico de los procedimientos realizados en el modelo de SIL en cerdo. Realización de la lesión en la semana 0 y trasplante de MA en la semana 3. Valoración de los signos clínicos en las semanas 1, 2, 3, 6, 9 y 12 del periodo de seguimiento. Eutanasia de los animales en la semana 12.

14.2. Evaluación y seguimiento del modelo de SIL parcial en conejo

Los signos clínicos neovascularización, opacidad corneal y defecto epitelial fueron evaluados, semanalmente y bajo lámpara de hendidura, por dos investigadores independientes. El defecto epitelial fue puesto de manifiesto mediante tinción con fluoresceína sódica e iluminación con lámpara de luz azul cobalto para la toma de fotografías. Para realizar las valoraciones se asignó un valor entre 0 y 4 (de menor a mayor afectación) a toda la córnea para cada signo clínico evaluado (Tabla 7).¹⁶⁷ Además, se realizaron fotografías del estado de la superficie ocular, a partir de las cuales se cuantificó el área del defecto epitelial mediante planimetría con el programa de análisis de imagen Image J. Transcurridas 11 semanas desde el momento de la inducción del SIL (8 semanas desde la realización del trasplante), los animales fueron anestesiados, siguiendo el mismo protocolo anteriormente detallado, y se realizó la eutanasia de los mismos mediante inyección intravenosa de 200 mg/kg de pentobarbital sódico. Tras la eutanasia, los botones corneoesclerales fueron recogidos para su posterior estudio histológico y de inmunofluorescencia. Algunos de los botones corneoesclerales de los ojos contralaterales sanos fueron recogidos para su estudio como controles sanos.

Tabla 7. Escala de valoración de los signos clínicos que se utilizó para evaluar la evolución del modelo de SIL parcial desarrollado en conejo. Valoración de la neovascularización, de la opacidad corneal y del defecto epitelial de 0 a 4, de menor a mayor severidad.

Valoración	Neovascularización	Opacidad corneal	Defecto epitelial
0	Ausencia	Ausencia	Ausencia
1	Área $\leq \frac{1}{4}$	Media	Área $\leq \frac{1}{4}$
2	$\frac{1}{4} < \text{área} \leq \frac{1}{2}$	Moderada	$\frac{1}{4} < \text{área} \leq \frac{1}{2}$
3	$\frac{1}{2} < \text{área} \leq \frac{3}{4}$	Severa, pupila visible	$\frac{1}{2} < \text{área} \leq \frac{3}{4}$
4	Área $> \frac{3}{4}$	Severa, pupila no visible	Área $> \frac{3}{4}$

14.3. Evaluación y seguimiento del modelo de SIL total en conejo

Semanalmente y bajo lámpara de hendidura fueron evaluados, por dos investigadores independientes, los signos clínicos neovascularización, opacidad corneal, invasión del tejido conjuntival y defecto epitelial. Se consideró invasión del tejido conjuntival cuando, desde el borde limbar, se observó la entrada hacia la córnea de un tejido fácilmente identificable de forma visual como tejido conjuntival (Figura 17). El defecto epitelial fue puesto de manifiesto mediante tinción con fluoresceína sódica, lámpara de luz azul cobalto y filtro amarillo para la toma de fotografías. Para realizar las valoraciones lo más objetivamente posible, la superficie corneal fue dividida en 5 zonas, las cuales fueron valoradas de forma independiente asignando valores entre 0 y 4 (de menor a mayor afectación) para cada signo clínico evaluado (Tabla 7 y Figura 17). Posteriormente, se realizó la media aritmética de los valores de las 5 zonas para cada uno de los signos clínicos evaluados para obtener un único valor que representara el estado de la córnea completa. Asimismo, se realizaron fotografías del estado de la superficie ocular. En ellas, la longitud de los neovasos y del tejido conjuntival que penetraban hacia el centro corneal fue cuantificado con el programa de análisis de imagen Image J. Además, en el caso de la longitud de los neovasos se empleó la escala Efron (Figura 17).¹⁶⁸ En cuanto al defecto epitelial, se cuantificó el área afectada mediante planimetría con el programa de análisis de imagen Image J. De igual modo que en el caso del modelo de SIL parcial, transcurridas 11 semanas desde el momento

de la inducción del SIL (8 semanas desde la realización del trasplante), los animales fueron anestesiados y se realizó la eutanasia de los mismos. Los botones corneoesclerales fueron recogidos para su posterior estudio histológico y de inmunofluorescencia.

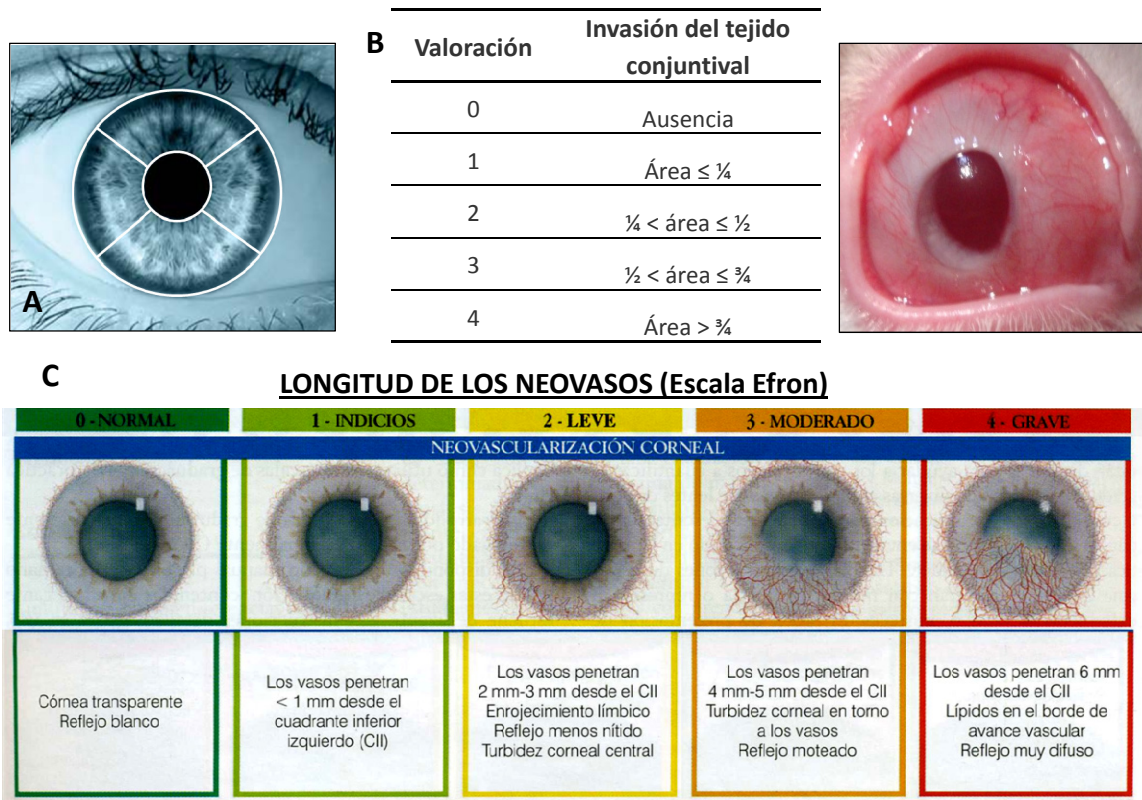


Figura 17. Escalas de valoración de los signos clínicos empleadas en el modelo de SIL total en conejo. (A) Esquema de los 5 cuadrantes en los que se dividió la córnea para la evaluación de los signos clínicos neovascularización, opacidad corneal, invasión del tejido conjuntival y defecto epitelial. (B) Escala de valoración que se utilizó para evaluar la invasión del tejido conjuntival de 0 a 4, de menor a mayor severidad. Fotografía representativa de la invasión del tejido conjuntival hacia la córnea central. (C) Escala Efron con la que se valoró la penetración de los neovasos hacia el centro corneal. Imágenes modificadas de las originales de *Efron N. Grading scales for contact lens complications. Ophthalmic Physiol Opt. 1998;18(2):182-86.*

15. Trasplante de MA con o sin hAT-MSCs sobre la superficie ocular de los modelos animales

15.1. Trasplante en el modelo porcino de SIL

Transcurridas 3 semanas desde la lesión, tal y como se representa en la figura 16, se realizó el trasplante de MA sobre la superficie ocular de 4 animales a los que se les había inducido el SIL. Previamente al trasplante, los animales fueron anestesiados siguiendo el mismo protocolo de anestesia y sedación descrito en el apartado correspondiente a la inducción del SIL en cerdo. El trasplante se realizó suturando la MA a la esclera del animal mediante sutura continua con nailon 9.0. A continuación, se realizó una tarsorrafia con seda 5.0 para proteger el trasplante del parpadeo. Por último, se administraron 40 mg de triamcinolona de forma transeptal en una única dosis y antibióticos (cefalosporina) y analgésicos (buprenorfina 0,01 mg/Kg) sistémicos que se mantuvieron durante la primera semana tras la cirugía.

15.2. Trasplante en los modelos de SIL en conejo

Transcurridas 3 semanas desde la lesión se realizó el trasplante de MA (con o sin hAT-MSCs) sobre la superficie ocular de 15 animales. Tres animales con SIL parcial fueron trasplantados con MA sin hAT-MSCs, 6 animales con SIL parcial fueron trasplantados con MA con 250.000 hAT-MSCs y otros 6 animales con SIL total fueron trasplantados con MA con 250.000 hAT-MSCs. Previamente al trasplante, los animales fueron anestesiados siguiendo el mismo protocolo de anestesia y sedación descrito en el apartado correspondiente a la inducción del SIL parcial y total en conejo. El trasplante se realizó suturando la MA a la esclera del animal mediante 6 puntos, dados de forma continua en el modelo parcial y con puntos sueltos en el modelo total, utilizando una sutura de polipropileno Surgipro™ II 7.0. A continuación, se realizó una tarsorrafia parcial en el ojo implantado con seda 5.0, la cual se mantuvo durante las 2 semanas posteriores al trasplante (tiempo aproximado en el que la MA tarda en reabsorberse) para proteger el trasplante del parpadeo (Figura 18). Inmediatamente después de

realizar el trasplante, se administraron 40 mg de triamcinolona de forma transeptal y durante los cuatro días posteriores a la cirugía se administraron diariamente antiinflamatorios y antibióticos tópicos, y antibióticos y analgésicos sistémicos como se ha descrito en apartados anteriores. En el modelo de SIL total se retiraron los puntos con los cuales se había suturado el trasplante en el momento de la apertura de la tarsorrafia, mientras que estos puntos permanecieron en la esclera a lo largo de todo el estudio en el modelo de SIL parcial.

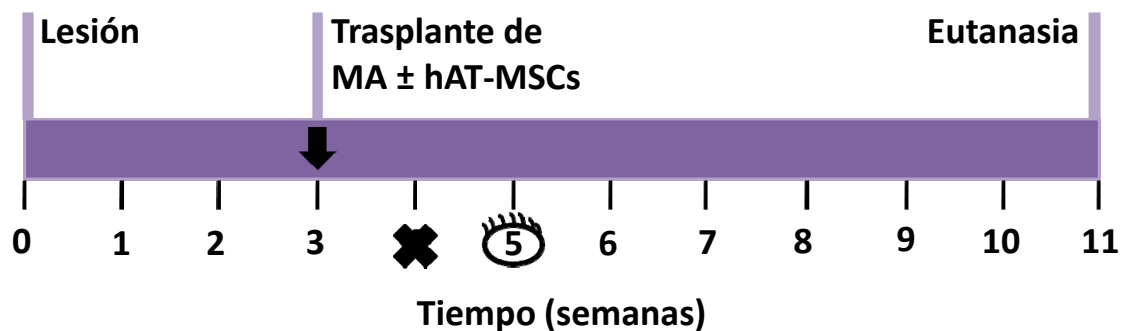


Figura 18. Esquema cronológico de los procedimientos realizados en los modelos de SIL en conejo. Realización de la lesión en la semana 0. Trasplante de MA con o sin hAT-MSCs y realización de tarsorrafia en la semana 3. Valoración semanal de los signos clínicos durante todo el periodo de seguimiento, exceptuando en la semana 4 debido a la presencia de la tarsorrafia (cruz negra). Apertura de la tarsorrafia en la semana 5 (representación de ojo abierto). Eutanasia de los animales en la semana 11.

16. Procesamiento de citologías de impresión corneal

Las citologías de impresión corneal recogidas en las revisiones realizadas durante el seguimiento en el modelo porcino de SIL fueron teñidas con las tinciones de PAS y de Papanicolau modificadas¹⁶⁹ para estudiar la presencia de células caliciformes en la córnea central. Las citologías, una vez fijadas en etanol al 96%, se rehidrataron realizando un pase por alcohol al 70% antes de realizar una inmersión en agua destilada. Posteriormente, se incubaron las muestras con ácido peryódico al 0,5% durante 2 minutos, se lavaron con agua, se incubaron con el reactivo de Schiff durante 2 minutos y con metabisulfito sódico al 0,5% durante 2 minutos. Se realizó una incubación de las citologías con hematoxilina de Gill III durante 2 minutos, seguida de un lavado con agua destilada, una incubación con ácido clorhídrico al 0,05% durante 1

MATERIALES Y MÉTODOS

minuto, otro lavado en agua y una incubación con sustitutivo de agua Scott (2 mg/ml de bicarbonato sódico + 10 mg/ml de sulfato de magnesio en agua destilada) durante 1 minuto. Por último, las citologías se deshidrataron mediante su paso por alcoholes de concentración creciente (80%, 96% y 100%) y un último paso por xileno antes de realizar el montaje de la preparación con Entellan.

17. Microscopía láser confocal en ojos de cerdo *ex vivo*

El estado histológico de la córnea y el limbo en los globos oculares *ex vivo* procedentes del modelo de SIL en cerdo fue estudiado mediante microscopía láser confocal. Se realizaron secciones ópticas desde las capas más superficiales del epitelio hasta las zonas profundas del estroma tanto en áreas del limbo superior e inferior, como en córnea central.

18. Estudio histopatológico

Las muestras histológicas procedentes de los estudios *ex vivo* e *in vivo* fueron inmediatamente fijadas con formaldehído tamponado al 4% tras su obtención para su posterior estudio histopatológico. Previamente a la fijación, las muestras de tejido ocular procedentes de los modelos de SIL parcial y total desarrollados en conejo fueron talladas de forma que se obtuvo únicamente la zona central del botón corneoescleral, comprendiendo limbo superior, córnea central y limbo inferior, para su posterior procesamiento (Figura 19). Una vez fijadas, las muestras fueron procesadas en el procesador automático de tejidos siguiendo los siguientes ciclos: 20 minutos a temperatura ambiente en alcohol al 60%, 20 minutos a temperatura ambiente en alcohol al 70%, 2 pasos de 20 minutos cada uno a temperatura ambiente en alcohol al 95%, 2 pasos de 20 minutos cada uno a temperatura ambiente en alcohol al 100%, 2 pasos de 20 minutos cada uno a temperatura ambiente en alcohol al 100% con xileno, 2 pasos de 20 minutos cada uno a temperatura ambiente en xileno y, por último, 4 pasos de 15 minutos cada uno a 60°C con presión y vacío en parafina. A continuación, las

muestras fueron incluidas en parafina y cortadas en el microtomo con un espesor de 4 μm .

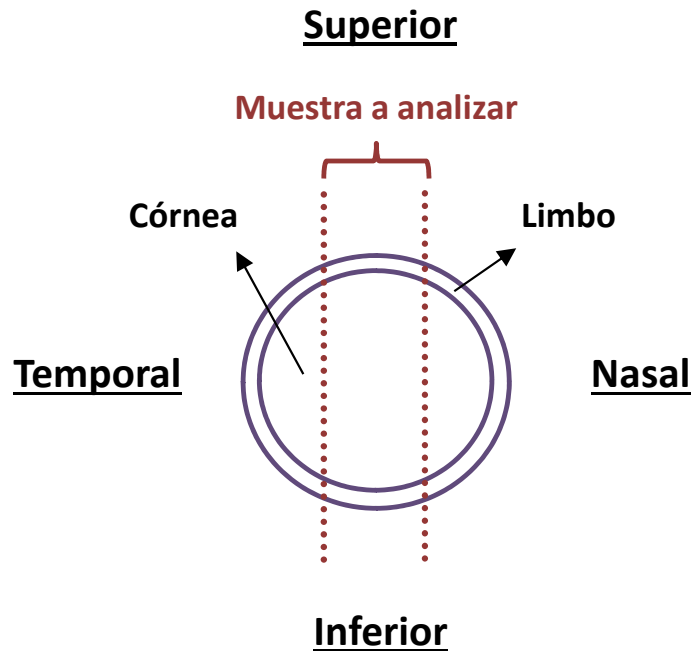


Figura 19. Esquema representativo de la muestra tisular recogida para su posterior análisis histopatológico en los estudios *ex vivo* e *in vivo*. Se recogieron los botones corneoesclerales y se tallaron de forma que se obtuvo únicamente la zona central, comprendiendo limbo superior, córnea central y limbo inferior, para su posterior procesamiento.

Previamente a la realización de la tinción con PAS, los cortes histológicos fueron desparafinados para permitir la penetración en el interior de los tejidos de las soluciones acuosas utilizadas durante la tinción. Para ello, las muestras se mantuvieron en una estufa a 60°C durante toda la noche y, posteriormente, se incubaron con xileno puro en tres pasos de 5 minutos cada uno. Para rehidratar las muestras, éstas se pasaron por una batería de alcoholes de concentración decreciente (100% , 96% y 80%) manteniéndolas durante 4 minutos en cada uno de ellos. Posteriormente, los cortes fueron lavados con agua e incubados con ácido peryódico al 0,5% durante 5 minutos para su tinción. A continuación, las muestras se lavaron con agua destilada de nuevo y se incubaron con el reactivo de Schiff durante 15 minutos en oscuridad. Tras otro lavado con agua destilada, los tejidos se incubaron con hematoxilina de Gill III durante 5 minutos. Por último, los cortes histológicos fueron lavados con agua corriente y

MATERIALES Y MÉTODOS

pasados por una batería de alcoholes de concentración creciente (80%, 90% y 100%) y xileno para deshidratar las muestras y realizar el montaje de las preparaciones con la solución Entellan. Las muestras fueron escaneadas en el ACIS III (*Automated Cellular Imaging System*), de donde fueron obtenidas fotografías representativas.

Mediante la tinción con PAS se puso de manifiesto la presencia de células caliciformes (típicas del epitelio conjuntival) en el epitelio corneal y limbar y la presencia de células inflamatorias y vasos sanguíneos en el estroma corneal y limbar. Además, se estudiaron los cambios estructurales producidos en los tejidos como consecuencia de la realización del daño o del trasplante de las MA con o sin hAT-MSCs.

19. Análisis estadístico

Los valores representados en el presente trabajo corresponden con la media de los resultados obtenidos en los diferentes experimentos realizados \pm el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico SPSS (SPSS 18.0 para Windows, SPSS Inc.) y bajo el asesoramiento de la Unidad de Estadística del IOBA (Dra. Itziar Fernández). Los valores de $p \leq 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Las diferencias entre dos condiciones fueron calculadas aplicando el test de t-Student de muestras independientes.

En el estudio de la capacidad de diferenciación de las hAT-MSCs hacia epitelio corneal se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA) de 2 factores. Se realizó una prueba de homogeneidad de las varianzas (test de Levene) para determinar qué test estadístico aplicar, el test de Tukey para varianzas homogéneas o el test de Games-Howell para varianzas diferentes.

Para el análisis de los signos clínicos evaluados en los modelos de SIL, los datos fueron transformados en proporción de cambio con respecto a la semana 3 (momento de la realización del trasplante), para poder analizar el efecto del trasplante, y se aplicaron

test no paramétricos. Para comparar la severidad de los signos entre los diferentes grupos de animales se utilizaron el test de Kruskal-Wallis (con más de dos grupos) y el test de U de Mann-Whitney (con dos grupos). Para estudiar la evolución de dichos signos a lo largo del tiempo se emplearon el test de Friedman (con más de dos grupos) y el test de Wilcoxon (con dos grupos). Además, para el estudio de los signos clínicos cuantificados mediante análisis de imagen se realizó un ANOVA de 1 factor (test de Tukey o test de Games-Howell).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Caracterización de la población celular estromal aislada a partir de los lipoaspirados

La población celular estromal aislada a partir de los lipoaspirados fue caracterizada, tal y como se describe en la sección de materiales y métodos, con el fin de asegurar que la población celular utilizada en el presente trabajo cumplía los criterios mínimos para ser considerada como una población de MSCs.⁹⁶ Siguiendo estos criterios, en primer lugar se aseguró su capacidad de adherencia al plástico observándolas durante el cultivo tras su aislamiento. Durante los primeros días de cultivo, se observó cómo gran parte de las células aisladas no se adherían al plástico ya que eran células sanguíneas. Por el contrario, otra parte de la población celular aislada se adhería de forma eficaz a las placas de cultivo. Mediante la realización de pases sucesivos, las células sanguíneas no adherentes se fueron eliminando y la población celular seleccionada mantenía la capacidad de adherencia al plástico.

Mediante citometría de flujo, se estudió el inmunofenotipo de las distintas poblaciones celulares aisladas de diferentes donantes cuando se encontraban en P3-4 tras ser cultivadas en condiciones estándar. Se observó que más del 95% de la población celular expresaba los marcadores CD73, CD90 y CD105, mientras que menos del 2% de la población expresaba los marcadores CD34, CD45, CD14, CD19 y HLA-DR (Figura 20). Por tanto, las poblaciones celulares obtenidas a partir de los diferentes lipoaspirados presentaba el inmunofenotipo propio de una población de MSCs.

RESULTADOS

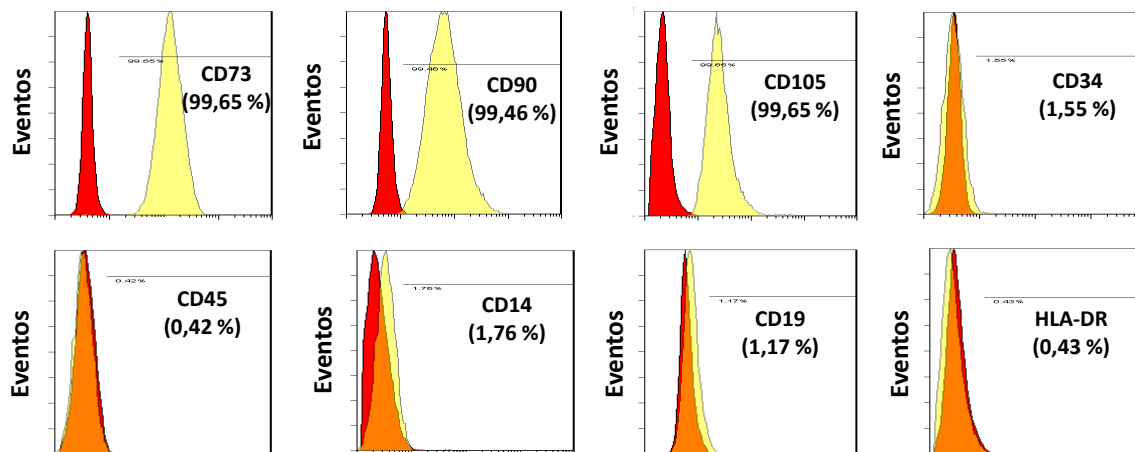


Figura 20. Análisis de la expresión de marcadores de MSCs por citometría de flujo. Más del 95% de la población celular analizada expresaba los marcadores CD73, CD90 y CD105, mientras que menos del 2% de la población expresaba los marcadores CD34, CD45, CD14, CD19 y HLA-DR. En rojo se representan los controles de isotipo, mientras que en amarillo se representa la expresión del marcador correspondiente. En naranja se observa la superposición de ambos colores. Resultados representativos procedentes de 6 experimentos independientes a partir de muestras de 6 donantes diferentes.

Además, se estudió la capacidad de diferenciación *in vitro* de la población celular obtenida hacia tejido adiposo, óseo y cartilaginoso. Se observó que las células se diferenciaron a adipocitos, osteoblastos y condroblastos tras 15, 29 y 27 días de cultivo en las condiciones inductoras de la diferenciación, respectivamente. Tras la inducción adipogénica, se observó la presencia de vacuolas lipídicas ocupando la mayor parte de los citoplasmas celulares (teñidas en rojo con la tinción Oil Red O). La diferenciación a osteoblastos fue puesta de manifiesto por la aparición de depósitos de calcio (teñidos en negro con la tinción de Von Kossa). En la diferenciación condrogénica, se observaron los mucopolisacáridos (teñidos en azul con la tinción de azul alcian) presentes en la matriz extracelular secretada por los condroblastos (Figura 21).

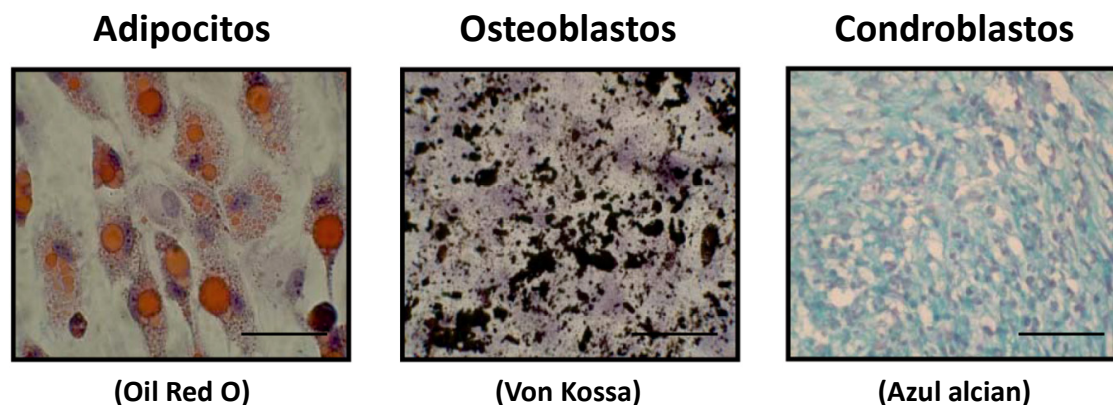


Figura 21. Capacidad de diferenciación multilínea de la población celular aislada de los lipoaspirados. Las células se diferenciaron a adipocitos (teñidas en rojo con la tinción Oil Red O), osteoblastos (depósitos de calcio teñidos en negro con la tinción de Von Kossa) y condroblastos (mucopolisacáridos teñidos en azul con la tinción azul alcian) tras su cultivo en condiciones inductoras de la diferenciación. Resultados representativos procedentes de 6 experimentos independientes a partir de muestras de 6 donantes diferentes. Escala de la barra: 50 μ m.

Con estos resultados, se pudo afirmar que las poblaciones celulares estromales aisladas a partir de los lipoaspirados y utilizadas en este trabajo cumplían los criterios mínimos definidos por la ISCT para ser consideradas MSCs.

Además, se estudió su morfología, su complejidad, su viabilidad y su ciclo celular tras ser cultivadas hasta P3-4 en condiciones estándar. Mediante microscopía óptica de contraste de fases se observó la morfología alargada y fusiforme típica de las hAT-MSCs (Figura 22). Mediante citometría de flujo se analizó el tamaño y la complejidad celular, observándose que las hAT-MSCs cultivadas en condiciones estándar presentaban un tamaño variable y una complejidad celular baja. La viabilidad de las hAT-MSCs cultivadas en condiciones estándar fue siempre superior al 95%. En cuanto al ciclo celular, el índice medio de proliferación de las hAT-MSCs cultivadas en condiciones estándar fue de $20,8\% \pm 2,8\%$, lo que indicó que era una población celular con elevada tasa de proliferación, ya que aproximadamente el 20% de las células estaban proliferando (Figura 22).

RESULTADOS

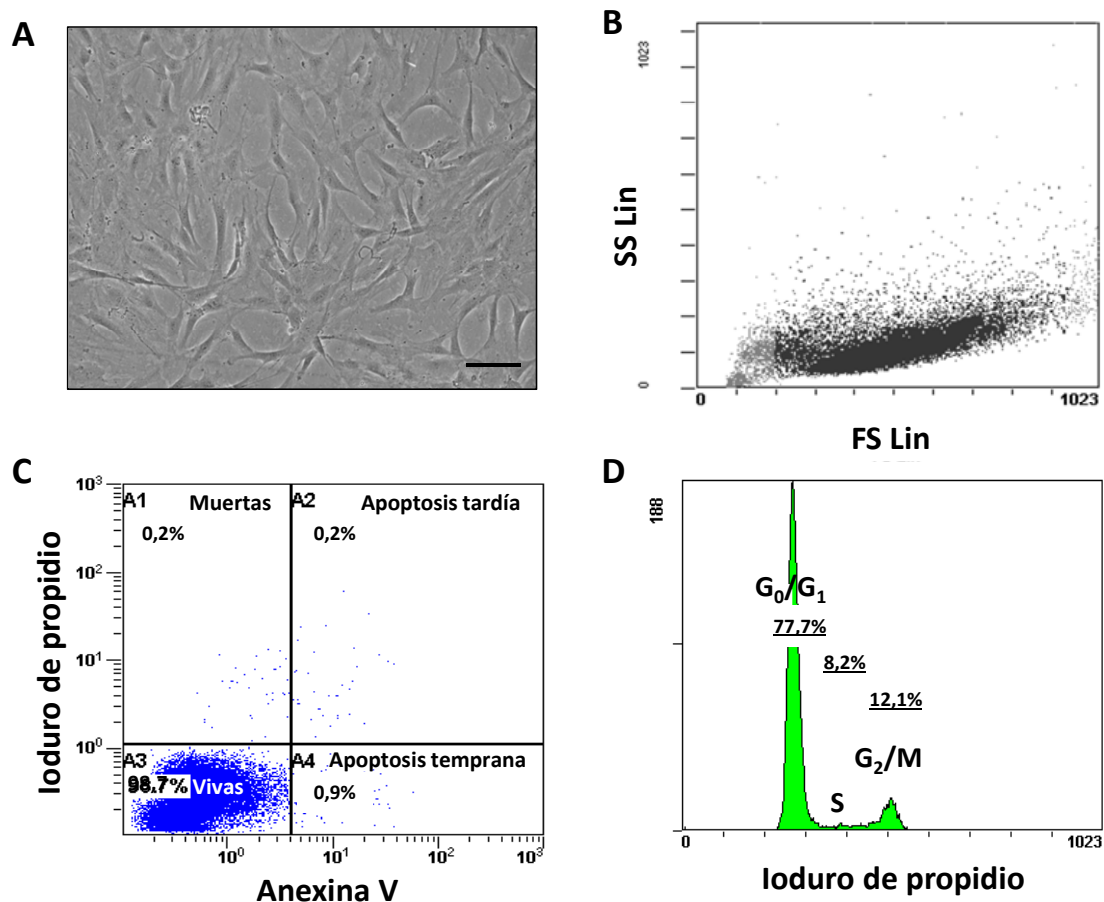


Figura 22. Morfología, complejidad, viabilidad y ciclo celular de la población de hAT-MSCs cultivadas en condiciones estándar. (A) Fotografía tomada en un microscopio óptico de contraste de fases donde se observa la capacidad de adherencia al plástico de las hAT-MSCs y su morfología alargada y fusiforme. Escala de la barra: 100 μ m. (B) Gráfico obtenido mediante citometría de flujo en el que se representa el tamaño celular (FS, en el eje de abscisas) y la complejidad celular (SS, en el eje de ordenadas) de hAT-MSCs en P3-4. Las hAT-MSCs en P3-4 cultivadas en condiciones estándar presentaron un tamaño variable y una complejidad celular baja. (C) Gráfico obtenido mediante citometría de flujo donde se representa la viabilidad celular de una población de hAT-MSCs en P3-4 cultivadas bajo condiciones estándar. Más del 95% de la población de hAT-MSCs fueron viables (negativas para los marcajes con anexina V y ioduro de propidio). (D) Gráfico obtenido mediante citometría de flujo donde se representa el ciclo celular de una población de hAT-MSCs en P3-4 cultivadas bajo condiciones estándar en la que en torno al 20% de las células se encontraban proliferando (células en fases S + G₂/M). Resultados representativos procedentes de 6 experimentos independientes a partir de muestras de 6 donantes diferentes.

2. Caracterización de la línea celular de epitelio corneal humano HCE y de los FL humanos

De forma previa a la obtención de los medios de cultivo condicionados, se caracterizaron las células utilizadas para condicionar estos medios de cultivo. Bajo el microscopio óptico de contraste de fases, la línea celular HCE presentó una morfología poligonal, típica de las células epiteliales. Mediante inmunofluorescencia, se observó que estas células expresaban las proteínas específicas de epitelio corneal diferenciado CK3 y CK12 (Figura 23). Por otro lado, los FL presentaron una morfología alargada y fusiforme. Además, se comprobó que estas células expresaban las proteínas típicas de fibroblastos CD90, vimentina y FSP1 (S100A4).¹⁷⁰⁻¹⁷² No se observó expresión del marcador pan-CK en los cultivos de FL, lo que descartó la contaminación de células epiteliales en dicha población celular (Figura 23).

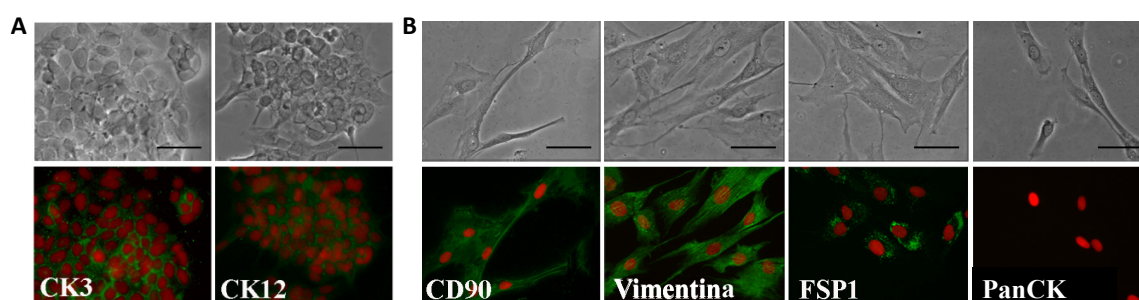


Figura 23. Caracterización de las células HCE y de los FL. (A) Las células de la línea celular HCE mostraron una morfología poligonal y la expresión de los marcadores de epitelio corneal diferenciado CK3 y CK12 (fluorescencia verde). Imágenes representativas de 4 experimentos independientes. (B) Los FL mostraron una morfología fusiforme, expresaron las proteínas CD90, vimentina y FSP1 (S100A4) (fluorescencia verde) y no expresaron el marcador epitelial pan-CK. Imágenes representativas de 4 experimentos independientes de FL aislados de 4 donantes diferentes. Núcleos celulares contrateñidos con yoduro de propidio (fluorescencia roja). Escala de la barra: 50 μ m.

3. Efecto de las condiciones de inducción de la diferenciación hacia epitelio corneal sobre las hAT-MSCs

Las hAT-MSCs en P3-4 fueron cultivadas durante 15 días (o 22 días para el análisis de ARNm) bajo condiciones de inducción de la diferenciación hacia epitelio corneal. Para ello, se cultivaron en confluencia elevada (40.000 células/cm²) sobre plástico o colágeno IV y con el medio de cultivo base (MB) o los medios condicionados HCEcMB o FLcMB.

3.1. Efecto en la morfología, la complejidad, la viabilidad y el ciclo celular

Bajo el microscopio óptico de contraste de fases, se observó que las hAT-MSCs cultivadas durante 15 días en confluencia elevada en plástico y colágeno IV y con los medios MB y FLcMB mantenían una morfología celular alargada y fusiforme. En cambio, cuando fueron cultivadas con el medio HCEcMB, tanto sobre colágeno IV como sobre plástico, las células adquirieron una morfología más poligonal, más similar a la morfología típica epitelial (Figura 24A). Mediante citometría de flujo, se observó que, bajo las diferentes condiciones de cultivo estudiadas, las hAT-MSCs aumentaron en complejidad en comparación con las hAT-MSCs cultivadas en condiciones estándar. El mayor aumento de complejidad se observó en las células cultivadas con el medio HCEcMB, tanto en plástico como en colágeno IV (Figura 24B). Estos datos fueron corroborados mediante microscopía óptica de contraste de fases, ya que se observó que las hAT-MSCs cultivadas con HCEcMB mostraban mayor cantidad de gránulos citoplasmáticos en comparación con las células cultivadas en el resto de condiciones (Figura 24). El sustrato en el que se cultivaron las células no produjo efectos significativos en el grado de complejidad celular.

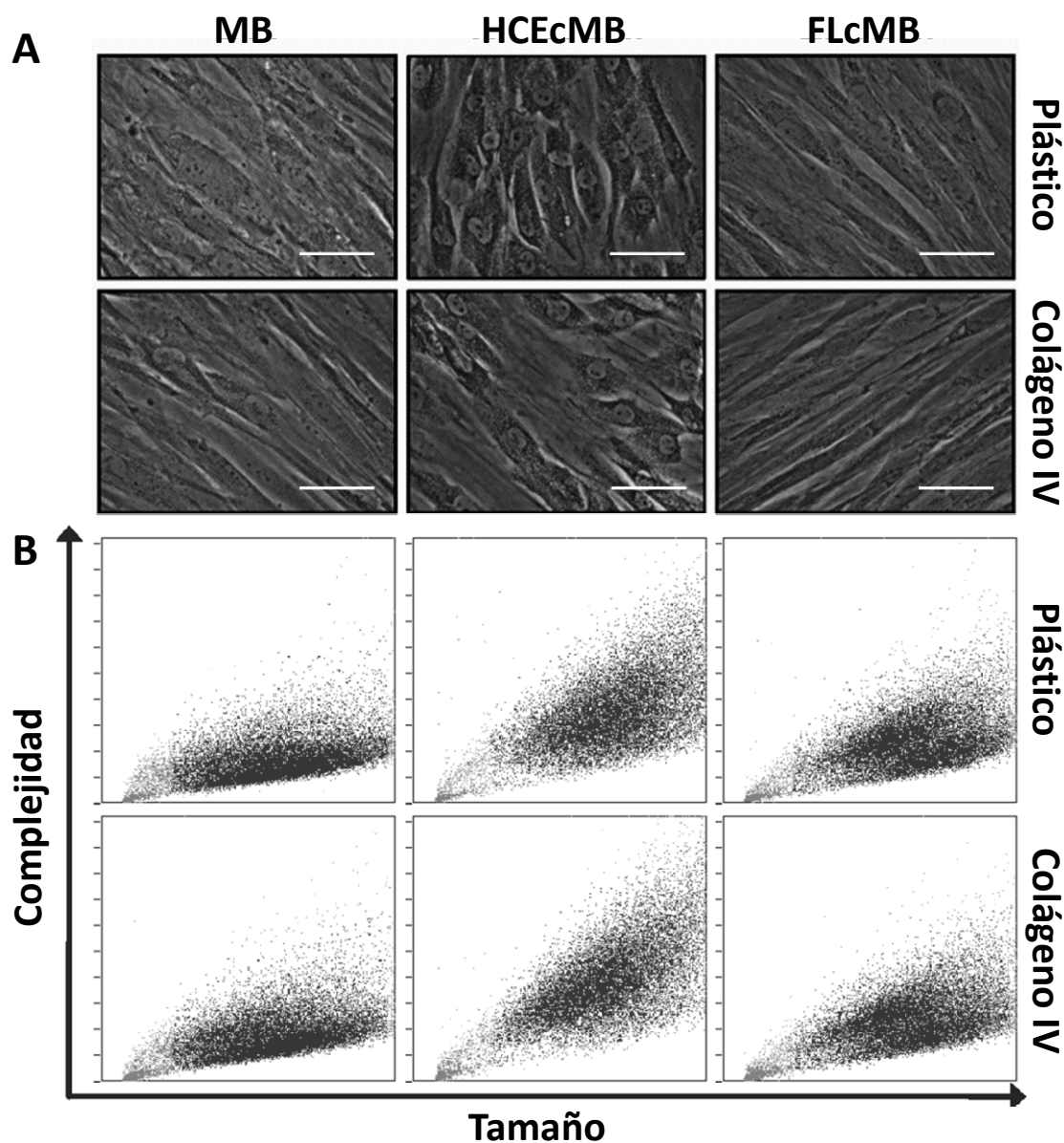


Figura 24. Morfología, tamaño y complejidad de las hAT-MSCs cultivadas durante 15 días en condiciones inductoras de diferenciación hacia epitelio corneal. (A) Fotografías tomadas en un microscopio óptico de contraste de fases. (B) Histogramas obtenidos mediante citometría de flujo donde se representa el tamaño celular (eje de abscisas) frente a la complejidad celular (eje de ordenadas). Se observó una morfología más poligonal en las hAT-MSCs cultivadas con HCEcMB. La complejidad celular aumentó en las diferentes condiciones de cultivo, con respecto a las hAT-MSCs cultivadas en condiciones estándar, alcanzando la mayor complejidad aquellas células cultivadas con el medio HCEcMB. Resultados representativos procedentes de 4 experimentos independientes. Escala de la barra: 50 μm .

En todas las condiciones estudiadas, la viabilidad de las hAT-MSCs fue superior al 95%, por lo que las condiciones inductoras de la diferenciación no afectaron a la viabilidad celular. En cuanto al ciclo celular, el índice medio de proliferación de las hAT-MSCs

RESULTADOS

cultivadas en las condiciones inductoras de la diferenciación disminuyó de forma estadísticamente significativa de $20,8\% \pm 2,8\%$ (en condiciones estándar) a $12,7\% \pm 1,8\%$ (en condiciones inductoras de la diferenciación).

3.2. Efecto en el inmunofenotipo

Mediante citometría de flujo, se analizó la expresión de los marcadores CD73, CD90, CD105, CD34, CD45, CD14, CD19 y HLA-DR en las hAT-MSCs cultivadas durante 15 días en las diferentes condiciones de diferenciación. No se observaron cambios en cuanto al porcentaje de células que expresaban cada marcador en las poblaciones celulares analizadas con respecto a las hAT-MSCs cultivadas en condiciones estándar. Más del 95% de la población celular expresó los marcadores CD73, CD90 y CD105, y menos del 2% de la población expresó CD34, CD45, CD14, CD19 y HLA-DR. Por el contrario, se observaron cambios en cuanto a la cantidad de proteína media expresada por célula, representado como MFI. En las hAT-MSCs cultivadas bajo condiciones estándar, el MFI de los marcadores CD73, CD90 y CD105 fue de 13,7, 13,2 y 2,9, respectivamente. En las hAT-MSCs cultivadas durante 15 días en las diferentes condiciones estudiadas, el MFI de estos mismos marcadores CD73, CD90 y CD105 aumentó con respecto a las células cultivadas en condiciones estándar. En el caso del CD105, además, el aumento del MFI fue estadísticamente significativo en las hAT-MSCs cultivadas en HCEcMB, con respecto a las células cultivadas en MB o FLcMB (Figura 25). No se encontraron diferencias entre el MFI de las células cultivadas en plástico y las cultivadas en colágeno IV. Los MFI de los marcadores CD34, CD45, CD14, CD19 y HLA-DR no sufrieron ningún cambio en las células cultivadas en las diferentes condiciones estudiadas con respecto a las células cultivadas en condiciones estándar.

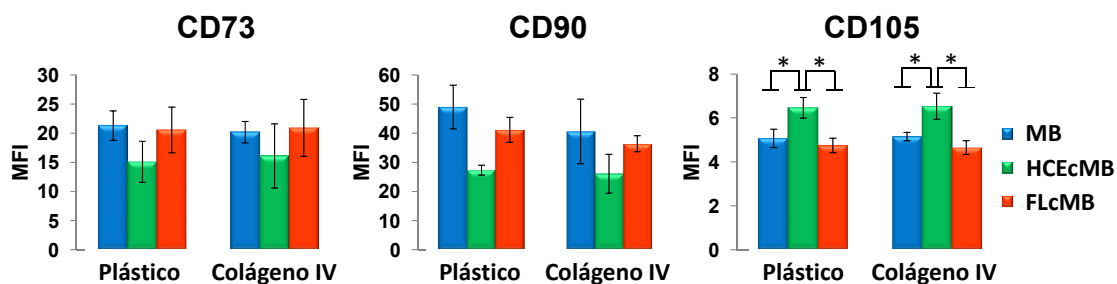


Figura 25. Inmunofenotipo de las hAT-MSCs tras 15 días de cultivo en condiciones inductoras de diferenciación hacia epitelio corneal. La cantidad de proteína media expresada por célula (MFI) del marcador CD105 aumentó de forma significativa en las hAT-MSCs tras 15 días de cultivo con el medio HCEcMB. No se encontraron diferencias significativas entre los dos sustratos estudiados. Resultados obtenidos mediante citometría de flujo y expresados como la media aritmética de 4 experimentos independientes \pm SEM. Test estadístico: ANOVA de 2 factores. * $p \leq 0,05$.

Además, se estudió la expresión de estos marcadores en la línea celular HCE y en los FL. Sorprendentemente, el 82% de la población de células HCE expresaba CD73, y el 67% expresaba CD105, pero ninguno de los demás marcadores analizados. En el caso de los FL, éstos expresaron los marcadores CD73, CD90 y CD105 (el 97%, 95% y 86% de la población de FL, respectivamente), mostrando así un inmunofenotipo similar al de las hAT-MSCs. En cuanto al MFI de los diferentes marcadores, tanto en células HCE como en FL, la cantidad de proteína expresada por célula fue en todos los casos menor que la expresada por las hAT-MSCs (datos no mostrados).

3.3. Efecto en la expresión génica y proteica de marcadores de epitelio corneal diferenciado

Mediante RT-PCR a tiempo real, se analizó la expresión relativa de ARNm de los marcadores propios de epitelio corneal diferenciado CK3 y CK12 en las hAT-MSCs cultivadas durante 1, 8, 15 y 22 días en las diferentes condiciones estudiadas. La expresión de ARNm detectada en las células cultivadas en las diferentes condiciones fue comparada con la expresión encontrada en las hAT-MSCs cultivadas en MB y plástico (calibrador), a la cual se le asignó de forma arbitraria el valor 1. Transcurridos 22 días de incubación, la expresión relativa de ARNm de CK3 fue significativamente menor en las células cultivadas en plástico con FLcMB con respecto a las cultivadas con MB. En las

RESULTADOS

hAT-MSCs cultivadas en colágeno IV, la disminución de la expresión de CK3 se produjo en el día 1 de incubación, tanto en las células incubadas con HCEcMB como en las incubadas con FLcMB. Aunque la expresión relativa de ARNm de CK3 en las células cultivadas sobre plástico fue mayor que en las cultivadas sobre colágeno IV, estas diferencias no fueron significativas (Figura 26).

En el caso del marcador CK12, la expresión relativa de ARNm permaneció estable en el tiempo en las células incubadas con FLcMB, en ambos sustratos. En las hAT-MSCs cultivadas con HCEcMB, la expresión relativa de CK12 aumentó a lo largo del tiempo, alcanzando la mayor expresión tras 8 días de cultivo en ambos sustratos. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las hAT-MSCs cultivadas durante 8 y 15 días en plástico con HCEcMB con respecto a las células cultivadas durante 1 día en las mismas condiciones. El aumento de expresión de CK12 fue significativo a los 8, 15 y 22 días en las células cultivadas con HCEcMB en plástico con respecto a las células cultivadas en MB o FLcMB. En el caso de las células cultivadas sobre colágeno IV, la expresión relativa de CK12 fue significativamente mayor en las células cultivadas durante 8 días con HCEcMB con respecto a las cultivadas con FLcMB. Aunque el aumento en la expresión relativa de ARNm de CK12 fue mayor en las células crecidas sobre plástico que en las crecidas sobre colágeno IV, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos sustratos (Figura 26).

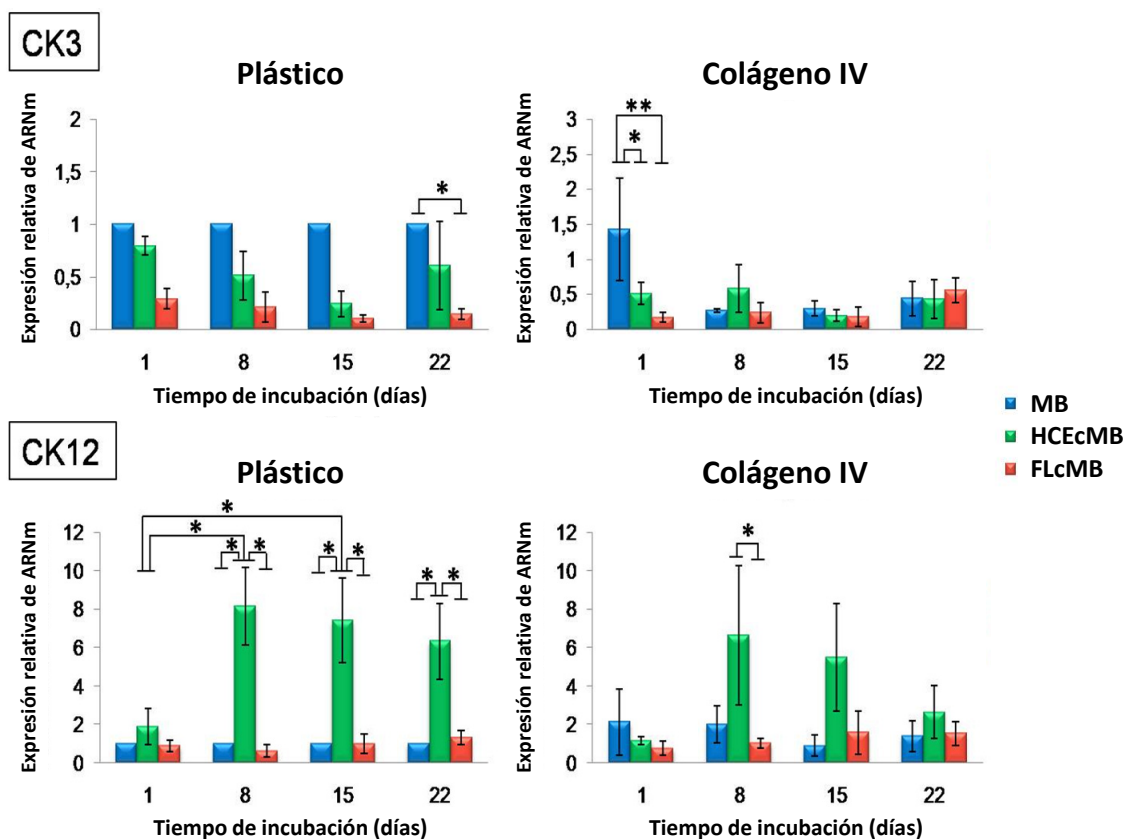


Figura 26. Expresión relativa de ARNm de CK3 y CK12 en hAT-MSCs cultivadas, hasta 22 días, en condiciones inductoras de diferenciación hacia epitelio corneal. La expresión relativa de ARNm del marcador de epitelio corneal CK12 fue significativamente mayor en las células cultivadas con HCEcMB en comparación con las células cultivadas con FLcMB o MB. Resultados obtenidos mediante RT-PCR a tiempo real y expresados como la media aritmética de 4 experimentos independientes \pm SEM. Test estadístico: ANOVA de 2 factores. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

La expresión proteica de los marcadores CK3 y CK12 en las hAT-MSCs cultivadas durante 15 días en las diferentes condiciones descritas anteriormente fue analizada mediante *western-blotting*. Los extractos proteicos de la línea celular HCE fueron utilizados como controles positivos para la identificación de las bandas de CK3 y CK12. En todas las células estudiadas, la proteína CK3 fue detectada en una banda de 64 KDa, mientras que la proteína CK12 fue detectada en una banda de 108 KDa. La expresión detectada en las hAT-MSCs cultivadas en las diferentes condiciones fue comparada con la expresión mostrada por las células cultivadas con MB sobre plástico, a la cual se le asignó de forma arbitraria el valor 1. En las hAT-MSCs cultivadas en colágeno IV con HCEcMB, la expresión de CK3 disminuyó significativamente con respecto a las células cultivadas en MB. En el caso de la CK12, en las células cultivadas en plástico con

RESULTADOS

HCEcMB la expresión de este marcador fue significativamente mayor que en las células cultivadas con FLcMB o MB. Aunque la expresión del marcador CK12 fue mayor en las células crecidas en plástico que en las crecidas en colágeno IV, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos sustratos (Figura 27).

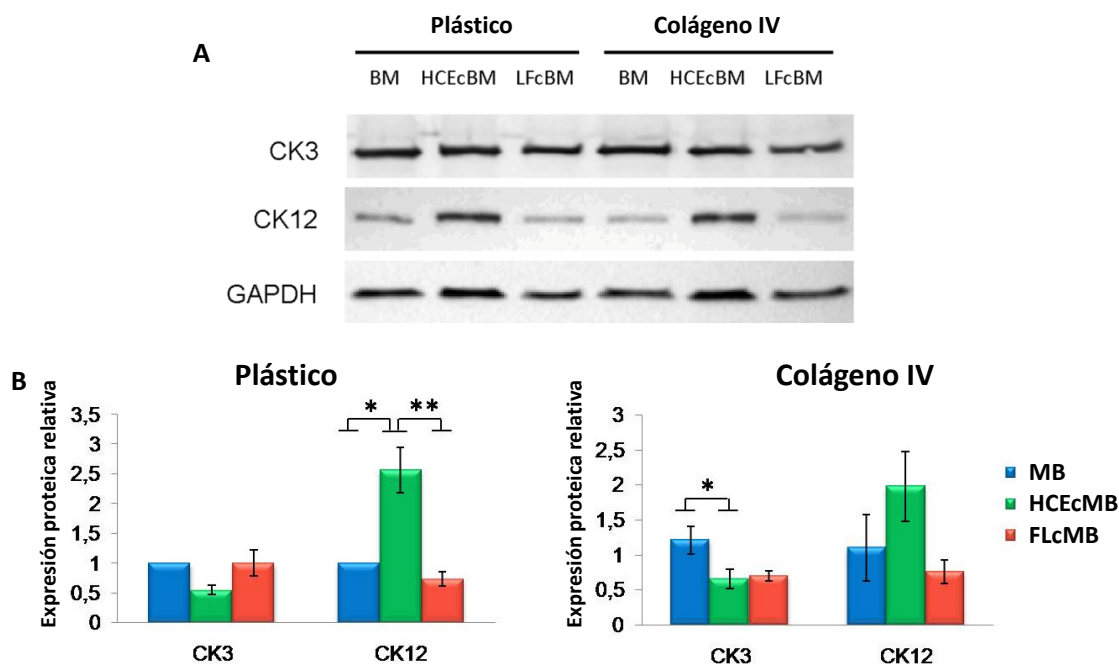


Figura 27. Expresión proteica de CK3 y CK12 en hAT-MSCs cultivadas durante 15 días en condiciones inductoras de diferenciación hacia epitelio corneal. (A) Imagen representativa de las bandas obtenidas mediante *western-blotting* en 3 experimentos independientes. (B) Resultados obtenidos mediante densitometría de las bandas procedentes de 3 experimentos independientes. La expresión del marcador de epitelio corneal CK12 fue significativamente mayor en las hAT-MSCs cultivadas con HCEcMB en comparación con los otros medios de cultivo estudiados. Datos normalizados con GAPDH y expresados como la media aritmética \pm SEM. Test estadístico: ANOVA de 2 factores. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

La expresión de los marcadores propios de epitelio corneal CK3 y CK12 fue también analizada mediante inmunofluorescencia en las hAT-MSCs cultivadas durante 15 días en las diferentes condiciones de cultivo. Se observó que las hAT-MSCs cultivadas en condiciones estándar y los FL (resultados no mostrados), expresaban de forma basal estas proteínas. Se observó la expresión de CK3 en las hAT-MSCs cultivadas en las diferentes condiciones, siendo mayor la expresión en plástico que en colágeno IV. En células HCE, FL y hAT-MSCs cultivadas en condiciones estándar o en sobreconfluencia con MB, la expresión de CK12 se observó localizada por todo el citoplasma (Figuras 23 y

28). Sin embargo, en las hAT-MSCs cultivadas con HCEcMB o FLcMB, la localización de la proteína CK12 se observó en zonas perinucleares. No se observaron diferencias entre los sustratos plástico y colágeno IV en cuanto a la expresión de CK12 (Figura 28).

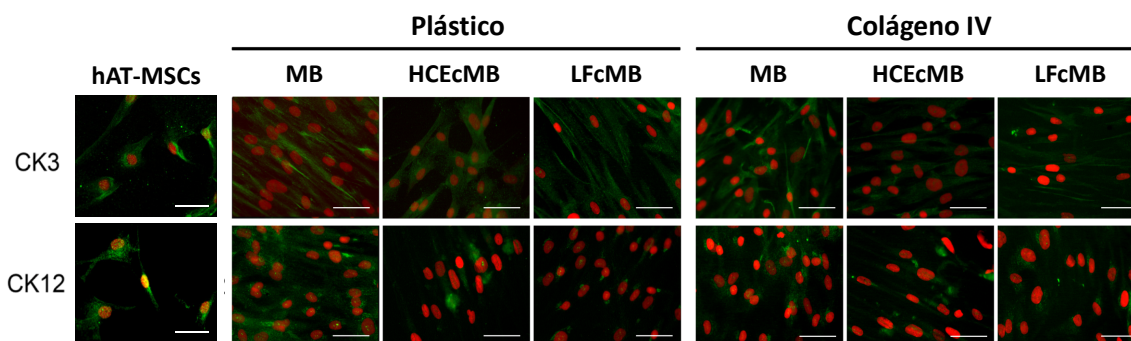


Figura 28. Análisis por inmunofluorescencia de la expresión proteica de CK3 y CK12 en hAT-MSCs cultivadas en condiciones estándar o en condiciones inductoras de diferenciación hacia epitelio corneal durante 15 días. Las hAT-MSCs cultivadas en condiciones estándar expresaron los marcadores CK3 y CK12 (fluorescencia verde) en todo su citoplasma. En las hAT-MSCs cultivadas con HCEcMB y FLcMB la expresión del marcador de epitelio corneal CK12 se localizó en zonas perinucleares. Los núcleos celulares fueron teñidos con yoduro de propidio (fluorescencia roja). Imágenes representativas procedentes de 3 experimentos independientes. Escala de la barra: 50 μ m.

En resumen, en las hAT-MSCs cultivadas con el medio condicionado HCEcMB se observó la adquisición de una morfología más poligonal, un aumento de la complejidad celular y un aumento de la expresión de los marcadores CD105 y CK12. Estos resultados sugieren que las hAT-MSCs son capaces de adquirir características similares a las propias del fenotipo epitelial corneal cuando son sometidas a un microentorno con señales proporcionadas por un epitelio corneal diferenciado.

4. Estudio de dosis celulares en el modelo *ex vivo* de daño corneal por causticación

Para establecer la dosis más adecuada de hAT-MSCs con la que realizar los trasplantes a la superficie ocular, se utilizó un modelo *ex vivo* de daño corneal por causticación desarrollado en el laboratorio dirigido por la Prof. Julie Daniels (Department of Ocular Biology and Therapeutics, Institute of Ophthalmology, University College London (UCL)).

RESULTADOS

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral, se realizó una estancia de 3 meses de duración en dicho laboratorio con el fin de estudiar la dosis de hAT-MSCs más adecuada utilizando el modelo de daño corneal *ex vivo*. Gracias a la realización de esta estancia, la presente tesis doctoral opta a la “mención internacional”.

4.1. Estudios realizados levantando la MA

Efecto de las diferentes dosis de hAT-MSCs en el grado de defecto epitelial

Se desarrolló el modelo de daño epitelial (córnea y limbo dañados) en ojos de cerdo *ex vivo* y se le aplicaron MA con 250.000, 1.000.000 y 10.000.000 de hAT-MSCs. Transcurridas 2 semanas desde la aplicación de MA con las diferentes dosis celulares, las MA fueron levantadas de los botones corneoesclerales y se estudió el grado de defecto epitelial mediante tinción con fluoresceína sódica. Como controles se utilizaron botones corneoesclerales mantenidos con epitelio, botones desepitelizados y botones desepitelizados trasplantados con MA sin células. En los botones control que se mantuvieron con el epitelio durante 2 semanas en interfase aire-líquido se observó la aparición de pequeños defectos epiteliales. En todos los botones corneoesclerales en los que se había retirado el epitelio previamente, los defectos epiteliales observados en la córnea alcanzaron áreas mayores a 1,2 cm². El área de defecto epitelial fue significativamente mayor en los botones corneoesclerales desepitelizados y trasplantados con MA, con MA + 1.000.000 hAT-MSCs y con MA + 10.000.000 hAT-MSCs con respecto al de los botones mantenidos con epitelio sin trasplantar. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el área de defecto epitelial entre los botones sin epitelio tratados con diferentes dosis de hAT-MSCs, ya que en todos los casos se observaron defectos epiteliales que ocupaban áreas mayores a 1,2 cm² (Figura 29).

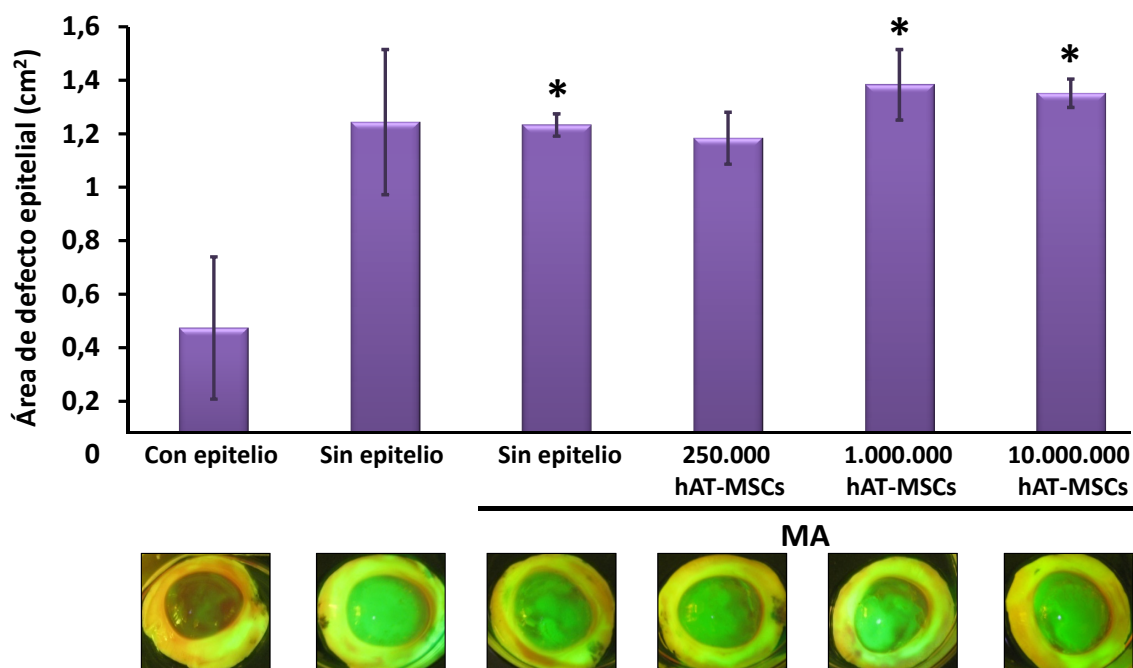


Figura 29. Defecto epitelial observado en los botones corneoesclerales del modelo *ex vivo* trasplantados con diferentes dosis de hAT-MSCs tras levantar las MA de la superficie ocular. Los datos (representados como la media aritmética de 3 experimentos independientes \pm SEM) y las imágenes muestran el área de defecto epitelial (tinción con fluoresceína sódica en verde) que presentaron los botones corneoesclerales. En los botones desepitelizados y trasplantados con MA, MA + 1.000.000 hAT-MSCs y MA + 10.000.000 hAT-MSCs el defecto epitelial fue significativamente mayor que en los botones mantenidos con epitelio. No se observaron diferencias significativas entre los botones sin epitelio trasplantados con diferentes dosis de hAT-MSCs. Resultados representativos de 3 experimentos independientes. Test estadístico: t-Student. * $p \leq 0,05$.

Se realizó un estudio histológico y se analizó el estado del epitelio en los botones corneoesclerales tras levantar las MA de los mismos. Además de las muestras descritas anteriormente, se estudiaron muestras control con y sin epitelio fijadas en el momento de ser recibidas del matadero. Las muestras control con epitelio presentaban 6-7 capas de epitelio en la córnea y 8-9 capas de epitelio en el limbo. Además, el limbo presentaba una estructura de crestas y valles similar a la descrita en humanos. En el caso de las muestras control sin epitelio, fijadas tras la desepitelización, se observó la ausencia total de epitelio tanto en córnea como en limbo. En el caso de los botones corneoesclerales con epitelio mantenidos en cultivo durante 2 semanas, se observó una pérdida de capas de epitelio con respecto al epitelio en condiciones control, presentando 3-4 capas de células epiteliales, tanto en córnea como en limbo, lo que se

RESULTADOS

correlacionó con los pequeños defectos epiteliales observados con la tinción de fluoresceína (Figura 29 y 30). En los botones desepitelizados cultivados durante 2 semanas, se observó la ausencia de epitelio casi en la totalidad de la córnea y el limbo, apareciendo únicamente alguna célula epitelial en zonas aisladas. En los botones desepitelizados y trasplantados con MA (sin hAT-MSCs) se observaron 1-2 capas de células epiteliales. En el caso de los botones corneoesclerales desepitelizados y trasplantados con MA con diferentes dosis de hAT-MSCs se observaron 1-2 capas de células epiteliales tanto en córnea como en limbo, sin diferencias entre las diferentes dosis celulares trasplantadas (Figura 30).

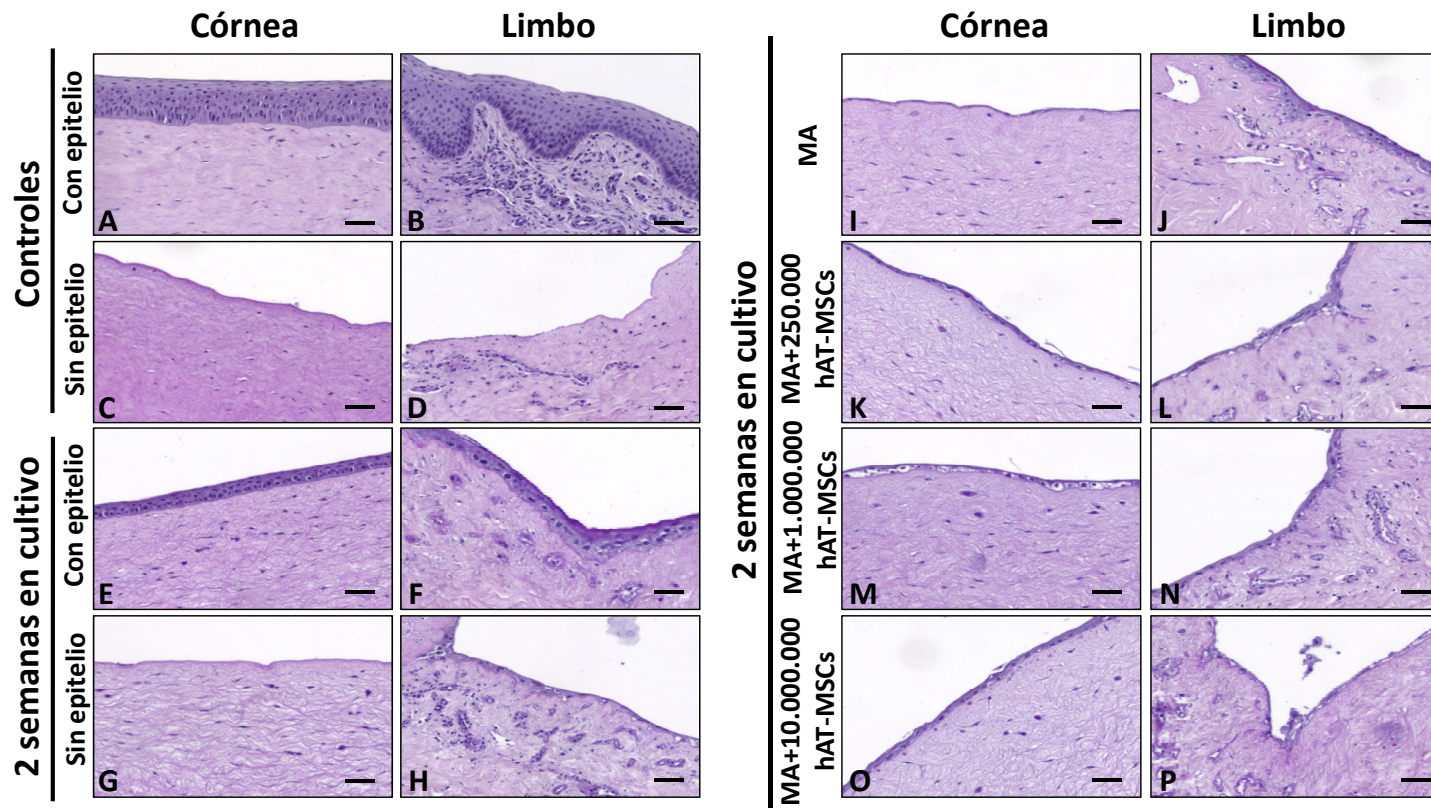


Figura 30. Histología de los botones corneoesclerales (tinción con PAS) tras levantar las MA de la superficie del modelo de daño corneal *ex vivo*. (A-B) Córnea y limbo de un ojo de cerdo control con epitelio. Presentan 6-7 capas de células epiteliales en la córnea y 8-9 en el limbo. Además, se observó una estructura en crestas y valles en el limbo. (C-D) Córnea y limbo de un ojo de cerdo sin epitelio (fijada tras desepitelización). No presentan epitelio. (E-F) Córnea y limbo de un botón corneoescleral con epitelio tras 2 semanas en cultivo. Presenta 3-4 capas de células epiteliales. (G-H) Córnea y limbo de un botón corneoescleral sin epitelio tras 2 semanas en cultivo, carentes de epitelio casi en su totalidad. (I-J) Botón corneoescleral desepitelizado y trasplantado con MA sin hAT-MSCs. (K-L) Botón corneoescleral desepitelizado y trasplantado con MA y 250.000 hAT-MSCs. (M-N) Botón corneoescleral desepitelizado y trasplantado con MA y 1.000.000 hAT-MSCs. (O-P) Botón corneoescleral desepitelizado y trasplantado con MA y 10.000.000 hAT-MSCs. Presencia de 1-2 capas de células epiteliales en la córnea y el limbo de los botones corneoesclerales trasplantados con MA sin hAT-MSCs o con las diferentes dosis de hAT-MSCs, sin diferencias entre ellos. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes. Escala de la barra: 100 μ m.

Localización de las hAT-MSCs

Una vez levantadas las MA de los botones corneoesclerales, estas fueron analizadas con el fin de conocer el destino de las hAT-MSCs trasplantadas. Bajo el microscopio óptico de contraste de fases, se observó la presencia de células adheridas sobre las MA levantadas de los botones corneoesclerales. Se observaron células incluso en aquellas MA que no tenían hAT-MSCs en el momento de la realización del trasplante (Figura 31). Mediante inmunofluorescencia frente a BrdU (las hAT-MSCs habían sido previamente marcadas con moléculas de BrdU que se intercalan en el ADN) y con yoduro de propidio (para teñir los núcleos celulares) se confirmó la presencia de células en todas las MA levantadas de los botones corneoesclerales. En el caso de las MA trasplantadas sin hAT-MSCs, se observó la presencia de células no marcadas con BrdU (solo teñidas con yoduro de propidio), es decir, de células provenientes del propio botón corneoescleral porcino. En el caso de las MA con diferentes dosis celulares, se confirmó la presencia de células hAT-MSCs (marcadas con BrdU) y células no hAT-MSCs (solo teñidas con yoduro de propidio), sin observar diferencias en cuanto a la proporción de células de un tipo u otro entre las MA trasplantadas con diferentes dosis celulares (Figura 31). Se observó que al levantar las MA se estaban quedando adheridas a ellas gran cantidad de células, tanto hAT-MSCs como células del propio botón corneoescleral. Por lo tanto, durante el proceso de levantamiento de las MA se podrían haber perdido capas de células epiteliales en los botones corneoesclerales, lo que pudo afectar a los resultados de defecto epitelial y de histología obtenidos.

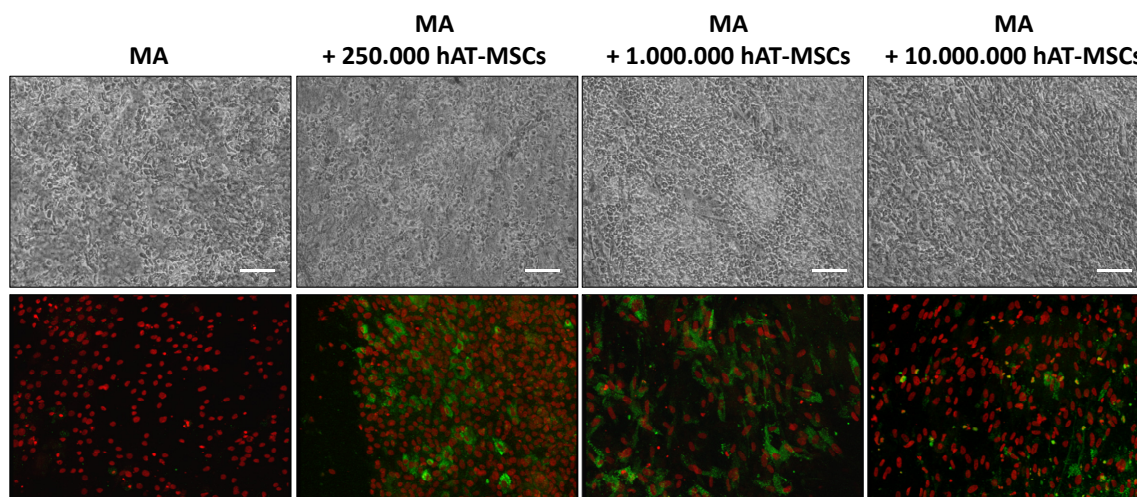


Figura 31. Localización de las hAT-MSCs en las MA tras ser levantadas de los botones corneoesclerales del modelo de daño corneal *ex vivo* en el cerdo. Fotografías representativas de microscopía óptica de contraste de fases y de fluorescencia de las MA levantadas de los botones corneoesclerales transcurridas 2 semanas desde el momento del trasplante. En todas las MA levantadas, incluso en las que se trasplantaron sin hAT-MSCs, se observaron células adheridas. Mediante inmunofluorescencia frente a BrdU (fluorescencia verde) y tinción con yoduro de propidio (núcleos, fluorescencia roja) se observó que las células presentes en las MA trasplantadas sin hAT-MSCs no estaban marcadas con BrdU. En las MA con diferentes dosis de hAT-MSCs se observaron células marcadas con BrdU (hAT-MSCs) y células no marcadas, sin observar diferencias en cuanto a la proporción de células de un tipo y otro entre las MA trasplantadas con diferentes dosis celulares. Resultados representativos procedentes de 3 experimentos independientes. Escala de la barra: 100 μ m.

Además, mediante inmunofluorescencia frente a BrdU, también se estudió la presencia y la localización de las hAT-MSCs en los tejidos de los botones corneoesclerales. Para ello, se utilizó un anticuerpo primario anti-BrdU diferente al utilizado para localizarlas en las MA. El cambio de anticuerpo se realizó para mejorar la técnica, ya que se habían observado problemas de autofluorescencia verde en los tejidos y, por ello, se comenzó a utilizar un anticuerpo anti-BrdU marcado con *DyLight650* (fluorescencia roja). En las muestras trasplantadas con las 3 dosis celulares se observaron muy pocas células marcadas con BrdU (hAT-MSCs), sin encontrar diferencias en cuanto a la cantidad de células marcadas entre las muestras trasplantadas con las distintas dosis celulares. Todas las células marcadas se localizaron en zonas estromales muy próximas al epitelio corneal (Figura 32).

RESULTADOS

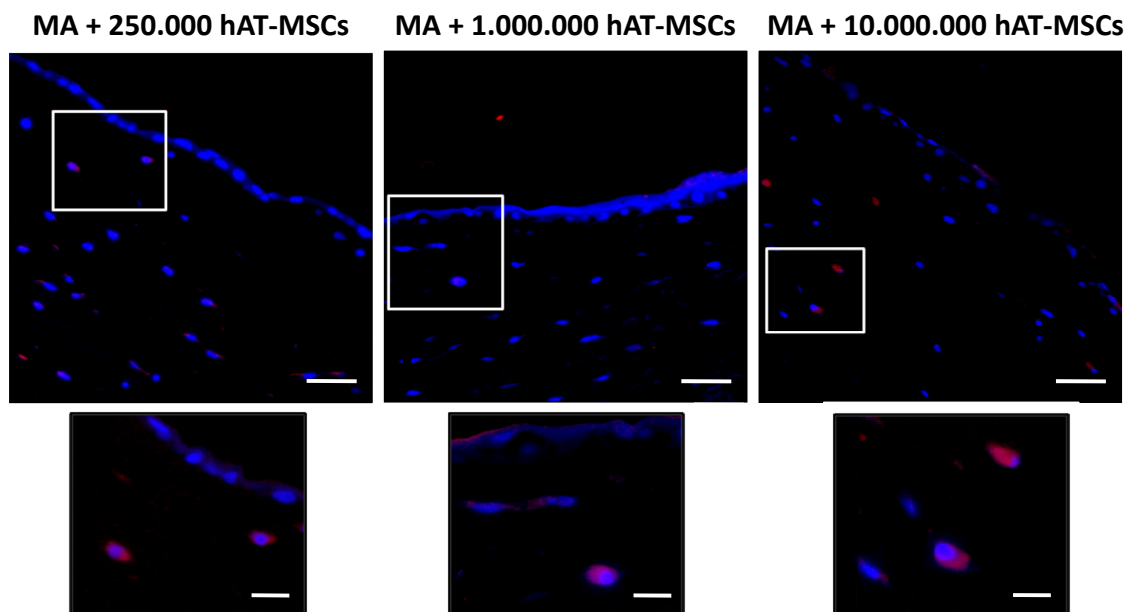


Figura 32. Localización de las hAT-MSCs (inmunofluorescencia frente a BrdU) en las muestras corneoesclerales trasplantadas con diferentes dosis de hAT-MSCs en el modelo de daño corneal *ex vivo*. Las hAT-MSCs se localizaron (BrdU: fluorescencia roja) en zonas estromales próximas al epitelio corneal. No se observaron diferencias en cuanto a la cantidad de células marcadas entre las muestras trasplantadas con diferentes dosis de hAT-MSCs. Núcleos celulares teñidos con el colorante Hoechst (fluorescencia azul). Resultados representativos procedentes de 3 experimentos independientes. Escala de la barra: 50 μm (imágenes de la parte superior) y 20 μm (imágenes de la parte inferior).

Dado que se observó adherencia de células a las MA durante el proceso de levantamiento de las MA y, en consecuencia, la pérdida de células en los botones corneoesclerales, se planteó realizar el estudio de igual manera pero sin levantar las MA de los botones corneoesclerales una vez transcurridas las 2 semanas de cultivo. Debido a que en los experimentos anteriores no se habían observado diferencias significativas entre las diferentes dosis celulares estudiadas, este estudio se llevó a cabo solamente trasplantando MA sin células y MA con 250.000 hAT-MSCs, basándonos en la dosis celular utilizada en el ensayo clínico que se estaba llevando a cabo con BM-MSCs en pacientes con SIL en el IOBA (EudraCT: 2010-203535-42; ClinicalTrials.gov: NCT01562002).

4.2. Estudios realizados sin levantar la MA

Efecto de las hAT-MSCs en el grado de defecto epitelial

Se estudió, mediante histología, el estado del epitelio corneal de las muestras corneoesclerales trasplantadas con MA (sin hAT-MSCs o con 250.000 hAT-MSCs) y fijadas sin levantar las MA transcurridas 2 semanas en cultivo. Se observó que, en las muestras con MA trasplantadas sin hAT-MSCs, aparecían 1-2 capas de células epiteliales tanto en la córnea como en el limbo. En las muestras trasplantadas con 250.000 hAT-MSCs se observaron también 1-2 capas de células epiteliales, tanto en la córnea como en el limbo (Figura 33). En general, en las muestras en las que no se levantó la MA, se mantuvo una mejor integridad de las capas de epitelio en comparación con las muestras en las que la MA se había levantado (Figura 30). Estos resultados confirmaron que el proceso de levantar las MA de los botones corneoesclerales tras 2 semanas en cultivo estaba dañando el epitelio de las muestras. Por otro lado, no se observaron diferencias en cuanto al número de capas de epitelio entre las muestras trasplantadas con MA y las trasplantadas con MA y hAT-MSCs.

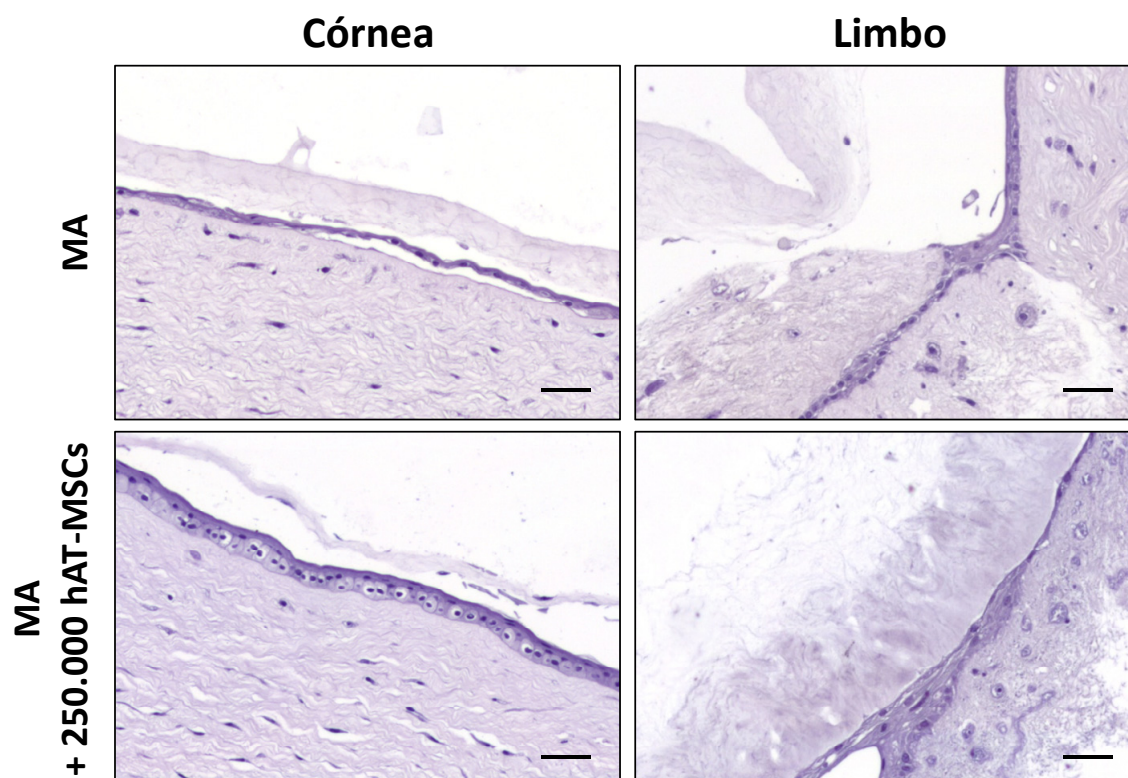


Figura 33. Histología de los botones corneoesclerales (tinción con PAS) sin levantar las MA de la superficie del modelo de daño corneal *ex vivo*. Se observó que, tras 2 semanas en cultivo y sin levantar la MA, en los botones trasplantados con MA y con MA y 250.000 hAT-MSCs aparecían 1-2 capas de células epiteliales, tanto en la córnea como en el limbo. Resultados representativos procedentes de 4 experimentos independientes. Escala de la barra: 50 μ m.

Localización de las hAT-MSCs

En las muestras trasplantadas con 250.000 hAT-MSCs y fijadas sin levantar las MA de su superficie, se estudió también la localización de las hAT-MSCs mediante inmunofluorescencia frente a BrdU. Se observó la presencia de hAT-MSCs en la superficie de los epitelios corneal y limbar. Este epitelio estaba formado por células hAT-MSCs (marcadas con BrdU) y por otras células no marcadas con BrdU (Figura 34). Estos resultados se corresponden con los obtenidos en las MA levantadas, donde se observaba presencia de células hAT-MSCs junto a células procedentes del propio tejido del botón corneoescleral porcino (Figura 31). En este caso no se observaron hAT-MSCs en el estroma cercano al epitelio como sí que sucedió en las muestras en las que se levantaron las MA, aunque en muy escaso número (Figura 32). De igual modo, cabría

esperar que una pequeña cantidad de hAT-MSCs también hubieran migrado hasta las zonas del estroma cercanas al epitelio en las muestras en las que no se levantaron las MA. Por consiguiente, las células podrían haber migrado en muy baja cantidad hasta el estroma pero no se habrían podido observar en los cortes histológicos debido a que éstos son una representación muy escasa del tejido completo.

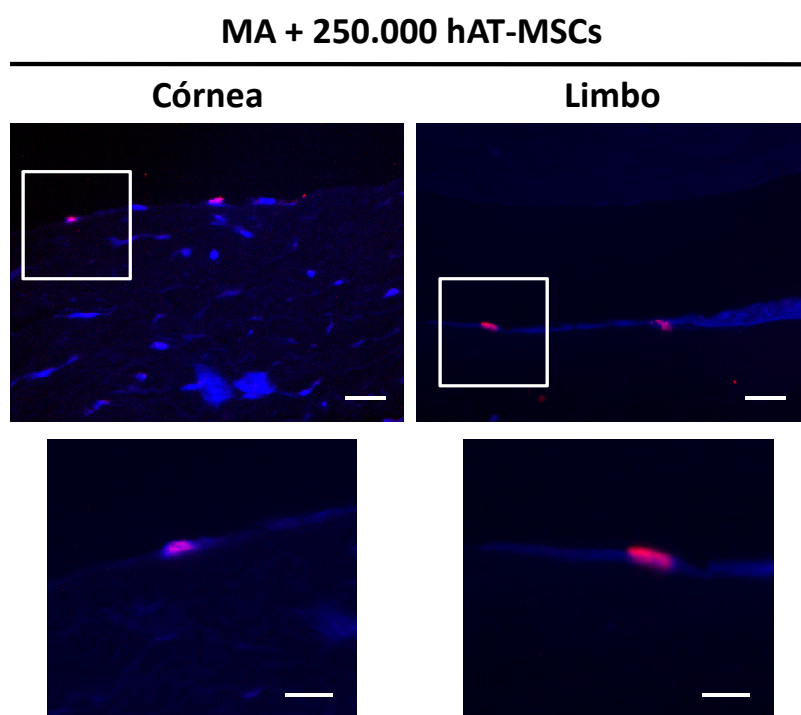


Figura 34. Localización de las hAT-MSCs en las muestras corneoesclerales del modelo de daño corneal *ex vivo* (inmunofluorescencia frente a BrdU) trasplantadas con MA y 250.000 hAT-MSCs en las que no se levantaron las MA. Las hAT-MSCs se localizaron (BrdU: fluorescencia roja) en los epitelios corneal y limbar. Se observó que el epitelio estaba formado en parte por hAT-MSCs y en parte por células de otro origen (no marcadas con BrdU). Núcleos celulares contrateñidos con el colorante Hoechst (fluorescencia azul). Resultados representativos de 4 experimentos independientes. Escala de la barra: 50 μm (imágenes de la parte superior) y 20 μm (imágenes de la parte inferior).

Con los resultados obtenidos, se pudo comprobar que el modelo *ex vivo* utilizado no era un modelo útil para el estudio de la dosis celular y, por lo tanto, no se pudo establecer qué dosis era la más adecuada para su trasplante a la superficie ocular. Dada la falta de evidencias y basándonos en la dosis celular utilizada en el ensayo clínico que se estaba llevando a cabo con BM-MSCs en pacientes con SIL en el IOBA, se decidió que la dosis de 250.000 hAT-MSCs sería la que se utilizaría para realizar los trasplantes de

RESULTADOS

hAT-MSCs a la superficie ocular en los modelos experimentales de SIL desarrollados en animales.

5. Modelo de SIL total en cerdo

Se decidió desarrollar un modelo de SIL total en cerdo mediante daño criogénico de los 360° del limbo. El animal de elección fue el cerdo debido a la similitud de su ojo con el humano en cuanto a estructuras y a tamaño, permitiendo así la realización adecuada de los procedimientos quirúrgicos y la obtención de resultados potencialmente extrapolables al humano.

5.1. Evolución clínica del modelo

El modelo de SIL total se desarrolló en 4 cerdos mediante daño criogénico del limbo. Transcurrida 1 semana desde el momento de la realización de la lesión, se observó la presencia de vasos sanguíneos en la córnea y opacidad de la misma. El defecto epitelial creado se cerró parcialmente durante la primera semana de evolución, permaneciendo el centro corneal con defecto epitelial. En las semanas posteriores de evolución, se observó cómo continuaron penetrando los neovasos hacia el centro corneal y cómo la córnea se mantuvo opacificada. Los defectos epiteliales, aunque se recuperaron en gran medida durante las primeras semanas de evolución, se mantuvieron durante todo el periodo de seguimiento. Al final del seguimiento (12 semanas) se vio la presencia de neovascularización, opacidad y defectos epiteliales en la córnea, signos característicos del SIL (Figura 35). Además, mediante las citologías de impresión corneal recogidas durante el seguimiento se puso de manifiesto la presencia de células caliciformes en el centro corneal, signo claro del proceso de conjuntivalización producido durante el desarrollo de la enfermedad. Aunque en las citologías de impresión corneal recogidas durante las primeras revisiones se observaron gran cantidad de células caliciformes, a lo largo del tiempo de seguimiento la presencia de las mismas fue disminuyendo (Figura 35).

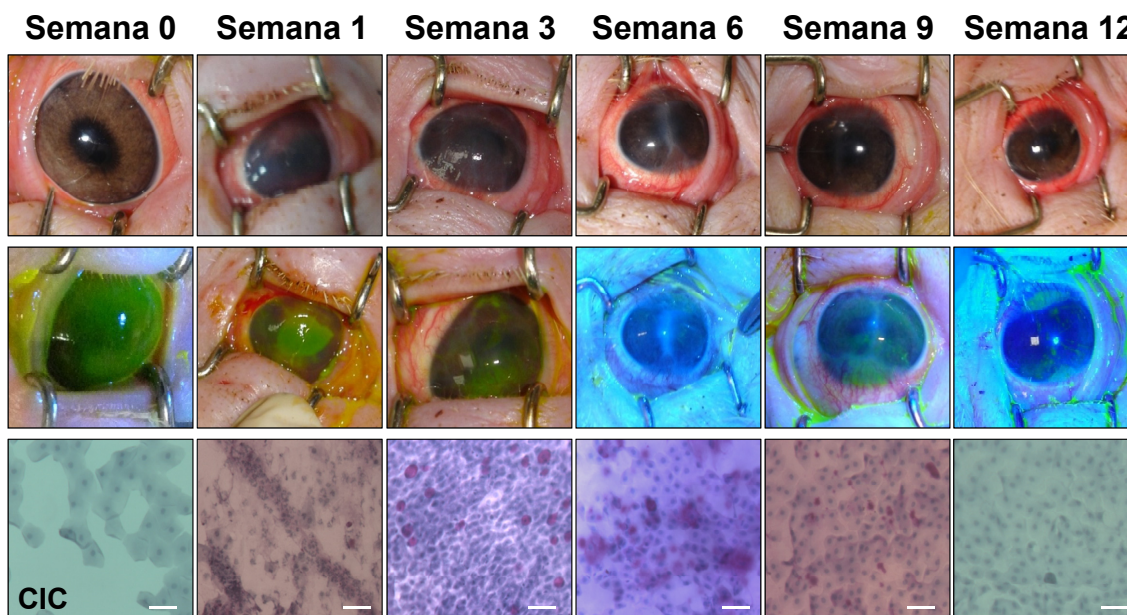


Figura 35. Evolución de los signos clínicos durante el desarrollo del modelo porcino de SIL. Fotografías tomadas a lo largo del seguimiento donde se observa el desarrollo de los signos clínicos neovascularización, opacidad y defecto epitelial (tinción con fluoresceína sódica en verde). Citologías de impresión corneal (CIC) recogidas durante el seguimiento y teñidas con PAS donde se observa la presencia de células caliciformes (en púrpura), signo que indica la conjuntivalización de la córnea. El tiempo 0 corresponde al momento inmediatamente posterior a la realización de la lesión. Imágenes representativas procedentes de 4 animales. Escala de la barra: 100 μ m.

5.2. Trasplante de MA

Transcurridas 3 semanas desde el momento de la realización de la lesión, se realizó el trasplante de MA sobre la superficie ocular de 4 cerdos. Durante las semanas previas al trasplante se desarrollaron los signos clínicos ya descritos que caracterizan el SIL. Tras el trasplante de MA se observó una gran reacción inflamatoria en toda la superficie ocular. La neovascularización y opacidad corneal, así como los defectos epiteliales empeoraron de manera significativa tras el trasplante de MA. Esta reacción tan agresiva podría haberse producido debido al traumatismo creado durante la cirugía del trasplante. La esclera de estos animales ofrecía mucha resistencia al paso de la aguja durante la sutura realizada para asegurar el trasplante a la superficie ocular y este procedimiento podría haber sido el responsable de la intensa reacción inflamatoria observada en la superficie ocular. En las citologías de impresión corneal también se

RESULTADOS

observó la presencia de mayor proporción de células caliciformes (Figura 36) que en los animales con SIL no trasplantados (Figura 36).

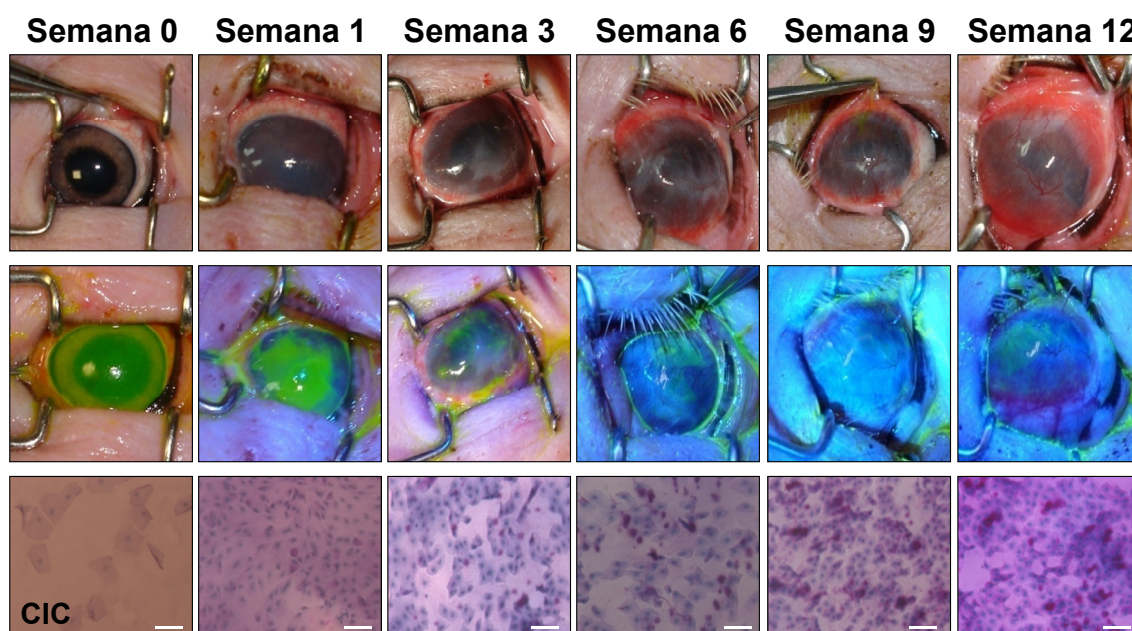


Figura 36. Evolución de los signos clínicos en el modelo porcino de SIL trasplantado con MA. Fotografías tomadas a lo largo del seguimiento donde se observan los signos clínicos neovascularización, opacidad y defecto epitelial (tinción con fluoresceína en verde). Se observó una gran reacción y empeoramiento de los signos clínicos tras la realización del trasplante de MA (en la semana 4). Citologías de impresión corneal (CIC) recogidas durante el seguimiento y teñidas con PAS donde se observa la presencia de células caliciformes (en púrpura), signo que indica la conjuntivalización de la córnea. El tiempo 0 corresponde al momento inmediatamente posterior a la realización de la lesión. El tiempo 3 corresponde al momento previo a la realización del trasplante de MA. Imágenes representativas procedentes de 4 animales. Escala de la barra: 100 μ m.

5.2. Estudio de la superficie ocular mediante microscopía laser confocal *in vivo*

Mediante microscopía láser confocal, se analizó el estado de la superficie ocular en los globos oculares extraídos tras la eutanasia de los animales en la semana 12 de seguimiento. Se analizó la estructura del epitelio a varios niveles de profundidad en limbo superior, córnea central y limbo inferior. Se analizaron como control los ojos contralaterales sanos. En los ojos sanos, se observó un fenotipo epitelial corneal normal, con células aplanadas y algo brillantes en las capas más superficiales de la córnea y con células con un citoplasma oscuro de bordes brillantes en las capas más basales del epitelio corneal. En las zonas limbares, se observó la transición entre la

córnea, con células con citoplasmas oscuros, y la conjuntiva, con células hiperreflectivas. Además, en el limbo se observó la presencia de estructuras en crestas y valles (epitelio-estroma) similares a las empalizadas de Vogt, descritas en el limbo humano. En el estroma de estos ojos controles sanos se observó la presencia de fibras (más brillantes) y de queratocitos. En cambio, en los tejidos a los que se les indujo el SIL, se vio la pérdida del fenotipo de las células corneales, apareciendo células más hiperreflectivas similares a las células epiteliales de la conjuntiva. En las zonas limbares, no se observaron las estructuras de valles y crestas observadas en los ojos sanos. Además, en el estroma de estas muestras, aparecieron fibras más desorganizadas y se advirtió la presencia de células inflamatorias (células brillantes en el estroma) y vasos sanguíneos. En los tejidos procedentes de los animales trasplantados con MA, se puso de manifiesto la pérdida total del fenotipo de las células epiteliales y de las estructuras en crestas y valles del limbo. Además, esto se vio acompañado por una importante reacción inflamatoria (aparición de gran cantidad de células brillantes en las zonas de epitelio y estroma de la córnea y el limbo) (Figura 37).

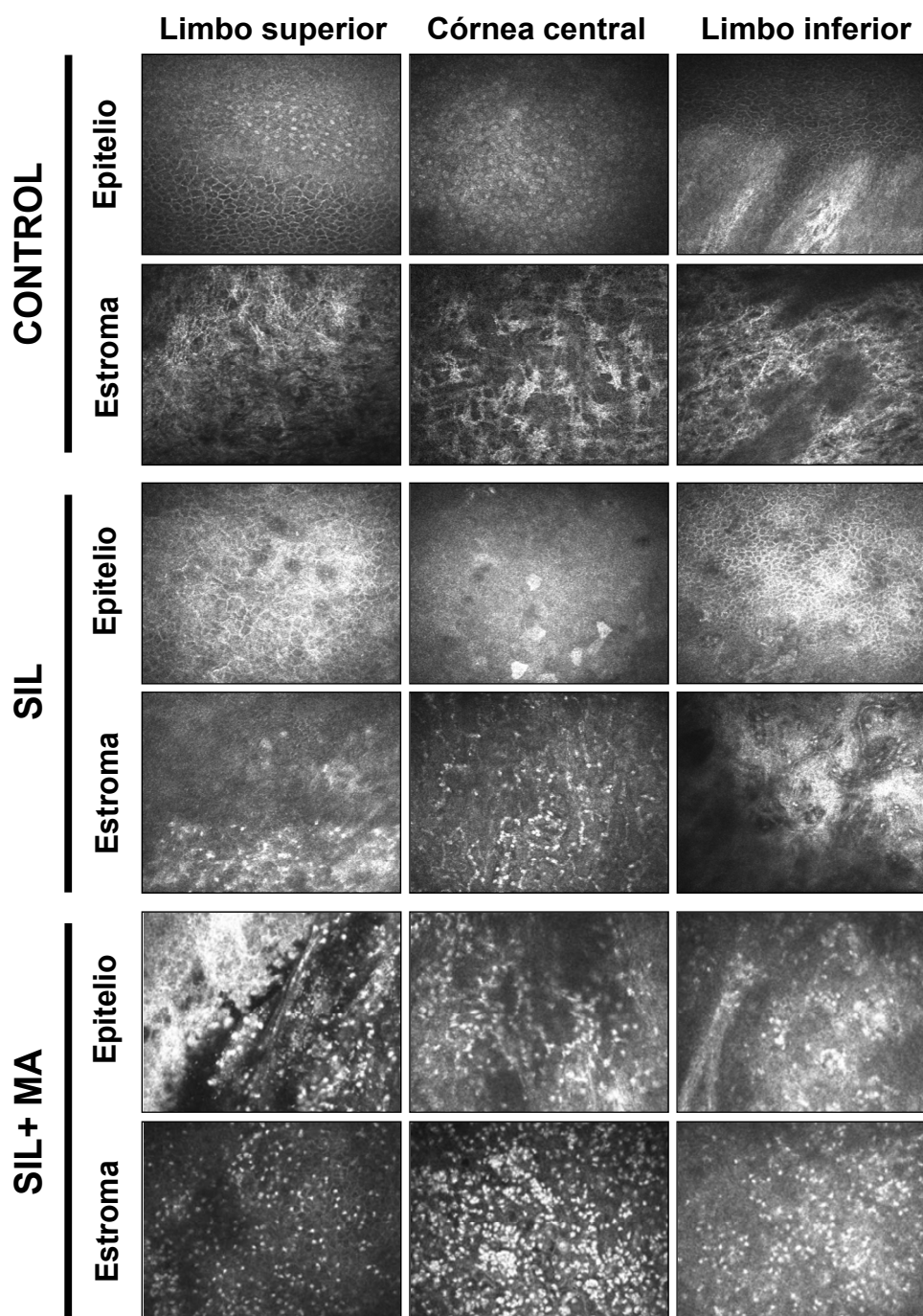


Figura 37. Estado de la superficie ocular en el modelo porcino de SIL analizado mediante microscopía láser confocal. En los controles sanos, se observaron las células epiteliales corneales con citoplasma oscuro y bordes brillantes, además de estructuras similares a las empalizadas de Vogt en las zonas limbares. En los tejidos procedentes de animales con SIL, se observó la pérdida del fenotipo corneal, la adquisición de un fenotipo más conjuntival (células hiperreflectivas), la pérdida de la estructura del limbo y la presencia de células inflamatorias en estroma (células brillantes). En los tejidos procedentes de animales con SIL trasplantados con MA, se observó la presencia importante de células inflamatorias (células brillantes) y la pérdida total del fenotipo epitelial corneal y de las estructuras en crestas y valles del limbo. Imágenes representativas procedentes de 4 animales para cada grupo de estudio.

5.4. Estudio histopatológico

Mediante el análisis histopatológico de las muestras, se estudió el estado de la superficie ocular al final del periodo de seguimiento (12 semanas). En los tejidos sanos, se observó la presencia de 6-7 capas de células epiteliales en la córnea y 8-9 capas de epitelio en el limbo. En los tejidos de los animales con SIL inducido, se mantuvo más o menos estable el número de capas de epitelio y se advirtió la presencia de células caliciformes (teñidas en púrpura) en el epitelio de la córnea y del limbo. Además, se vio la presencia de vasos sanguíneos en el estroma corneal y limbar. En los tejidos de los cerdos trasplantados con MA, se observó mayor presencia de células caliciformes en el epitelio corneal y limbar, así como mayor número de vasos sanguíneos y gran cantidad de células inflamatorias en el estroma corneal (Figura 38).

En el modelo porcino de SIL, se reparó en que el procedimiento quirúrgico de suturar las MA a la esclera podría ser el causante de la importante reacción inflamatoria observada, como se vio reflejado en los signos clínicos y en el estudio histológico realizado en los tejidos analizados al final del periodo de seguimiento. Por esta razón, se consideró que este modelo experimental no era el adecuado para la realización de trasplantes mediante sutura en la superficie ocular, aunque sí que podría ser un buen modelo si se utilizaran otros sistemas de trasplante como podrían ser aquellos que utilizan pegamentos tisulares u otros sistemas o vías de administración.

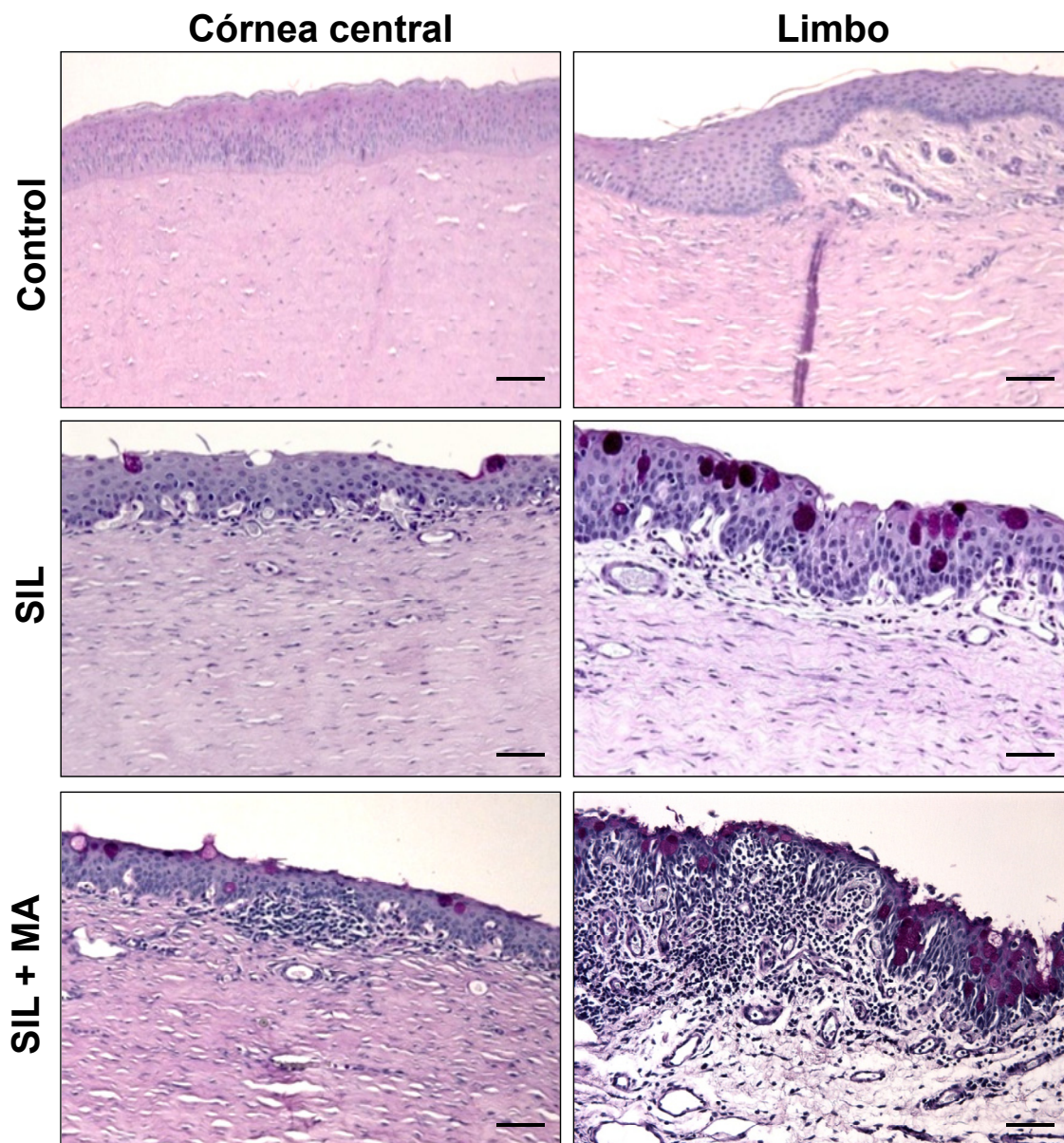


Figura 38. Estado de la superficie ocular en el modelo porcino de SIL en cortes histológicos teñidos con PAS mediante análisis histopatológico. Se observó la presencia de 6-7 capas de células epiteliales en la córnea y 8-9 en el limbo de los controles sanos. En los tejidos de los animales con SIL, el número de capas de epitelio se mantuvo más o menos estable y se vio la presencia de células caliciformes (teñidas en púrpura) en el epitelio de la córnea y el limbo. En los tejidos procedentes de animales con SIL y trasplante de MA, se observó mayor número de células caliciformes en el epitelio y de vasos sanguíneos en el estroma de la córnea y del limbo, así como acúmulo de células inflamatorias en el estroma corneal y limbar. Imágenes representativas procedentes de 4 animales de cada grupo de estudio. Escala de la barra: 50 μ m.

6. Modelo de SIL parcial en conejo

Se decidió desarrollar un modelo de SIL parcial en conejo en el que poder estudiar la tolerancia y la eficacia preliminar del trasplante de hAT-MSCs sobre la superficie ocular. El conejo fue el animal de elección ya que posee una córnea con características similares a las de la córnea humana y con un tamaño adecuado para la realización de los procesos quirúrgicos. Además, presenta algunas ventajas frente al cerdo como son la facilidad de manejo y estabulación y el bajo coste de mantenimiento.

6.1. Evolución clínica del modelo

Se desarrolló de forma exitosa el modelo de SIL parcial en 6 conejos. Transcurrida 1 semana desde la realización de la lesión, se vio la aparición de los signos clínicos que caracterizan la enfermedad y dichos signos se mantuvieron hasta el final del seguimiento (11 semanas desde la realización de la lesión). Se observó la formación de neovasos que penetraban hacia el centro corneal con una severidad de en torno a 2 puntos, es decir, neovasos cubriendo entre $\frac{1}{4}$ y $\frac{1}{2}$ del área corneal total. Estos neovasos afectaban especialmente al área del limbo superior (el limbo superior y temporal fueron las zonas lesionadas mediante limbectomía quirúrgica en este modelo de SIL parcial). La córnea de los conejos lesionados se comenzó a opacificar transcurrida 1 semana desde la realización de la lesión, alcanzando posteriormente un grado de opacificación cercano a 2 puntos, correspondientes a una opacidad corneal moderada. En el caso del defecto epitelial, se produjo una recuperación significativa del epitelio corneal transcurridas 2 semanas desde el momento de la lesión. A lo largo del seguimiento, el defecto epitelial se mantuvo con un grado de severidad aproximado de 1 punto, correspondiente a un defecto epitelial con un área menor de $\frac{1}{4}$ del área corneal total. De igual modo, el área de defecto epitelial cuantificado mediante planimetría mostró una disminución significativa durante la primera semana desde el momento de la realización de la lesión y, posteriormente, se mantuvo con un área menor de $0,25 \text{ cm}^2$ a lo largo de todo el seguimiento. En los signos clínicos estudiados, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las valoraciones correspondientes al tiempo 0, denominando tiempo 0 al momento inmediatamente

RESULTADOS

posterior a la realización del daño, y las valoraciones obtenidas a todos los tiempos analizados durante el seguimiento, excepto a tiempo 1 para el defecto epitelial, lo que demostró el desarrollo exitoso del modelo de SIL. A tiempo final del seguimiento (11 semanas), los signos clínicos continuaban presentes en la superficie ocular con una intensidad cercana a 2 puntos en el caso de la neovascularización y la opacidad corneal y cercana a 1 o con un área menor de 0,25 cm² en el caso del defecto epitelial, lo que puso de manifiesto que el modelo no revertía por sí solo (Figura 39).

Durante el desarrollo de este modelo, se observó que a partir de la tercera semana desde la realización de la lesión, todos los signos clínicos estudiados se mantuvieron más o menos estables. Por ello, y basado en modelos de SIL desarrollados en conejos por otros grupos de investigación,¹⁷³ se decidió realizar el trasplante correspondiente transcurridas 3 semanas desde el momento de la lesión. Además, el grupo de animales utilizado para el desarrollo del modelo de SIL se utilizó como grupo control de SIL parcial sin tratamiento en el estudio de la tolerancia y eficacia del trasplante de MA con hAT-MSCs.

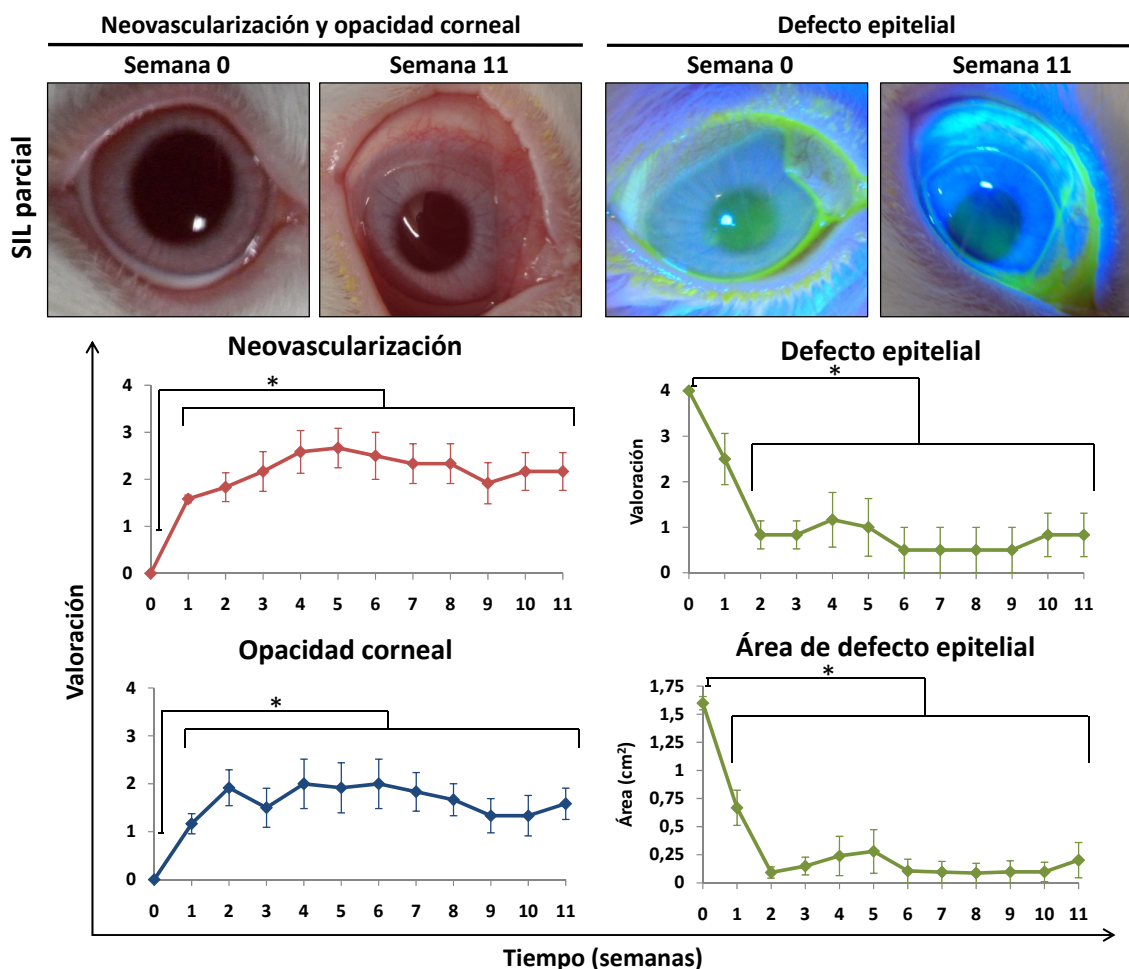


Figura 39. Evolución de los signos clínicos en el modelo de SIL parcial en conejo. Transcurrida 1 semana desde el momento de la realización de la lesión, se desarrollaron dos de los signos clínicos que caracterizan la enfermedad: neovascularización y opacidad corneal. Estos signos clínicos se mantuvieron con un grado de intensidad próximo a 2 puntos durante todo el periodo de seguimiento con diferencias significativas con respecto al tiempo 0. El otro signo característico, defecto epitelial (teñido en verde con fluoresceína), disminuyó significativamente durante las primeras semanas, pero se mantuvo con un grado cercano a 1 punto (área menor de 0,25 cm²) durante todo el periodo de seguimiento. El tiempo 0 corresponde al momento inmediatamente posterior a la realización de la lesión. Imágenes representativas procedentes de 6 animales. Datos obtenidos de la media aritmética de 6 animales ± SEM. Test estadísticos: Kruskal-Wallis, U de Mann-Whitney y ANOVA de 1 factor. *p ≤ 0,05.

6.2. Trasplante de MA

Previamente al estudio de tolerancia y eficacia del trasplante de MA con hAT-MSCs en el modelo de SIL parcial, se realizó el trasplante de MA sin células en 3 conejos a los que se les había inducido el SIL parcial 3 semanas antes. Este trasplante se realizó para comprobar que el proceso quirúrgico no producía una importante reacción inflamatoria

RESULTADOS

en la superficie ocular como había ocurrido en el modelo porcino de SIL. En este grupo de animales, al igual que ocurrió en el grupo de SIL sin tratamiento, la formación de neovasos se observó desde la semana siguiente a la realización de la lesión. En cambio, en este grupo de 3 animales trasplantados con MA, la neovascularización desarrollada fue menor, de aproximadamente 1 punto en la escala de valoración, es decir, neovasos cubriendo menos de $\frac{1}{4}$ del área corneal total. En cuanto a la opacidad corneal, su desarrollo fue más lento en comparación con el grupo de SIL control, aunque sin diferencias estadísticamente significativas, alcanzando una valoración de aproximadamente 1 punto a lo largo de todo el periodo de seguimiento, correspondiente a una opacidad corneal leve. El epitelio corneal se recuperó parcialmente durante las 2 primeras semanas tras la lesión, llegando a una valoración de aproximadamente 1 punto, lo que corresponde a un defecto epitelial con un área menor que $\frac{1}{4}$ del área corneal total. En el caso del área de defecto epitelial cuantificado por planimetría, se corroboró que este disminuyó durante las 2 primeras semanas hasta mantenerse con un área menor de $0,25 \text{ cm}^2$ a lo largo del resto del periodo de seguimiento. Aunque la neovascularización y la opacidad corneales se desarrollaron de forma más leve en este grupo de animales que en el de SIL sin tratamiento, no se encontraron diferencias significativas entre ambos. En el momento previo a la realización del trasplante de MA sin células (semana 3), el grado de severidad fue de aproximadamente 1 punto para los 3 signos clínicos estudiados. Estos signos no empeoraron ni mejoraron tras el trasplante de la MA sobre la superficie ocular, manteniéndose constantes a lo largo de todo el seguimiento sin diferencias estadísticamente significativas (Figura 40). Los animales no reaccionaron de forma negativa frente al proceso quirúrgico de sutura de la MA a la esclera, lo que demostró que este modelo era adecuado para la realización del trasplante mediante sutura.

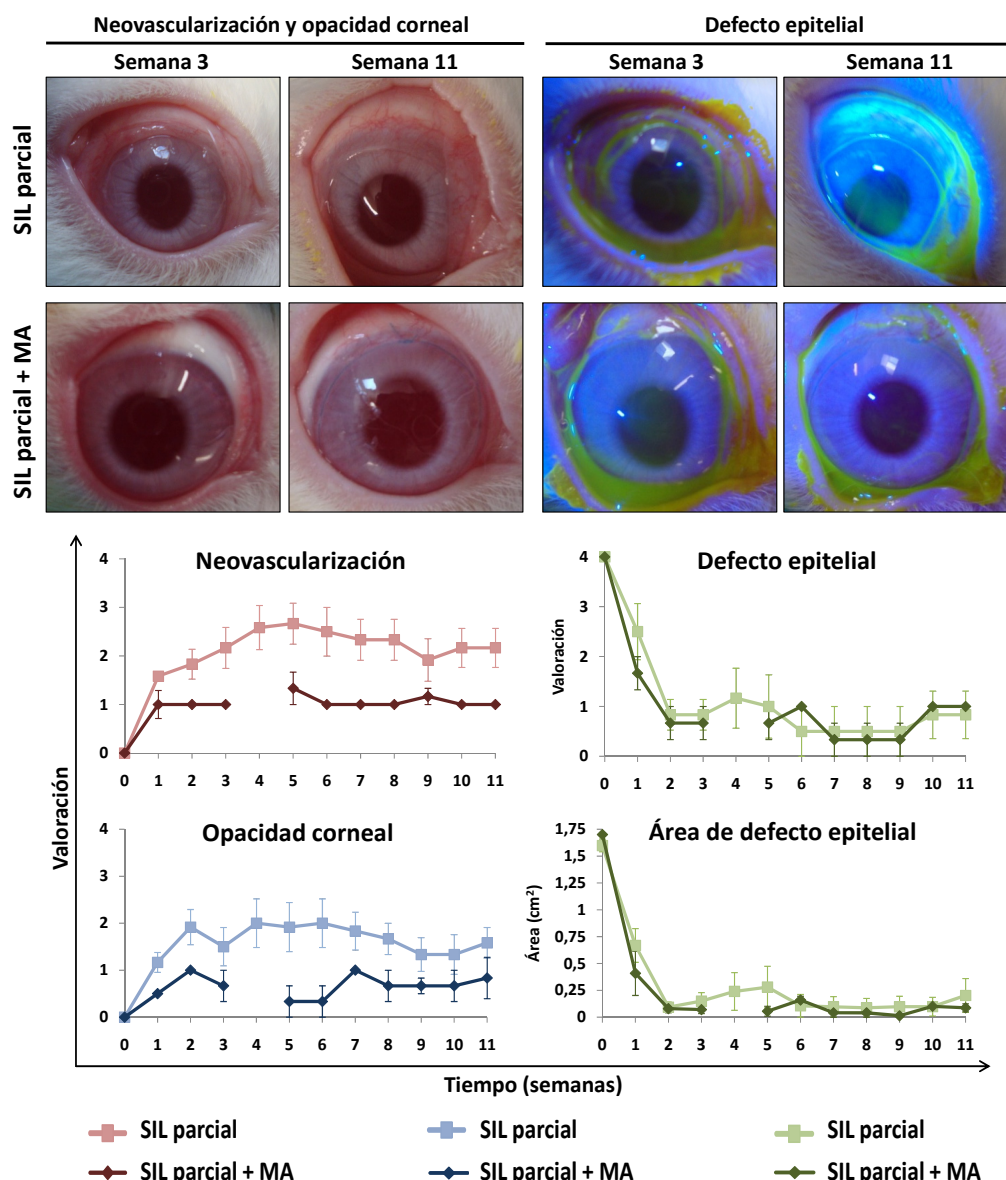


Figura 40. Evolución de los signos clínicos en el modelo de SIL parcial en conejo trasplantado con MA. Durante las primeras semanas tras la realización de la lesión, se desarrollaron dos de los signos clínicos que caracterizan la enfermedad, neovascularización y opacidad corneal, de forma más leve que en el grupo de animales con SIL sin tratamiento. Estos signos clínicos se mantuvieron con un grado de severidad aproximado de 1 punto durante todo el periodo de seguimiento. El otro signo característico, defecto epitelial (teñido en verde con fluoresceína) disminuyó significativamente durante las primeras semanas hasta mantenerse con un grado de severidad de 1 punto o un área menor de 0,25 cm² a partir de la segunda semana de seguimiento. Ninguno de los signos clínicos empeoró ni mejoró tras el trasplante de la MA, manteniéndose constantes a lo largo de todo el seguimiento sin encontrar diferencias significativas. No se observaron diferencias significativas con respecto al grupo de animales con SIL sin tratamiento. El tiempo 0 corresponde al momento inmediatamente posterior a la realización de la lesión. El tiempo 3 corresponde al momento previo a la realización del trasplante de MA. Imágenes representativas procedentes de 6 animales. Datos obtenidos de la media aritmética de 6 animales ± SEM. Test estadísticos: Friedman, Wilcoxon, Kruskal-Wallis, U de Mann-Whitney, t-Student y ANOVA de 1 factor.

6.3. Trasplante de hAT-MSCs

Se estudió la tolerancia y la eficacia preliminar del trasplante de 250.000 hAT-MSCs en MA sobre la superficie ocular de 6 conejos con un SIL parcial inducido 3 semanas antes de la realización del trasplante. En este grupo de animales, al igual que en los grupos descritos anteriormente, se comenzaron a desarrollar los signos neovascularización y opacidad corneal transcurrida 1 semana desde el momento de la inducción del modelo y el epitelio corneal se regeneró parcialmente durante las 2 primeras semanas tras la realización de la lesión. Transcurridas 3 semanas desde la creación del daño, momento previo al trasplante, se observó un grado de severidad de aproximadamente 2 puntos para los signos clínicos neovascularización y opacidad corneal y de 1 punto o un área de 0,16 cm² para el defecto epitelial. Aunque tras el trasplante de las hAT-MSCs no se observó una mejora significativa de ninguno de los signos clínicos evaluados con respecto al momento previo a la realización del trasplante, tampoco se observó un empeoramiento de los signos clínicos, ni la aparición de ninguna reacción adversa tras el trasplante de hAT-MSCs sobre la superficie ocular del modelo de SIL parcial (Figura 41). Estos resultados demostraron que las hAT-MSCs fueron bien toleradas tras su trasplante a la superficie ocular.

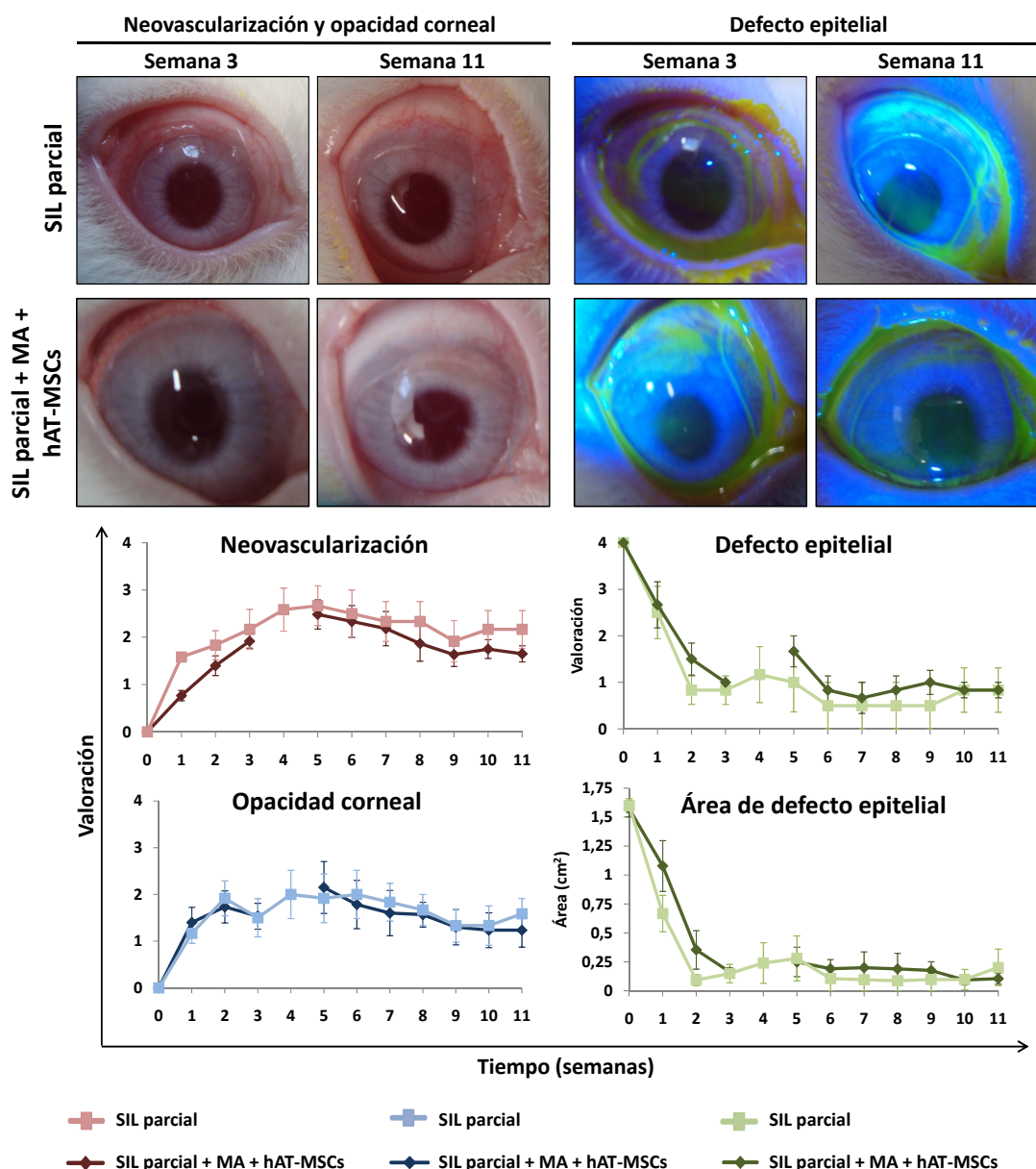


Figura 41. Evolución de los signos clínicos en el modelo de SIL parcial en conejo trasplantado con MA y hAT-MSCs. Durante las primeras semanas tras la realización de la lesión, se desarrollaron dos de los signos clínicos que caracterizan la enfermedad, neovascularización y opacidad corneal, al igual que en el grupo de animales con SIL sin tratamiento. El defecto epitelial (teñido en verde con fluoresceína) disminuyó parcialmente durante las primeras semanas, de forma similar que en el grupo con SIL sin tratamiento. Los signos clínicos se mantuvieron durante todo el periodo de seguimiento con un grado cercano a 2 puntos en el caso de la neovascularización y la opacidad corneal, y de 1 punto o con un área menor de 0,25 cm² en el caso del defecto epitelial. No se observó empeoramiento de los signos clínicos ni la aparición de ninguna reacción adversa tras el trasplante de hAT-MSCs sobre la superficie ocular del modelo de SIL parcial. El tiempo 0 corresponde al momento inmediatamente posterior a la realización de la lesión. El tiempo 3 corresponde al momento previo a la realización del trasplante de MA con 250.000 hAT-MSCs. Imágenes representativas procedentes de 6 animales. Datos obtenidos de la media aritmética de 6 animales \pm SEM. Test estadísticos: Friedman, Wilcoxon, Kruskal-Wallis, U de Mann-Whitney, t-Student y ANOVA de 1 factor.

6.4. Estudio histopatológico

Mediante el análisis histopatológico (tinción con PAS) se estudió el estado de los tejidos corneales y limbares (áreas superior e inferior) de los animales al final del periodo de seguimiento (semana 11). Como control se utilizaron las muestras obtenidas del ojo contralateral sano. En los controles sanos, se observaron 4-5 capas de células epiteliales en la córnea central y 6-7 capas de epitelio en el limbo. Además, se constató la presencia de vasos sanguíneos a nivel de estroma limbar. En el caso del grupo de animales con SIL sin tratamiento, se observó que el número de capas epiteliales, tanto en la córnea como en el limbo, fue similar al encontrado en el grupo control (4-5 capas de células epiteliales en la córnea y 6-7 en el limbo). En cambio, en este grupo de animales con SIL, se observó la presencia de alguna célula caliciforme (células teñidas en púrpura), tanto en el epitelio del limbo superior (dañado) como en el epitelio del limbo inferior (no dañado), lo que indicaba cierta invasión del tejido conjuntival en la córnea. A nivel de estroma se observaron acúmulos de células inflamatorias (pequeñas células con núcleo morado en las zonas estromales limbares cercanas al epitelio) en el limbo superior e inferior, siendo algo menor esta inflamación en el limbo inferior (no dañado). Por el contrario, en la córnea central, no se encontraron células caliciformes en el epitelio, ni células inflamatorias o vasos sanguíneos en el estroma. Estos datos confirmaron que se trataba de un modelo de SIL leve con una córnea central sana. En los grupos de animales con trasplante de MA o de MA y hAT-MSCs, se encontraron algunas células caliciformes en el epitelio limbar y células inflamatorias en el estroma limbar (superior e inferior). Al igual que en el grupo de animales con SIL sin tratamiento, en los tejidos de los animales tratados con MA o con MA y hAT-MSCs no se observaron células caliciformes en el epitelio de la córnea central, ni células inflamatorias o vasos en el estroma corneal. No se encontraron diferencias significativas en los hallazgos histológicos de los tejidos procedentes de los 3 grupos de estudio. En ningún caso se observó ninguna reacción adversa en los tejidos trasplantados con hAT-MSCs, lo que confirmó que estas células fueron bien toleradas tras su trasplante a la superficie ocular (Figura 42).

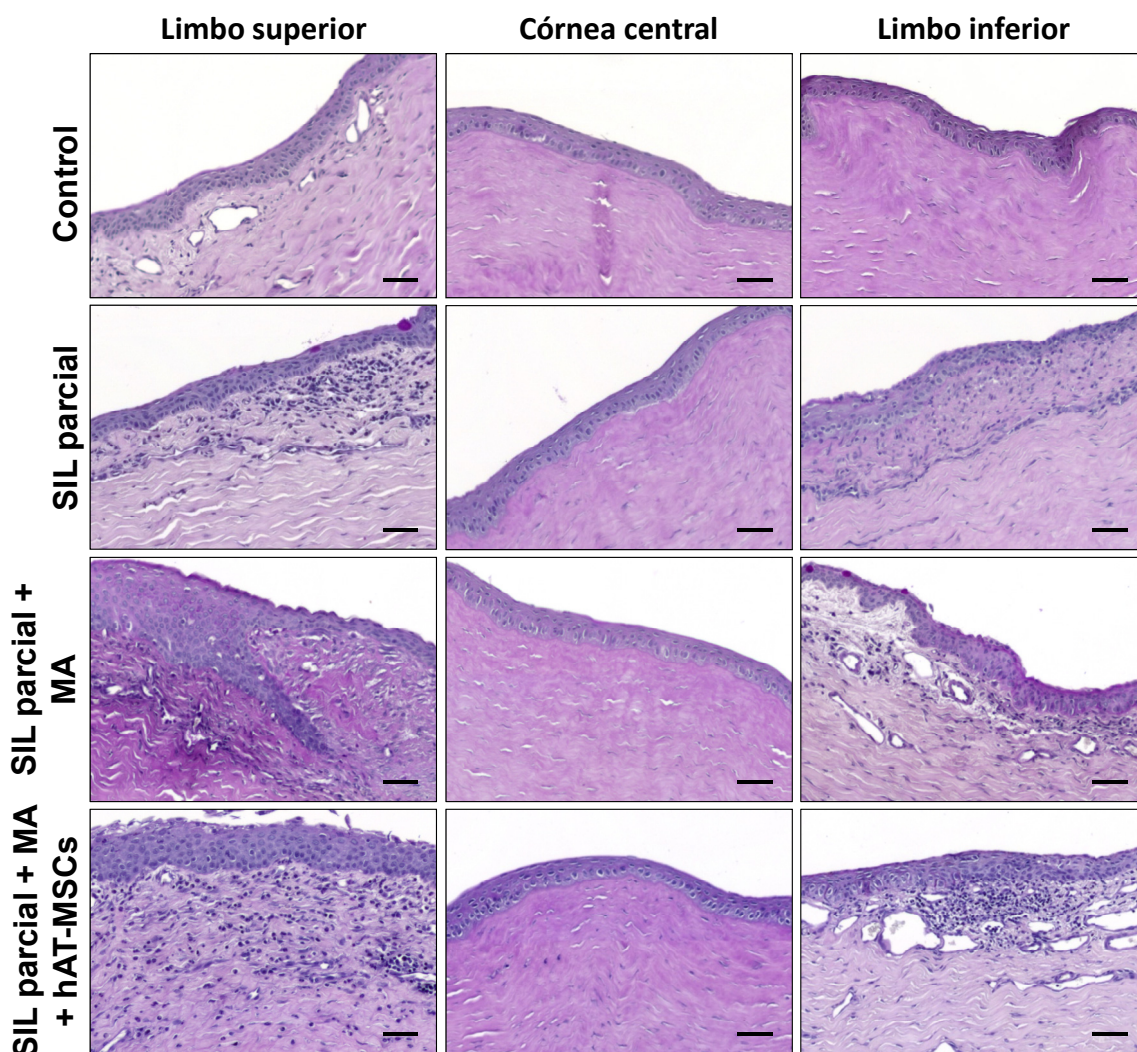


Figura 42. Histología (tinción con PAS) de los tejidos corneales y limbares del modelo de SIL parcial en conejo. En los tejidos procedentes del grupo control (animales sanos), se observaron 4-5 capas de células epiteliales en la córnea y 6-7 en el limbo, así como la presencia de vasos sanguíneos en el estroma limbar. En los tejidos procedentes de los 3 grupos de estudio (grupo con SIL sin tratamiento, grupo con SIL y MA y grupo con SIL, MA y hAT-MSCs), se encontró alguna célula caliciforme (teñida en púrpura) en el epitelio del limbo, así como células inflamatorias en el estroma limbar (acúmulo de células con el núcleo teñido en morado en el estroma limbar, en zonas cercanas al epitelio). La córnea permaneció sana en todos los grupos estudiados, demostrando que se trataba de un modelo de SIL leve. No se encontraron diferencias significativas en los hallazgos histológicos entre los 3 grupos de estudio. Imágenes representativas procedentes de 6 animales para cada grupo de estudio, excepto para el grupo de SIL con MA que estuvo formado por 3 animales. Escala de la barra: 50 μ m.

6.5. Localización de las hAT-MSCs

Las hAT-MSCs marcadas con BrdU antes de ser trasplantadas, fueron localizadas, mediante inmunofluorescencia frente a BrdU, en los tejidos de la superficie ocular de los

RESULTADOS

conejos trasplantados. Transcurridas 8 semanas desde la realización del trasplante de 250.000 hAT-MSCs en MA sobre la superficie ocular de 6 conejos con SIL parcial, las hAT-MSCs fueron observadas en el estroma del limbo. Estas células fueron identificadas tanto en el estroma del limbo superior (área dañada), como en el estroma del limbo inferior (área no dañada). Estas zonas de localización de las hAT-MSCs coincidían con las áreas con mayor acúmulo de células inflamatorias observadas en el estudio histopatológico. No se observó la presencia de hAT-MSCs en córnea central. Con estos resultados, se comprobó que tras el trasplante de hAT-MSCs sobre la superficie ocular de un modelo de SIL parcial, estas células fueron capaces de migrar hasta las zonas de inflamación (estroma limbar) y de permanecer allí al menos durante 8 semanas (Figura 43).

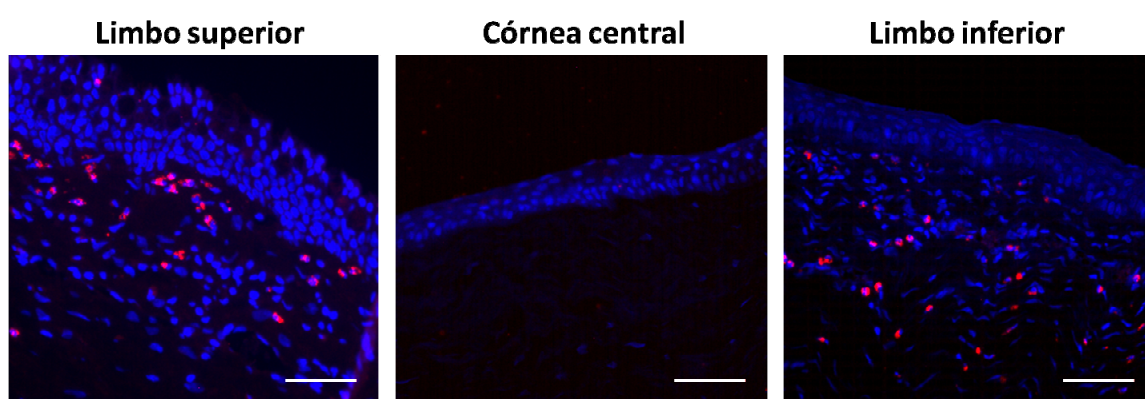


Figura 43. Localización de las hAT-MSCs en los tejidos de la superficie ocular de los conejos con SIL parcial trasplantados con 250.000 hAT-MSCs sobre MA transcurridas 8 semanas post-trasplante. Las hAT-MSCs fueron localizadas mediante inmunofluorescencia frente a BrdU (fluorescencia roja) en el estroma del limbo superior e inferior, coincidiendo estas zonas con áreas de inflamación. Núcleos celulares contrateñidos con el colorante Hoechst (fluorescencia azul). Imágenes representativas procedentes de 6 animales. Escala de la barra: 50 μ m.

6.6. Estudio fenotípico

Mediante inmunofluorescencia, se estudió el fenotipo corneal, limbar y conjuntival de las muestras tisulares obtenidas al final del periodo de seguimiento (semana 11). Se analizó la expresión de los marcadores de epitelio corneal diferenciado CK3 y E-cadherina, de los marcadores de células madre epiteliales limbares CK15 y p63 y de los marcadores de epitelio conjuntival y de mucinas CK7 y lectina, respectivamente. Como control, se utilizaron muestras obtenidas del ojo contralateral sano.

En el grupo de controles sanos, la proteína CK3 se expresó en las células epiteliales de córnea central y en las células más superficiales del epitelio limbar superior e inferior. Aunque la expresión de la CK3 se mantuvo en las células epiteliales de la córnea central en el grupo de animales con SIL, su expresión se vio aumentada de forma significativa en las células epiteliales del limbo superior e inferior. En el grupo de animales a los que se les trasplantó MA, se observó que la expresión de la CK3 se mantenía en las células epiteliales más superficiales del epitelio corneal y limbar. Por otro lado, en los animales trasplantados con MA y hAT-MSCs, la expresión de la CK3 presentó una distribución similar a la encontrada en el grupo control sano, localizándose en el epitelio de córnea central y en las capas más superficiales del epitelio limbar. Con estos resultados, se pudo afirmar que en el modelo de SIL parcial en conejo, la expresión de CK3 se vio modificada y que tras el tratamiento con hAT-MSCs en MA, la proteína CK3 presentó una expresión similar a la observada en los animales sanos (Figura 44).

La proteína de unión intercelular E-cadherina, la cual forma parte del complejo proteico responsable del mantenimiento de las uniones adherentes intercelulares, se expresa mayoritariamente en el epitelio corneal. En los tejidos sanos analizados, se observó que la proteína E-cadherina se expresaba en las células epiteliales de la córnea, pero estaba ausente en el epitelio limbar. En el grupo de animales con SIL sin tratamiento, la E-cadherina se mantuvo con la misma distribución que en los animales sanos. Aunque tras el trasplante de MA la proteína E-cadherina se mantuvo en el epitelio corneal de forma exclusiva, en el caso de los animales que fueron tratados con hAT-MSCs en MA, esta proteína se observó, además de en el epitelio corneal, en el epitelio del limbo superior (área dañada). Con estos resultados se pudo afirmar que en el modelo de SIL parcial desarrollado en conejo, la expresión de la E-cadherina no se vio modificada con respecto a los animales sanos, pero sí que varió en los animales trasplantados con hAT-MSCs en MA (Figura 45).

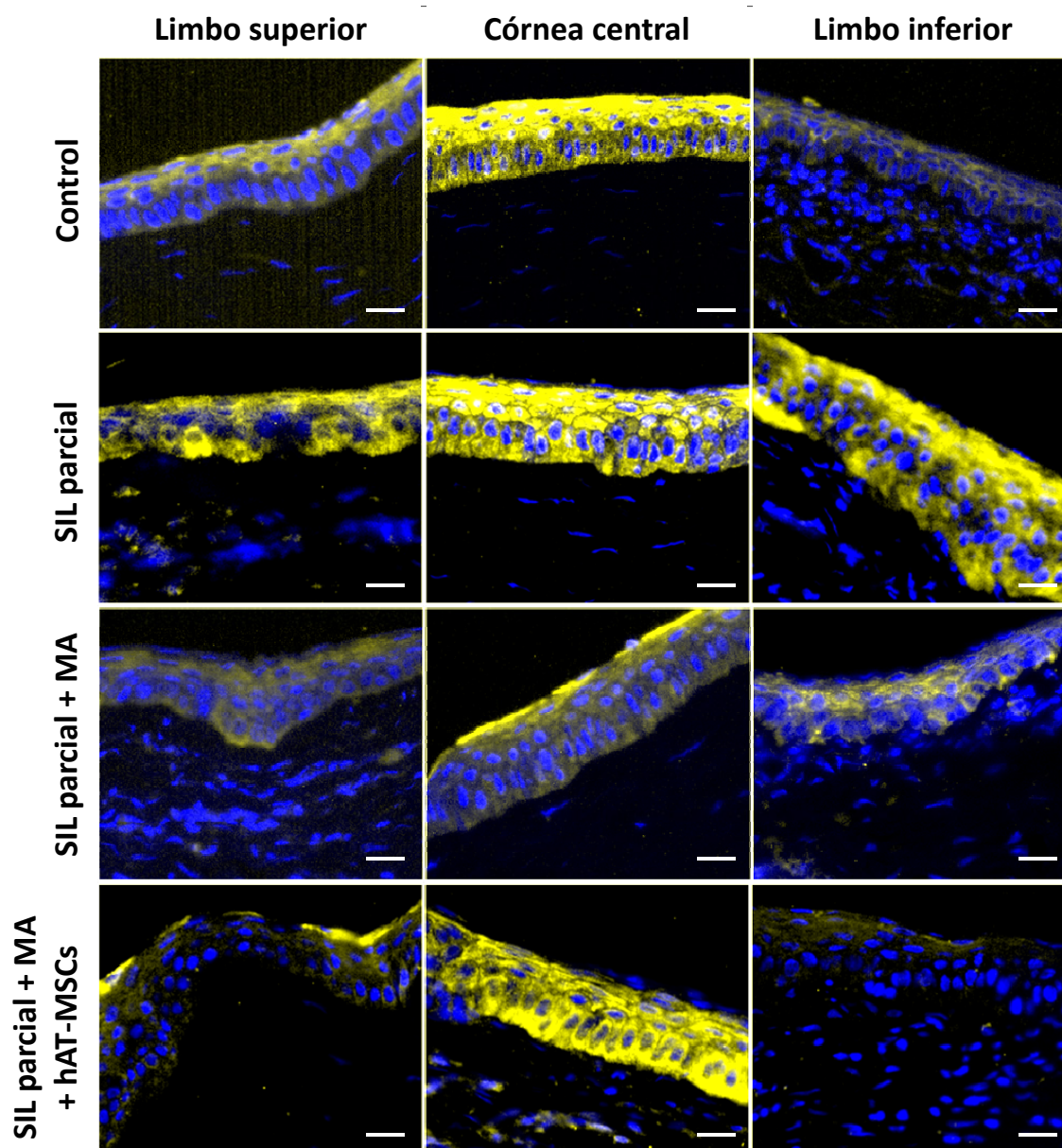
Marcador de epitelio corneal diferenciado CK3

Figura 44. Análisis mediante inmunofluorescencia de la expresión del marcador de epitelio corneal diferenciado CK3 en córnea y limbo en el modelo de SIL parcial en conejo. En condiciones control (animales sanos), la proteína CK3 (fluorescencia amarilla) se expresó en el epitelio corneal y en las células más superficiales del epitelio limbar superior e inferior. En el grupo con SIL sin tratamiento, la CK3 se expresó en todo el epitelio corneal y limbar. En el grupo trasplantado con MA, la expresión de la CK3 se observó solo en las células superficiales de la córnea y el limbo. En el grupo tratado con hAT-MSCs, la expresión de la CK3 fue similar a la observada en el grupo control sano, localizándose en el epitelio corneal y en las capas más superficiales del epitelio limbar. Núcleos celulares contrateñidos con el colorante Hoechst (fluorescencia azul). Imágenes representativas procedentes de 6 animales para cada grupo de estudio, excepto para el grupo de SIL trasplantado con MA que estuvo formado por 3 animales. Escala de la barra: 100 μ m.

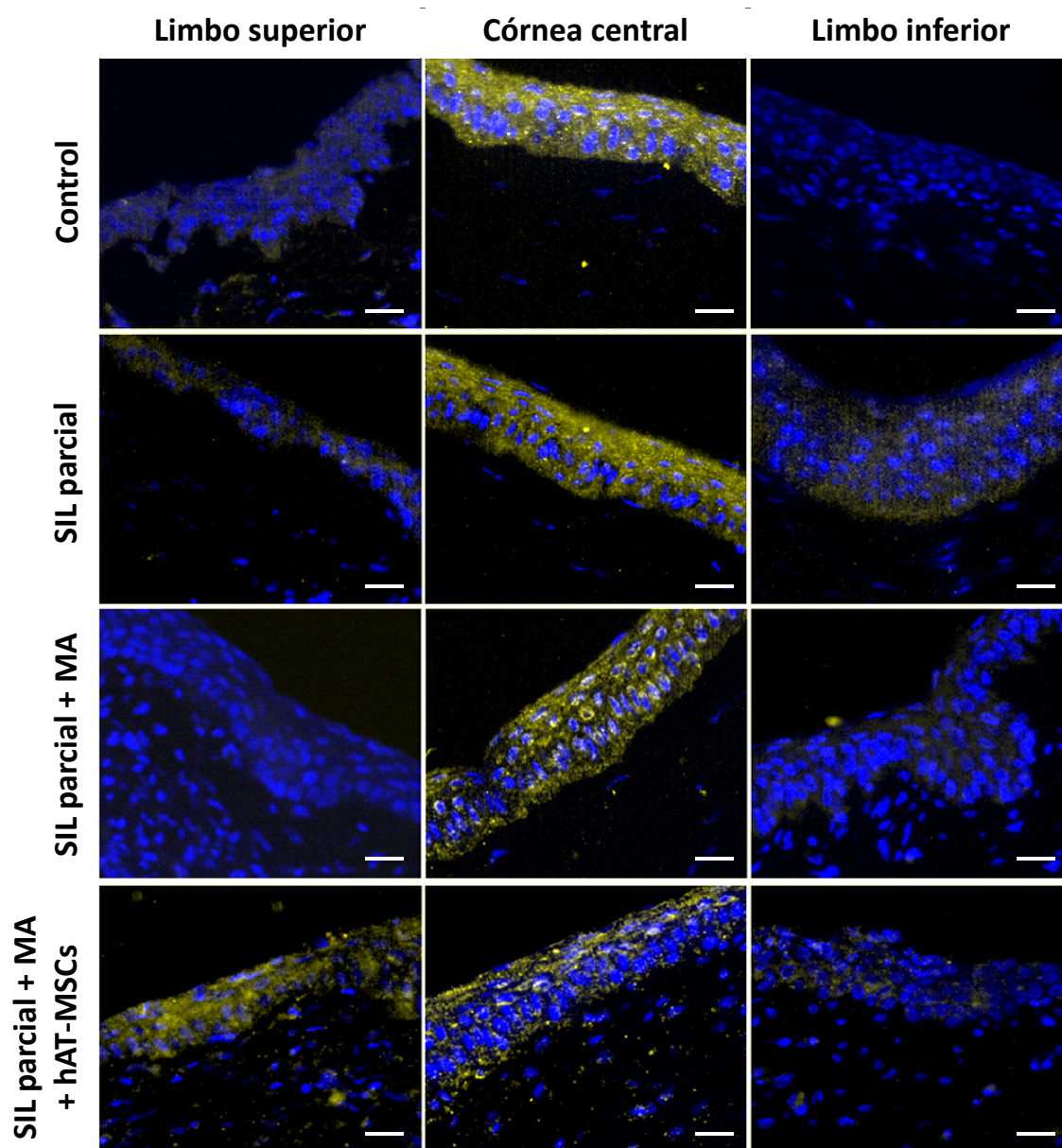
Marcador de epitelio corneal diferenciado E-cadherina

Figura 45. Análisis mediante inmunofluorescencia de la expresión del marcador de epitelio corneal diferenciado E-cadherina en córnea y limbo en el modelo de SIL parcial en conejo. En condiciones control (animales sanos), la proteína E-cadherina (fluorescencia amarilla) se expresó exclusivamente en el epitelio corneal. En los grupos de animales con SIL sin tratamiento y con SIL trasplantados con MA, la E-cadherina se expresó de igual modo, solamente en el epitelio corneal. En el grupo tratado con hAT-MSCs, la E-cadherina se localizó en el epitelio de la córnea central y del limbo superior. Núcleos celulares contrateñidos con el colorante Hoechst (fluorescencia azul). Imágenes representativas procedentes de 6 animales para cada grupo de estudio, excepto para el grupo de SIL trasplantado con MA que estuvo formado por 3 animales. Escala de la barra: 100 μ m.

RESULTADOS

En las muestras procedentes de animales sanos, la expresión de la proteína de citoesqueleto CK15, marcador de células madre epiteliales limbares, fue observada en las células del epitelio limbar, tanto en limbo superior como en el inferior, presentando mayor intensidad en las de las capas más basales. En el grupo de animales con SIL parcial sin tratamiento, la expresión de esta proteína se vio modificada, estando ausente en el epitelio de limbo superior (área dañada), pero manteniéndose en el limbo inferior. En estos animales con SIL sin tratar, se observó que la expresión de la CK15 en el epitelio del limbo inferior no se limitaba solo a las células de las capas más basales, sino que aparecía también en células más superficiales del epitelio. Se observó que en el grupo con SIL y trasplante de MA, la CK15 presentaba un patrón similar al encontrado en los animales con SIL sin tratamiento. Por el contrario, en los animales tratados con hAT-MSCs en MA, la CK15 presentó una distribución similar a la encontrada en los animales controles sanos, observándose la recuperación de su expresión en las células basales del epitelio del limbo superior (Figura 46).

El factor de transcripción p63, marcador de células madre epiteliales limbares, se expresó en los núcleos celulares de las células basales del epitelio limbar superior e inferior en los tejidos sanos utilizados como control. En los animales con SIL sin tratamiento se observó que la expresión de este factor de transcripción se perdió en el epitelio del área dañada (limbo superior), manteniéndose en las capas basales del epitelio limbar inferior (área no dañada). No se produjo ningún cambio de expresión del factor p63 en los animales con SIL trasplantados con MA con respecto a los animales con SIL sin tratamiento, manteniéndose exclusivamente la expresión en las células basales del epitelio del limbo inferior. En cambio, en el grupo de animales tratados con hAT-MSCs, se recuperó la expresión de p63 en las células basales del epitelio limbar superior y se mantuvo en las células basales del epitelio limbar inferior. Es decir, los animales tratados con hAT-MSCs presentaron una expresión del factor de transcripción p63 similar a la encontrada en el grupo control sano (Figura 47).

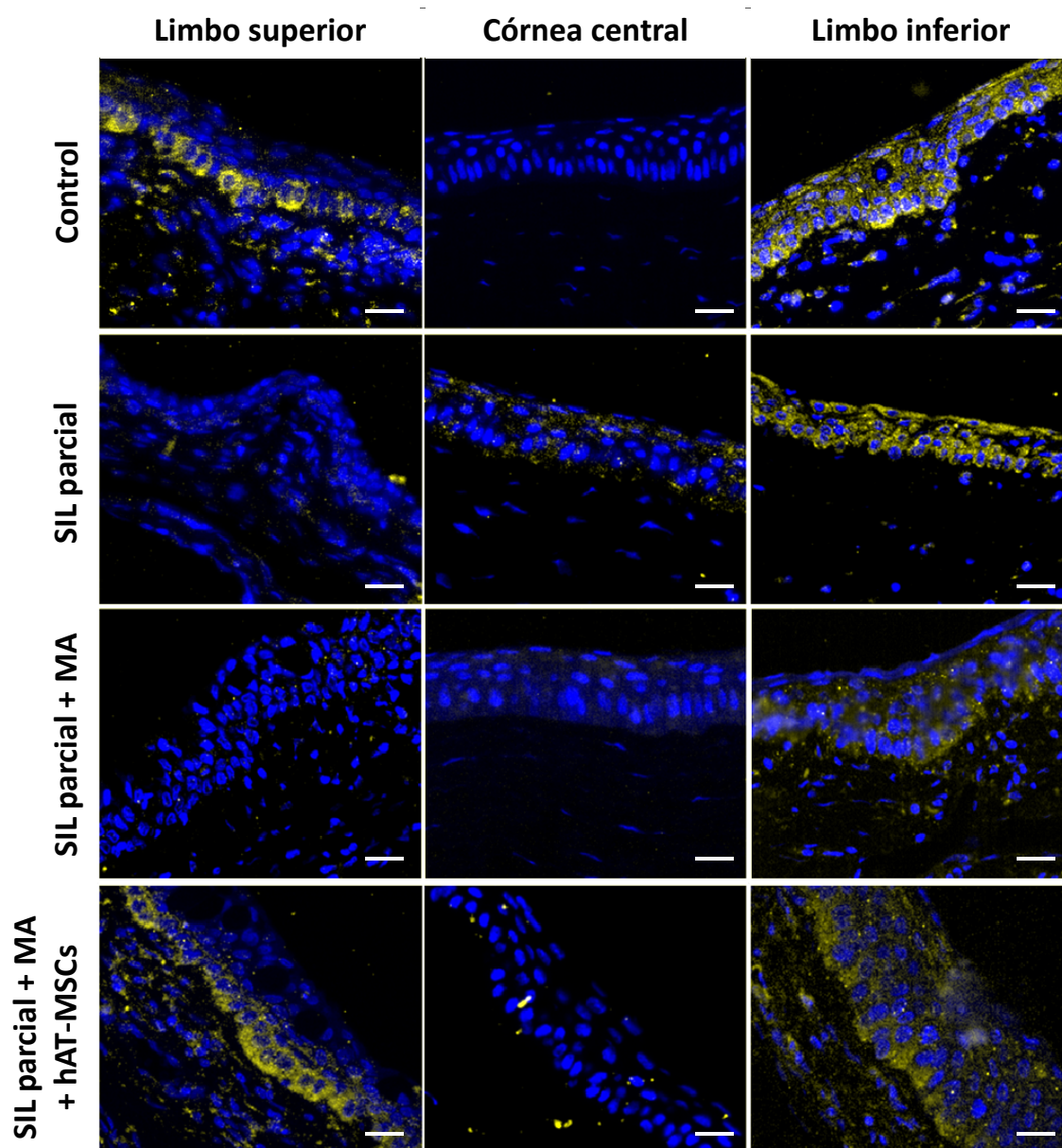
Marcador de células madre epiteliales limbares CK15

Figura 46. Análisis mediante inmunofluorescencia de la expresión del marcador de células madre epiteliales limbares CK15 en córnea y limbo en el modelo de SIL parcial en conejo. En condiciones control (animales sanos), la proteína CK15 (fluorescencia amarilla) se expresó en las células del epitelio limbar, presentando mayor intensidad en las células basales del mismo. En los grupos de animales con SIL sin tratamiento y con SIL trasplantados con MA, la expresión de CK15 se perdió en limbo superior (área dañada), manteniéndose en limbo inferior. En el grupo tratado con hAT-MSCs, la expresión de la CK15 se observó tanto en el limbo superior como en el limbo inferior, recuperando así la distribución observada en los animales sanos. Núcleos celulares contrateñidos con el colorante Hoechst (fluorescencia azul). Imágenes representativas procedentes de 6 animales para cada grupo de estudio, excepto para el grupo de SIL trasplantado con MA que estuvo formado por 3 animales. Escala de la barra: 100 μ m.

Marcador de células madre epiteliales limbares p63

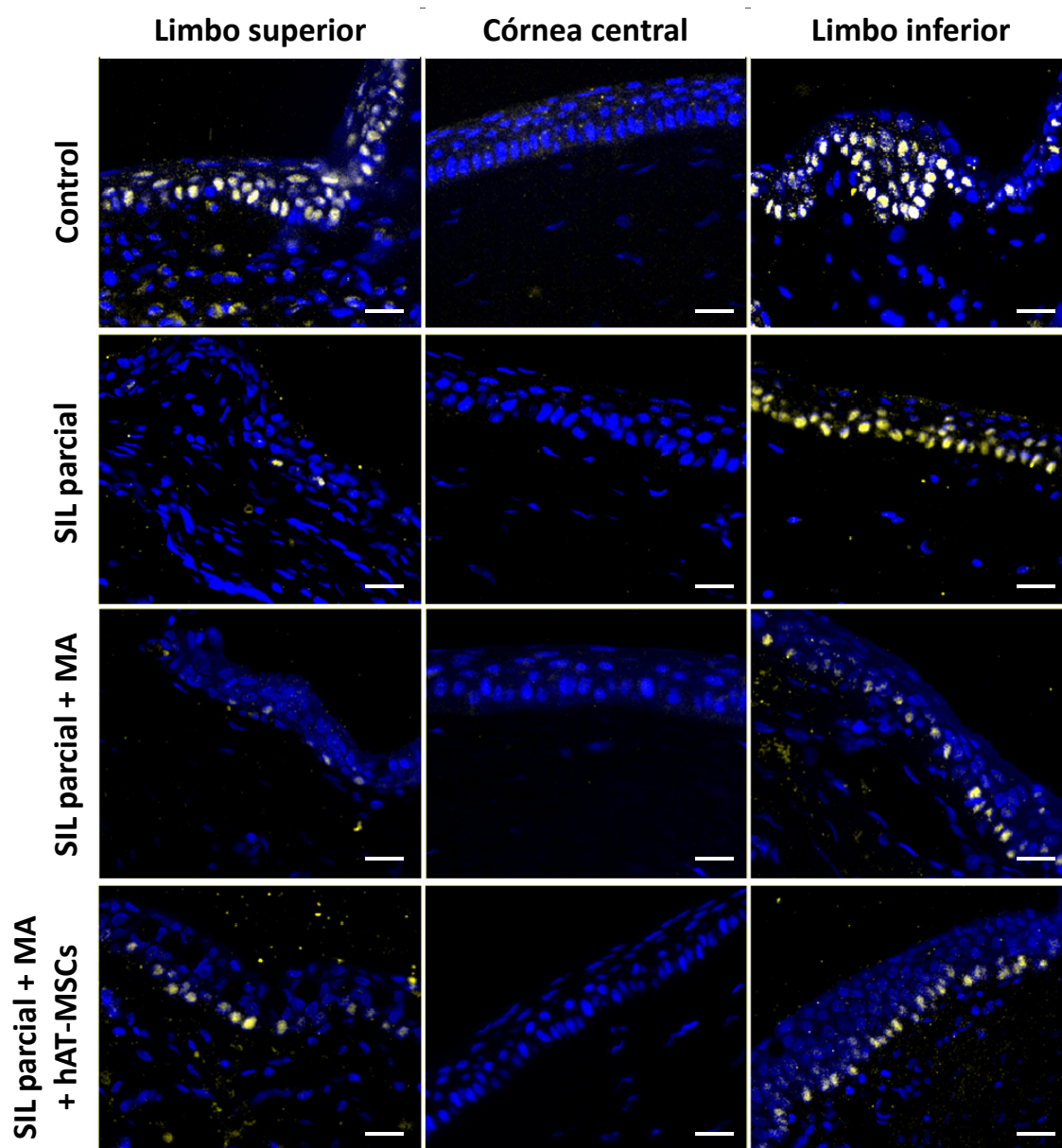


Figura 47. Análisis mediante inmunofluorescencia de la expresión del marcador de células madre epiteliales limbares p63 en córnea y limbo en el modelo de SIL parcial en conejo. En condiciones control (animales sanos), el factor de transcripción p63 (fluorescencia blanca debida a la co-localización de la fluorescencia azul y amarilla) se expresó exclusivamente en los núcleos de las células basales del epitelio limbar. En los grupos de animales con SIL sin tratamiento y con SIL trasplantados con MA, la expresión de p63 se perdió en limbo superior (área dañada), manteniéndose en limbo inferior. En el grupo tratado con hAT-MSCs, la expresión de p63 se observó tanto en el limbo superior como en el limbo inferior, recuperando así la distribución observada en los animales sanos. Núcleos celulares contrateñidos con el colorante Hoechst (fluorescencia azul). Imágenes representativas procedentes de 6 animales para cada grupo de estudio, excepto para el grupo de SIL trasplantado con MA que estuvo formado por 3 animales. Escala de la barra: 100 μ m.

La expresión de la proteína de citoesqueleto CK7, característica de células secretoras de la conjuntiva, fue observada en las células epiteliales de la conjuntiva en el grupo control sano. No se observó expresión de CK7 en el epitelio corneal y solamente alguna célula epitelial de la zona limbar expresó este marcador en los tejidos utilizados como controles sanos. En los tejidos procedentes del grupo de animales con SIL sin tratamiento, no se observó ningún cambio en este marcador con respecto a los controles sanos, localizándose exclusivamente en el epitelio conjuntival y en alguna célula del epitelio limbar. En los grupos trasplantados con MA y con MA y hAT-MSCs tampoco se observó ningún cambio en la CK7 (Figura 48). Por lo tanto, se puede decir que la expresión del marcador de epitelio secretor conjuntival CK7 no se vio modificada en el modelo SIL parcial en conejo, ni en los animales trasplantados con MA ni en los trasplantados con MA y hAT-MSCs. Por otro lado, mediante la tinción con lectina, se observó la presencia de mucinas en el interior de las células caliciformes. En las muestras control obtenidas de animales sanos, se observó la presencia de células caliciformes únicamente en el epitelio de la conjuntiva. En los grupos de animales con SIL, tanto tratados como no tratados, se observó la presencia de células caliciformes teñidas por la lectina en el epitelio conjuntival y alguna en el epitelio del limbo superior e inferior, sin encontrar diferencias significativas entre los diferentes grupos de animales. En ningún caso se observó la presencia de células caliciformes en el epitelio de la córnea central. Además, en estas muestras, se observó una tinción difusa sobre la superficie del epitelio conjuntival y limbar, indicando la presencia de mucinas secretadas sobre la superficie de estos epitelios (Figura 48). Los resultados obtenidos con la lectina concuerdan con los obtenidos en el estudio histopatológico realizado mediante tinción con PAS, donde las células caliciformes se teñían en color púrpura y aparecían en el epitelio limbar (Figura 42).

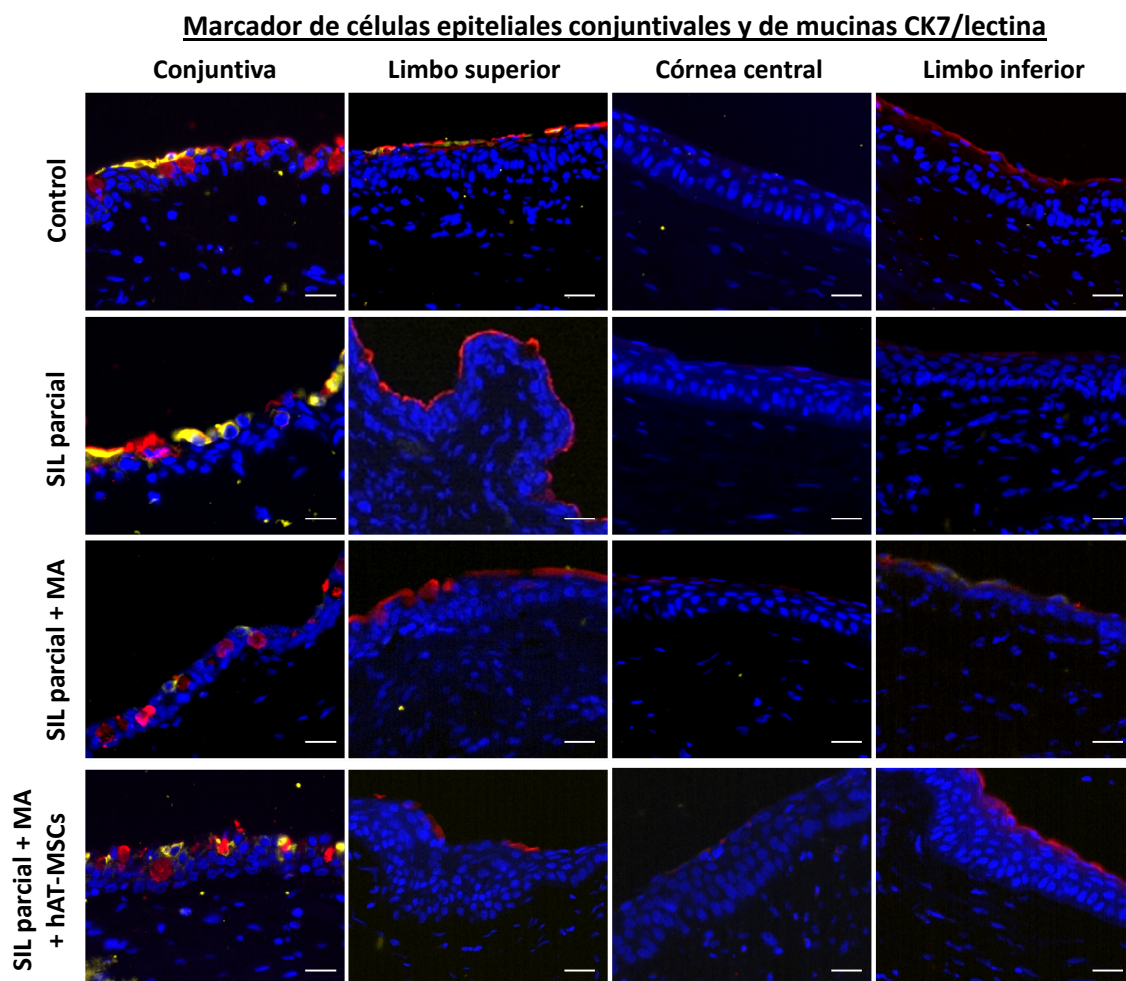


Figura 48. Análisis mediante inmunofluorescencia de la expresión de los marcadores de epitelio conjuntival CK7 y de mucinas (lectina) en córnea y limbo en el modelo de SIL parcial en conejo. En condiciones control (animales sanos), la proteína CK7 (fluorescencia amarilla) se expresó exclusivamente en conjuntiva y la lectina tiñó las mucinas (fluorescencia roja) presentes en las células caliciformes de la misma. En los 3 grupos de estudio, grupo con SIL sin tratamiento, grupo con SIL trasplantado con MA y grupo con SIL, MA y hAT-MSCs, la expresión de CK7 se mantuvo exclusivamente en la conjuntiva. En los grupos de animales con SIL, tanto tratados como no tratados, se observó la presencia de células caliciformes teñidas por la lectina en el epitelio conjuntival y alguna en el epitelio del limbo superior e inferior, sin encontrar diferencias significativas entre los diferentes grupos de animales. En ningún caso se observó la presencia de células caliciformes en el epitelio de la córnea central. Núcleos celulares contrateñidos con el colorante Hoechst (fluorescencia azul). Imágenes representativas procedentes de 6 animales para cada grupo de estudio, excepto para el grupo de SIL trasplantado con MA que estuvo formado por 3 animales. Escala de la barra: 100 μ m.

Tabla 8. Expresión de los marcadores CK3, E-cadherina, CK15, p63 y CK7 en el modelo de SIL parcial en conejo. Cuantificación subjetiva utilizando la siguiente escala: - ausencia de expresión; + expresión baja; ++ expresión moderada; +++ expresión alta. LS: limbo superior, CC: córnea central, LI: limbo inferior, CJ: conjuntiva.

	Marcadores de epitelio corneal diferenciado						Marcadores de células madre epiteliales limbares						Marcador de epitelio conjuntival			
	CK3			E-cadherina			CK15			p63			CK7			
	LS	CC	LI	LS	CC	LI	LS	CC	LI	LS	CC	LI	CJ	LS	CC	LI
Control sano	+	+++	+	-	+++	-	+++	-	+++	+++	-	+++	+++	+	-	+
SIL parcial	++	+++	++	-	+++	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	+	-	+
SIL parcial + MA	+	+	+	-	+++	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	+	-	+
SIL parcial + MA + hAT-MSCs	+	+++	+	+	+++	-	+++	-	+++	++	-	+++	+++	+	-	+

Con los resultados obtenidos en el modelo de SIL parcial se puede decir que las hAT-MSCs fueron bien toleradas tras su trasplante a la superficie ocular, migraron a las zonas inflamadas del estroma limbar y permanecieron allí al menos durante 8 semanas. Por otro lado, el fenotipo de la superficie ocular, alterado en el modelo de SIL parcial, se vio parcialmente recuperado en los animales trasplantados con 250.000 hAT-MSCs. Se observó la recuperación del patrón de expresión del marcador de epitelio corneal diferenciado CK3 y de los marcadores de células madre epiteliales limbares CK15 y p63 por parte de las células basales del epitelio del limbo dañado (Tabla 8).

7. Modelo de SIL total en conejo

Debido a la levedad del modelo de SIL parcial desarrollado en conejo, fue difícil determinar mejoras en cuanto a los signos clínicos con las escalas de valoración utilizadas. Por ello, además de desarrollar un modelo de SIL total donde testar la eficacia final del trasplante de hAT-MSCs sobre la superficie ocular, se mejoró el sistema de evaluación de los signos clínicos teniendo en cuenta más parámetros, como se explica a continuación.

7.1. Evolución clínica del modelo

Se desarrolló de forma exitosa un modelo de SIL total en 6 conejos mediante limbectomía de los 360° del limbo. En este modelo, se evaluaron los signos clínicos

RESULTADOS

neovascularización, opacidad corneal, invasión del tejido conjuntival y defecto epitelial, todos ellos con una escala de 0 a 4. Para obtener unos datos más refinados, la córnea fue dividida en 5 sectores y a cada uno de ellos se le asignó un valor para cada signo clínico. Además, en este modelo se evaluó la penetración de los vasos sanguíneos (en mm y mediante la escala de Efron) y del tejido conjuntival (en mm) hacia el centro corneal y se cuantificó el área del defecto epitelial. Durante el desarrollo del modelo, se observó que, transcurrida la primera semana desde la realización del daño, los signos clínicos neovascularización y opacidad corneal fueron significativamente mayores que en el momento de la lesión. Además, durante las siguientes semanas, continuaron empeorando hasta alcanzar un grado de severidad de en torno a 2,5 puntos en la semana 4, manteniéndose más o menos constante hasta el final del seguimiento. Igualmente, se observó un aumento paulatino significativo de la longitud de los neovasos que penetraban hacia el centro corneal, alcanzando en la semana 5 post-lesión valores máximos de 5 mm de longitud o de 3 puntos en la escala Efron (correspondientes a vasos de 4-5 mm). En el caso de la invasión del tejido conjuntival hacia la córnea, se observaron dos tendencias: en 2 de los 6 animales se produjo una invasión del tejido conjuntival sobre la córnea que se mantuvo durante todo el periodo de seguimiento, mientras que en los otros 4 animales no se desarrolló dicha invasión conjuntival hacia la córnea. Teniendo en cuenta los datos de los 6 animales en conjunto, la invasión del tejido conjuntival y la longitud del mismo no fueron significativas. Durante las 2 primeras semanas desde la realización de la lesión, el epitelio corneal se recuperó parcialmente de forma significativa, pero el defecto epitelial se mantuvo a lo largo de todo el seguimiento con un grado de severidad de aproximadamente 1,5 puntos en la escala de valoración utilizada, o con un área de 0,5 cm² al ser cuantificado con el programa Image J. El modelo de SIL total desarrollado en conejo presentó los signos clínicos característicos de un SIL moderado-severo. Además, estos signos clínicos se mantuvieron hasta el final del seguimiento y el modelo de SIL total no revirtió de forma espontánea (Figura 49). Este grupo de animales fue utilizado como grupo control de SIL total sin tratamiento.

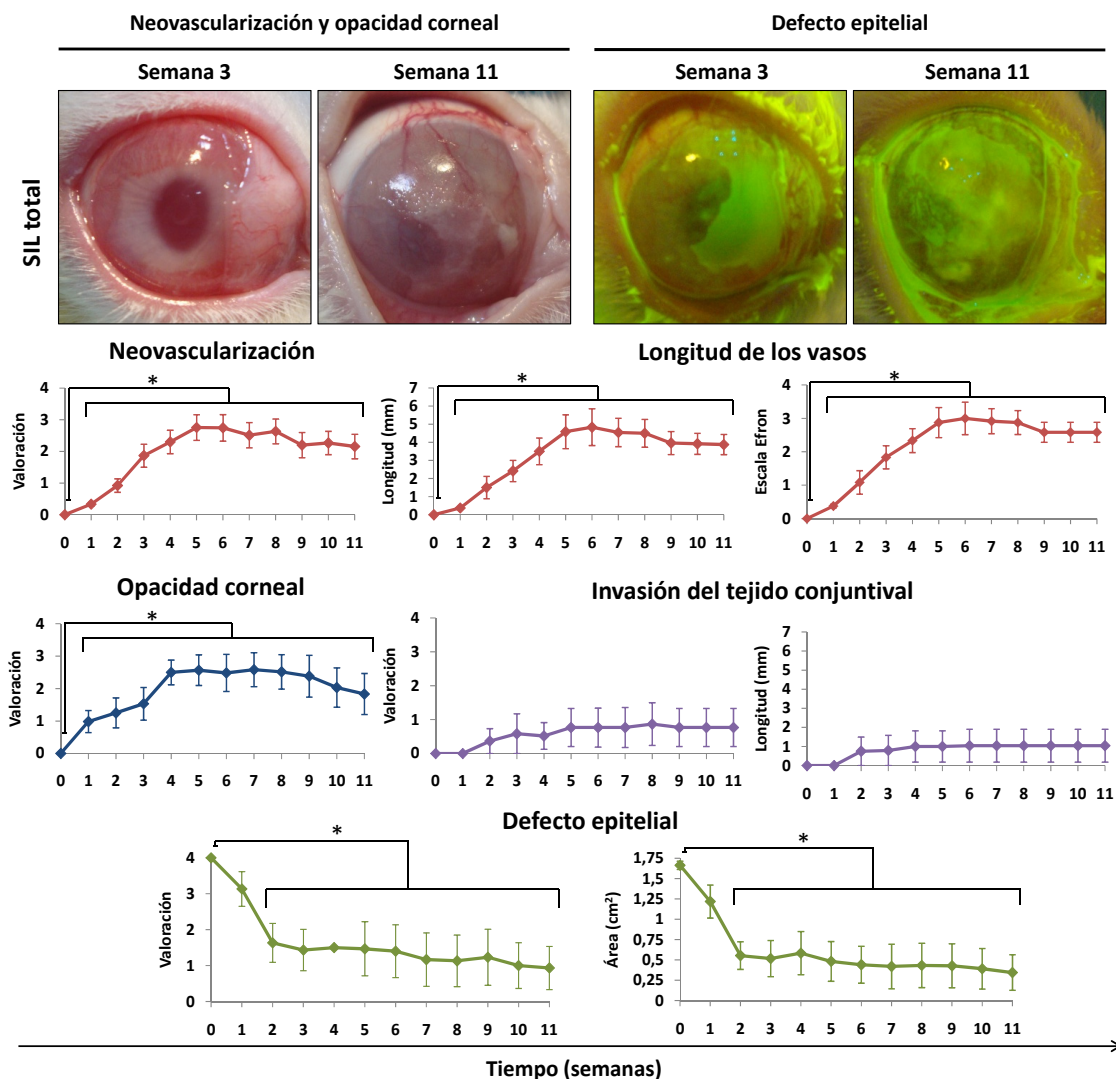


Figura 49. Evolución de los signos clínicos en el modelo de SIL total en conejo. Transcurrida 1 semana desde el momento de la realización de la lesión, se desarrollaron dos de los signos clínicos que caracterizan la enfermedad, neovascularización y opacidad corneal, los cuales se mantuvieron con un grado de severidad aproximado de 2,5 puntos durante todo el periodo de seguimiento, con diferencias significativas con respecto a tiempo 0. La longitud de los vasos fue aumentando durante las primeras semanas de seguimiento, alcanzando 5 mm de longitud o valores de 3 en la escala de Efron (vasos de 4-5 mm). En algunos de los animales se produjo una invasión del tejido conjuntival sobre la córnea pero, en conjunto, esta invasión del tejido conjuntival no fue significativa. El defecto epitelial (teñido en verde con fluoresceína sódica) disminuyó de forma significativa durante las 2 primeras semanas de seguimiento y se mantuvo durante el resto del periodo de seguimiento con una severidad aproximada de 1,5 o con un área de unos 0,5 cm². El tiempo 0 corresponde al momento inmediatamente posterior a la realización de la lesión. Imágenes representativas procedentes de 6 animales. Datos obtenidos de la media aritmética de 6 animales ± SEM. Test estadísticos: Kruskal-Wallis, U de Mann-Whitney y ANOVA de 1 factor. *p ≤ 0,05.

RESULTADOS

Comparación entre el modelo de SIL parcial y el modelo de SIL total

Debido a que el sistema de evaluación de los signos clínicos utilizado en ambos modelos no fue el mismo, no se han podido comparar los datos numéricos de ambos modelos. Para evaluar los signos clínicos en el modelo de SIL parcial se dió un único valor a toda la córnea para cada signo, mientras que en el modelo de SIL total se dividió la córnea en 5 zonas y a cada una de ellas se le asignó un valor para cada signo, realizando posteriormente la media de los valores de las 5 zonas. En ambos casos se desarrollaron los signos clínicos neovascularización y opacidad corneal durante las primeras semanas desde el momento de la realización de la lesión. En cambio, en las fotografías realizadas durante el seguimiento se observó mayor cantidad y mayor penetración de los neovasos en el modelo de SIL total con respecto al modelo de SIL parcial. En cuanto a la opacidad corneal también se observó mayor severidad de la misma en el modelo de SIL total en comparación con el modelo de SIL parcial. Por otro lado, aunque las fotografías tomadas en el modelo parcial se realizaron sin filtro amarillo mientras que en el modelo total sí que fueron realizadas con dicho filtro, se pudo observar que en el modelo de SIL total se observaron mayores defectos epiteliales que en el modelo de SIL parcial (Figura 50). En general, se puede decir que los signos clínicos del modelo de SIL total, como era de esperar, se desarrollaron de forma mucho más severa que los signos clínicos del modelo de SIL parcial.

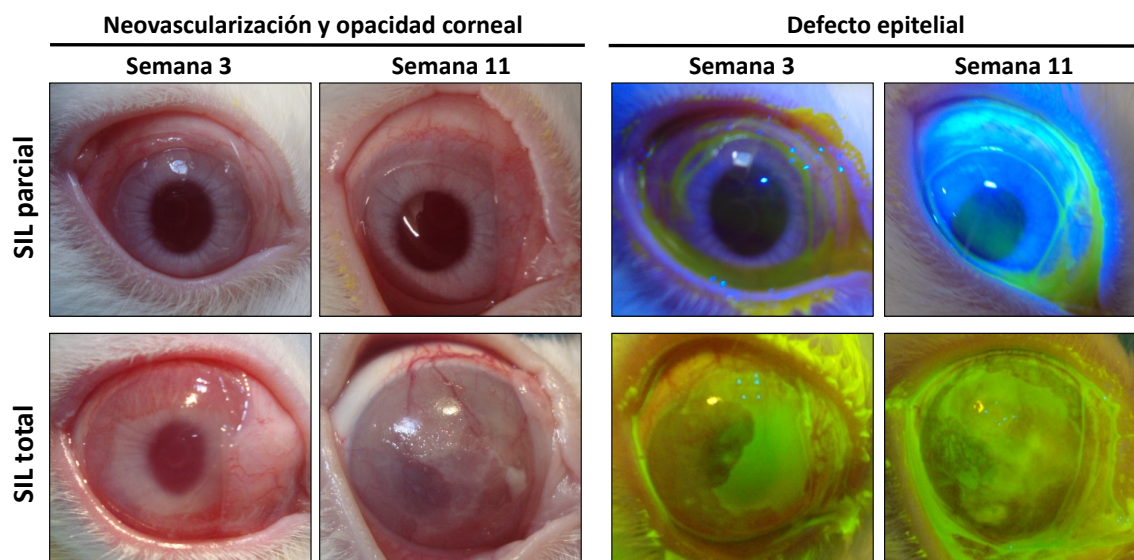


Figura 50. Comparación de los signos clínicos desarrollados en el modelo de SIL parcial y en el modelo de SIL total en conejo. En las fotografías se puede observar cómo los signos clínicos neovascularización, opacidad corneal y defecto epitelial (teñido en verde con fluoresceína sódica) se desarrollaron con mayor severidad en el modelo de SIL total que en el modelo de SIL parcial. Resultados representativos procedentes de 6 animales para cada grupo de estudio.

7.2. Trasplante de hAT-MSCs

Transcurridas 3 semanas desde el momento de la realización de la lesión de los 360° del limbo, se trasplantaron 250.000 hAT-MSCs sembradas en MA sobre la superficie ocular de 5 conejos. Aunque el SIL fue inducido en 6 animales, 1 de ellos desarrolló simblefaron (adhesión entre la conjuntiva palpebral y bulbar), por lo que fue retirado del grupo de estudio. En este grupo de 5 animales, al igual que en el grupo con SIL total sin tratamiento, se comenzaron a desarrollar los signos clínicos neovascularización y opacidad corneal transcurrida 1 semana desde el momento de la realización de la lesión y el epitelio corneal se regeneró parcialmente durante las primeras semanas tras la realización del daño. En el grupo de SIL total sin tratamiento, se observó un aumento significativo de la neovascularización entre la semana 3 y las semanas 5, 6, 7, 8 y 10. En cambio, en el grupo tratado con las hAT-MSCs, no se observó aumento significativo de la neovascularización entre la semana 3 (momento previo a la realización del trasplante) y las semanas posteriores. De igual modo, se observó que en el grupo con SIL total sin tratamiento, los vasos penetraron más mm hacia el centro corneal que en el grupo tratado con hAT-MSCs, encontrando diferencias estadísticamente

RESULTADOS

significativas entre ambos grupos en las semanas 5, 6, 7, 8, 9 y 11. Analizando la penetración de los vasos mediante la escala Efron, también se observó un aumento estadísticamente significativo de la penetración en el grupo con SIL total sin tratamiento entre la semana 3 y las semanas 5-11, mientras que en el grupo tratado con hAT-MSCs, no se encontraron diferencias significativas entre la semana 3 y las semanas posteriores. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre el grupo de animales con SIL sin tratar y el grupo de animales con SIL trasplantados con hAT-MSCs. En el caso de la opacidad corneal, en el grupo con SIL total sin tratamiento se observó un aumento significativo entre la semana 3 y las semanas posteriores (semanas 4, 5, 6, 7 y 8). En cambio, en el grupo tratado con hAT-MSCs, no se observó un aumento de la opacidad corneal, sino que dicho signo clínico se mantuvo con valores similares a los encontrados en la semana 3 durante las semanas siguientes al trasplante. En cuanto a la invasión del tejido conjuntival sobre la córnea, solo en 1 de los 5 animales estudiados se observó su desarrollo. Al estudiar los datos en conjunto, no se observaron diferencias significativas entre el grupo con SIL sin tratamiento y el grupo con SIL tratado en cuanto a la invasión del tejido conjuntival hacia el centro corneal. Aunque no se encontraron diferencias significativas en el defecto epitelial entre el grupo sin tratamiento y el tratado con hAT-MSCs, tanto en la valoración subjetiva, como en la cuantificación mediante análisis de imagen, se observó que el defecto epitelial fue algo mayor en el grupo con SIL total sin tratamiento que en el grupo tratado (Figura 51). Con estos datos, se puede concluir que el trasplante de hAT-MSCs en el modelo de SIL total podría frenar el desarrollo de la neovascularización y de la opacidad corneal.

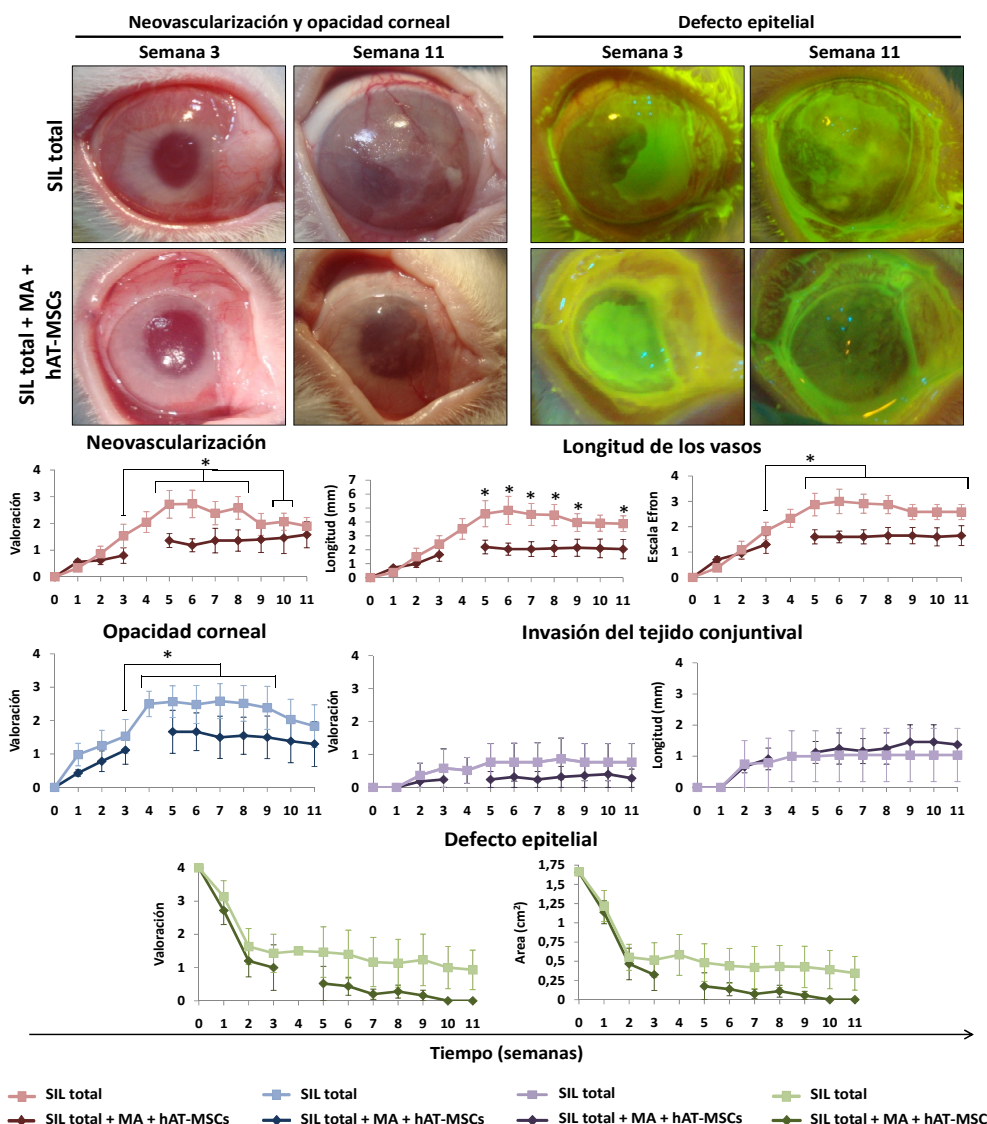


Figura 51. Evolución de los signos clínicos en el modelo de SIL total trasplantado con MA y hAT-MSCs. En el grupo con SIL total sin tratamiento, se observó un aumento significativo de la neovascularización, la penetración de los vasos hacia el centro corneal y la opacidad corneal entre la semana 3 y las semanas posteriores. En cambio, estos signos no empeoraron en el grupo tratado con hAT-MSCs, sino que se mantuvieron con valores similares a los encontrados en la semana 3 durante las semanas siguientes al trasplante. Se observaron también diferencias en la penetración de los vasos (cuantificados en mm) hacia el centro corneal, siendo significativamente mayor en el grupo con SIL sin tratamiento en comparación con el grupo tratado con hAT-MSCs. La invasión del tejido conjuntival sobre la córnea no fue estadísticamente significativa. Aunque no se encontraron diferencias, se observó que el defecto epitelial (teñido en verde con fluoresceína) fue algo mayor en el grupo con SIL total sin tratamiento que en el grupo tratado. El tiempo 0 corresponde al momento inmediatamente posterior a la realización de la lesión. El tiempo 3 corresponde al momento previo a la realización del trasplante de MA con 250.000 hAT-MSCs. Imágenes representativas procedentes de 6 animales para el grupo de SIL total sin tratamiento y de 5 animales para el grupo de SIL tratado con hAT-MSCs. Datos obtenidos de la media aritmética de 6 animales para el grupo de SIL total sin tratamiento y de 5 animales para el grupo de SIL tratado con hAT-MSCs \pm SEM. Test estadísticos: Friedman, Wilcoxon, Kruskal-Wallis, U de Mann-Whitney, t-Student y ANOVA de 1 factor. *p \leq 0,05.

7.3. Estudio histopatológico

Mediante el análisis histopatológico (tinción con PAS) se estudió el estado de los tejidos corneales y limbares (áreas superior e inferior) de los animales al final del periodo de seguimiento (semana 11). Como control, se utilizaron muestras obtenidas del ojo contralateral sano. En los controles sanos, se observaron 4-5 capas de células epiteliales en la córnea central y 6-7 en el limbo. Además, se observó la presencia de vasos sanguíneos a nivel del estroma limbar. En el caso de los tejidos procedentes de animales con SIL sin tratamiento, el número de capas de células epiteliales fue menor que en el control, presentando entre 2-3 capas de epitelio, tanto en córnea central como en limbo superior e inferior. Además, este epitelio presentó una mayor desorganización y se observó la presencia de células caliciformes (teñidas en color púrpura) en el epitelio limbar, indicando la invasión del epitelio conjuntival sobre el limbo (Figura 52). Además, 2 de los 6 animales presentaron células caliciformes en el centro conal y en todos los tejidos procedentes de este grupo de animales se observaron células inflamatorias (células con núcleos teñidos en color morado) tanto en el estroma del limbo como en el estroma de la córnea central, a diferencia de lo observado en el grupo con SIL parcial sin tratamiento, en el cual no aparecían células inflamatorias en el estroma corneal, aunque sí en el estroma limbar (Figura 42). Además, en el grupo con SIL total sin tratamiento se observó la aparición de algún vaso sanguíneo en el estroma corneal, el cual presentó mayor desorganización que el de los tejidos control o que los del grupo con SIL parcial, demostrando así que el modelo de SIL total desarrolló daños más severos a nivel histológico que el modelo de SIL parcial. Al igual que en el grupo con SIL sin tratamiento, en los animales con SIL tratados con MA y hAT-MSCs, se observó un menor número de capas de células epiteliales en córnea y en limbo en comparación con el grupo control sano, así como la presencia de células caliciformes en el epitelio del limbo y de infiltrados inflamatorios en el estroma limbar. En el grupo de SIL trasplantado con hAT-MSCs, solo un animal presentó células caliciformes en el centro corneal e infiltrados inflamatorios en algunas zonas del estroma corneal. A diferencia del grupo de animales con SIL sin tratamiento, en los animales tratados con hAT-MSCs, se observó una menor infiltración de células inflamatorias y una menor desestructuración del estroma corneal (Figura 52).

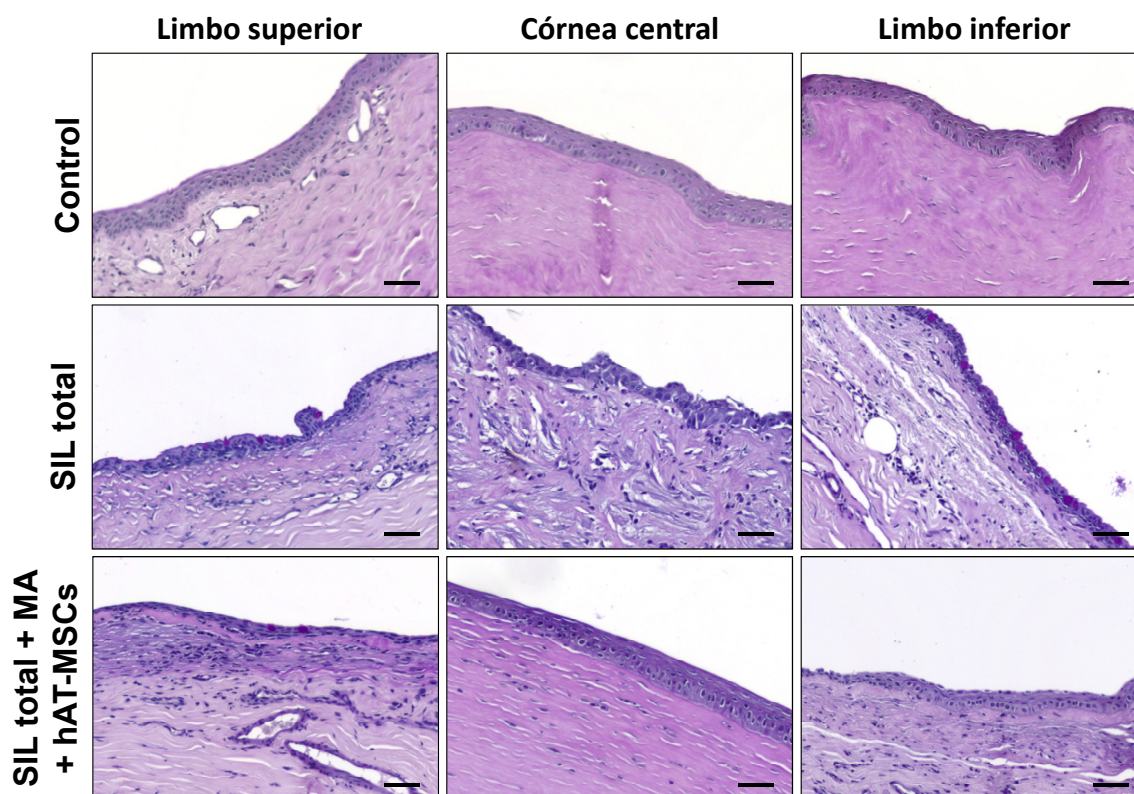


Figura 52. Histología (tinción con PAS) de los tejidos corneales y limbares del modelo de SIL total en conejo. En los tejidos procedentes del grupo control sano, se observaron entre 4 y 5 capas de células epiteliales en la córnea y 6-7 en el limbo y la presencia de vasos sanguíneos en el estroma limbar. En los tejidos procedentes de los animales con SIL sin tratamiento y con SIL trasplantados con MA y hAT-MSCs, se encontró la presencia de células caliciformes (teñidas en púrpura) en el epitelio del limbo y de células inflamatorias en el estroma limbar (acúmulo de células con el núcleo teñido en morado en el estroma limbar, en zonas subepiteliales). En el grupo de animales con SIL sin tratamiento, se observó la presencia de infiltrados inflamatorios en el estroma de la córnea central y la desestructuración del mismo. En los animales tratados con MA y hAT-MSCs, se observó una menor infiltración de células inflamatorias y una menor desestructuración del estroma corneal. Imágenes representativas procedentes de 6 animales de cada grupo de estudio, excepto para el grupo de SIL total + MA + hAT-MSCs que estuvo formado por 5 animales. Escala de la barra: 50 μ m.

7.4. Localización de las hAT-MSCs

Las hAT-MSCs marcadas con BrdU antes de ser trasplantadas fueron localizadas mediante inmunofluorescencia frente a BrdU en los tejidos de la superficie ocular de los conejos trasplantados. Transcurridas 8 semanas desde la realización del trasplante de 250.000 hAT-MSCs en MA sobre la superficie ocular de 5 conejos con un SIL total, las hAT-MSCs fueron localizadas en el estroma del limbo, tanto en el limbo superior como en el limbo inferior (Figura 53). Estas zonas de localización de las hAT-MSCs coincidían

RESULTADOS

con las áreas con mayor número de células inflamatorias observadas en el estudio histopatológico (Figura 52), por lo que las hAT-MSCs trasplantadas sobre la superficie ocular fueron capaces de migrar hasta zonas de inflamación (estroma limbar) y permanecer allí durante al menos 8 semanas. Además, se observó una correlación entre la cantidad de hAT-MSCs detectada y la severidad del SIL desarrollado en cada animal. En aquellos animales en los que se observó mayor infiltrado inflamatorio se encontró una mayor cantidad de hAT-MSCs en el tejido estromal. En concreto, en el conejo en el cual se encontraron células inflamatorias en córnea central también se observó la presencia de hAT-MSCs en esta zona.

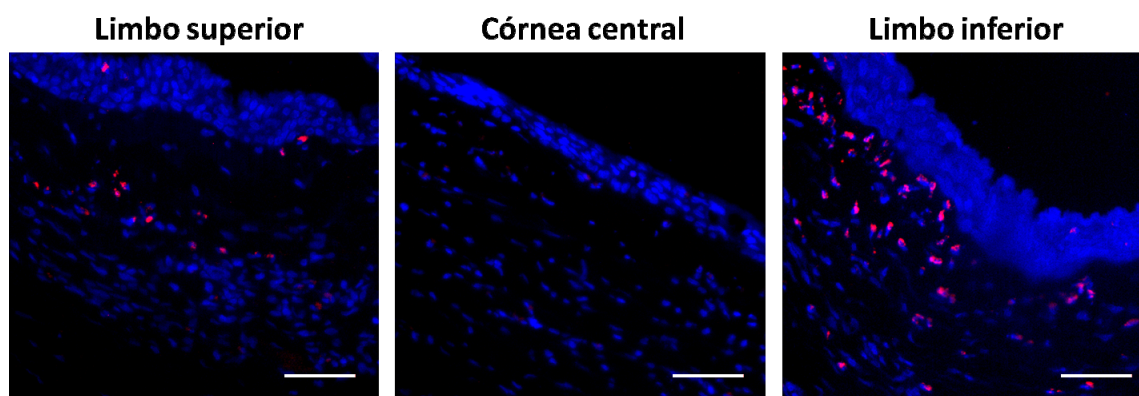


Figura 53. Localización de las hAT-MSCs en los tejidos de la superficie ocular de los conejos con SIL total trasplantados con 250.000 hAT-MSCs transcurridas 8 semanas post-trasplante. Las hAT-MSCs fueron localizadas mediante inmunofluorescencia frente a BrdU (fluorescencia roja) en el estroma limbar del limbo superior e inferior, coincidiendo estas zonas con áreas de inflamación. Imágenes representativas procedentes de 5 animales. Núcleos celulares contrateñidos con el colorante Hoechst (fluorescencia azul). Escala de la barra: 50 μ m.

7.5. Estudio fenotípico

Mediante inmunofluorescencia, se estudió el fenotipo corneal, limbar y conjuntival de las muestras tisulares obtenidas al final del periodo de seguimiento (semana 11). Se analizó la expresión de los marcadores de epitelio corneal diferenciado CK3 y E-cadherina, de los marcadores de células madre epiteliales limbares CK15 y p63 y de los marcadores de epitelio conjuntival y de mucinas CK7 y lectina, respectivamente. Se utilizaron como control muestras obtenidas del ojo contralateral sano.

En el grupo de controles sanos, el marcador de epitelio corneal diferenciado CK3 se expresó en las células epiteliales de córnea central y en las células más superficiales del epitelio limbar (superior e inferior). En el grupo de animales con SIL total sin tratamiento, no se observó expresión de la proteína CK3 ni en el epitelio corneal ni en el limbar. En el grupo de animales con SIL total tratado con MA y hAT-MSCs, la expresión de la CK3 se localizó de manera homogénea en todo el epitelio del limbo (superior e inferior) y en las capas más superficiales del epitelio de la córnea central (Figura 54). En conjunto se puede decir que la proteína CK3 no se expresó en los animales con SIL total, pero sí en los tratados con hAT-MSCs.

Los cambios de expresión de la CK3 fueron diferentes en el modelo de SIL parcial y en el modelo de SIL total. En el modelo de SIL parcial, la expresión de la CK3 se localizó tanto en córnea como en limbo en los animales sin tratamiento (Figura 44). En cambio, en los animales con SIL total, no se observó expresión de CK3 ni en córnea ni en limbo. Por otro lado, en los animales con SIL parcial tratados con hAT-MSCs, se recuperó el fenotipo, expresándose CK3 en córnea pero no en limbo, mientras que en los animales con SIL total tratados con hAT-MSCs la expresión de la CK3 se localizó en el epitelio del limbo y en las capas más superficiales del epitelio corneal.

En los tejidos procedentes de animales sanos, se observó que la proteína de uniones intercelulares E-cadherina se expresaba en las células epiteliales de la córnea central, pero estaba ausente en el epitelio limbar. En el grupo de animales con SIL total sin tratamiento, la expresión de la proteína E-cadherina disminuyó en el epitelio corneal con respecto al grupo control sano. En el grupo de animales trasplantados con hAT-MSCs en MA, la proteína E-cadherina presentó unos niveles de expresión en el epitelio corneal similares a los observados en el control sano. Además, en el grupo de animales tratados con hAT-MSCs, esta proteína se distribuyó tanto en el epitelio corneal como en el epitelio del limbo (superior e inferior) (Figura 55). Con estos resultados, se puede afirmar que en el modelo de SIL total, la expresión de la proteína E-cadherina se vio disminuída, mientras que en los animales que fueron tratados con hAT-MSCs, la expresión de la E-cadherina aumentó en el epitelio limbar y se mantuvo con niveles similares a los del control sano en el epitelio corneal.

RESULTADOS

En comparación con el modelo de SIL parcial, en el cual la expresión de la E-cadherina no se vio modificada en los animales sin tratamiento (Figura 45), en los animales de SIL total, la expresión de E-cadherina disminuyó. Por otro lado, tanto en los animales con SIL parcial tratados con hAT-MSCs como en los animales con SIL total tratados con hAT-MSCs, la expresión de la E-cadherina aumentó en el epitelio limbar.

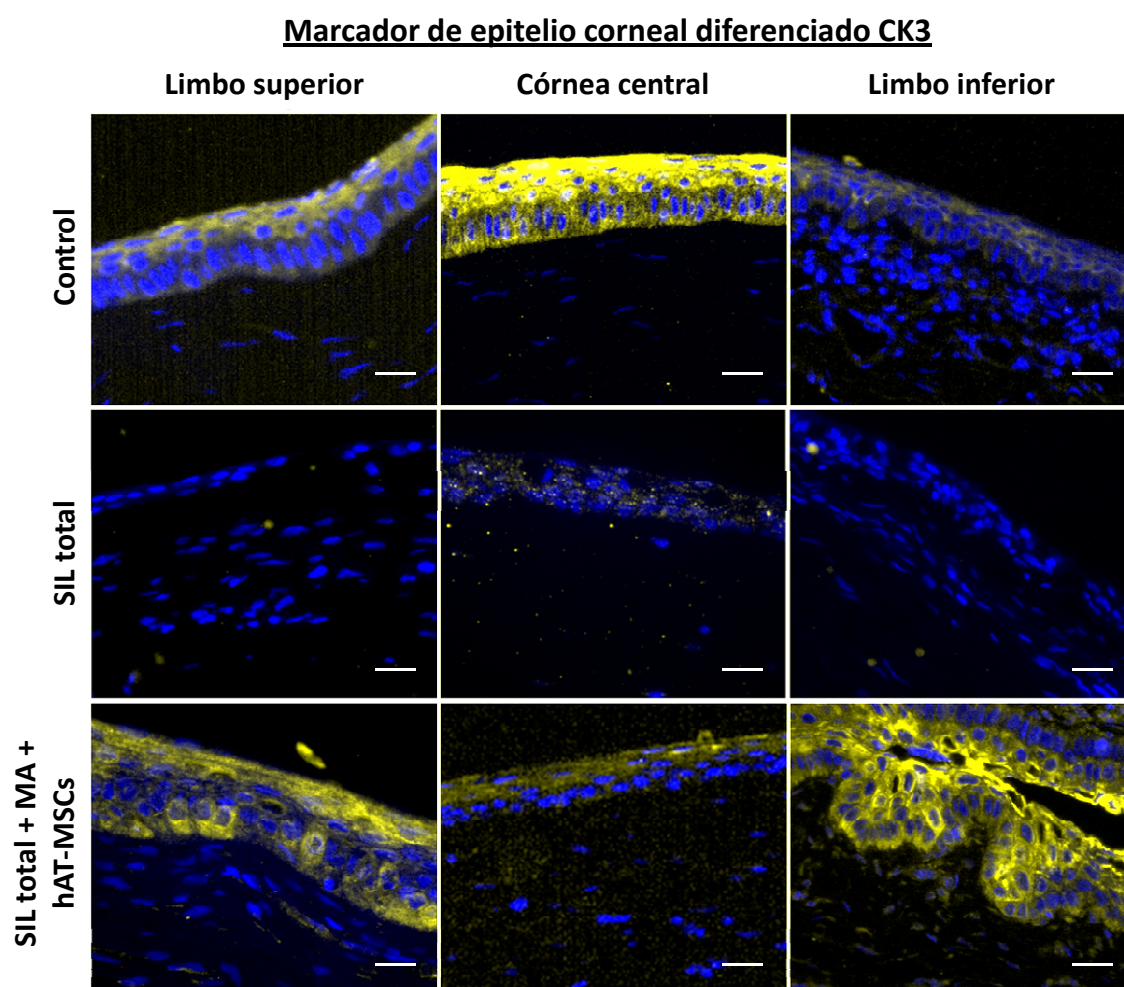


Figura 54. Análisis mediante inmunofluorescencia de la expresión del marcador de epitelio corneal diferenciado CK3 en córnea y limbo en el modelo de SIL total en conejo. En condiciones control (animales sanos), la proteína CK3 (fluorescencia amarilla) se expresó en el epitelio corneal y en las células más superficiales del epitelio limbar (superior e inferior). En el grupo con SIL sin tratamiento, no se observó expresión de la proteína CK3. En el grupo tratado con hAT-MSCs, la expresión de la CK3 se localizó en las capas más superficiales del epitelio corneal y de manera homogénea en el epitelio limbar. Núcleos celulares contrateñidos con el colorante Hoechst (fluorescencia azul). Imágenes representativas procedentes de 6 animales en cada grupo de estudio, excepto para el grupo de SIL total + MA + hAT-MSCs que estuvo formado por 5 animales. Escala de la barra: 100 μ m.

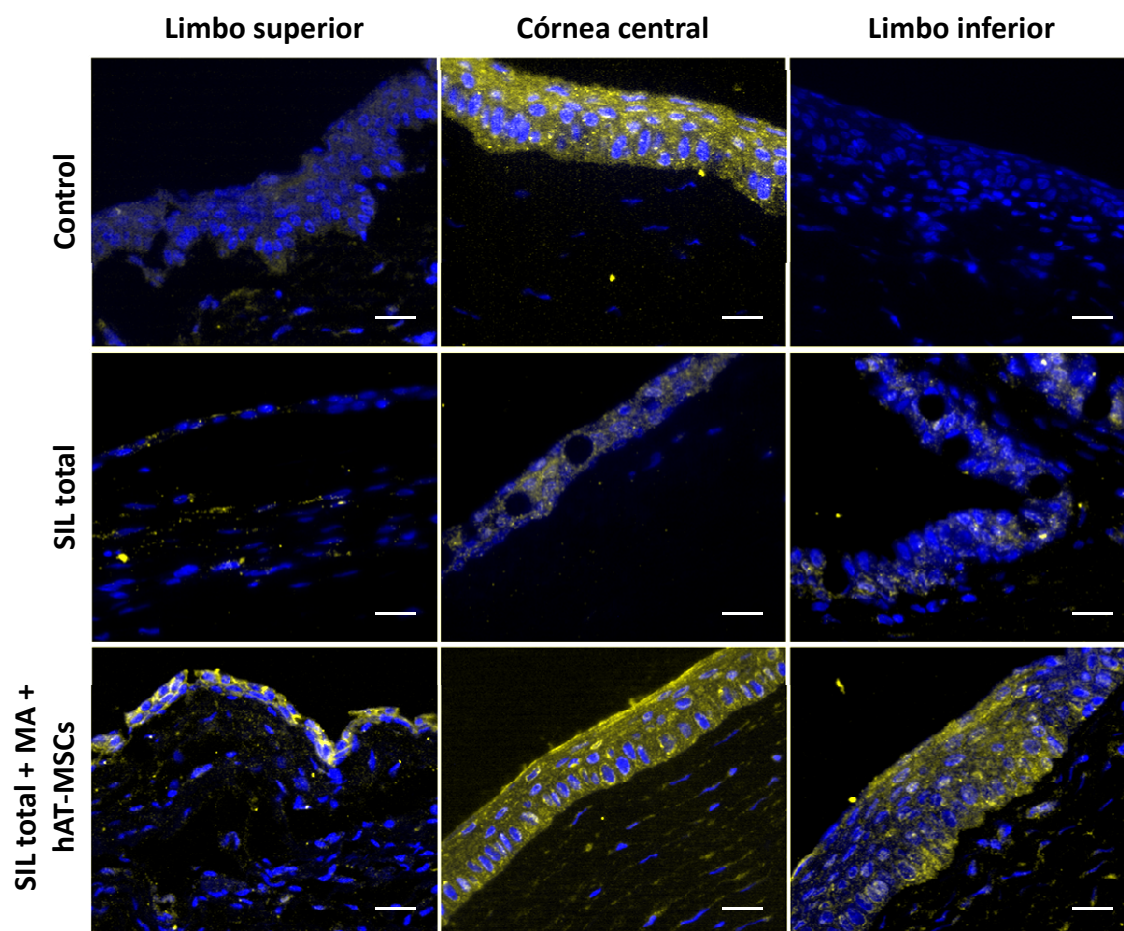
Marcador de epitelio corneal diferenciado E-cadherina

Figura 55. Análisis mediante inmunofluorescencia de la expresión del marcador de epitelio corneal diferenciado E-cadherina en córnea y limbo en el modelo de SIL total en conejo. En condiciones control (animales sanos), la proteína E-cadherina (fluorescencia amarilla) se expresó exclusivamente en el epitelio corneal. En el grupo de animales con SIL total sin tratamiento, la expresión de la proteína E-cadherina se vio disminuída en el epitelio corneal. En el grupo de animales trasplantados con hAT-MSCs en MA, la proteína E-cadherina presentó en la córnea unos niveles de expresión similares a los observados en el control sano. Además, en el grupo de animales tratados con hAT-MSCs, esta proteína se distribuyó tanto en el epitelio corneal como en el epitelio del limbo (superior e inferior). Núcleos celulares contrateñidos con el colorante Hoechst (fluorescencia azul). Imágenes representativas procedentes de 6 animales en cada grupo de estudio, excepto para el grupo de SIL total + MA + hAT-MSCs que estuvo formado por 5 animales. Escala de la barra: 100 μ m.

RESULTADOS

Se observó la expresión del marcador de células madre epiteliales limbares CK15 en las capas basales del epitelio limbar, tanto en el superior como en el inferior, de las muestras procedentes de animales sanos. En el grupo de animales con SIL total, no se observó la expresión de esta proteína. En cambio, en los animales tratados con hAT-MSCs, la proteína CK15 se expresó en el epitelio limbar (superior e inferior) y en el epitelio de la córnea central. Además, esta expresión no se distribuyó exclusivamente en las células de las capas más basales del epitelio, sino que también se observó en las capas más superficiales del mismo (Figura 56). En conjunto, la expresión de la proteína específica de células madre limbares CK15 se perdió en el grupo de animales con SIL total sin tratamiento y se recuperó parcialmente en los tejidos del grupo de animales trasplantados con hAT-MSCs sobre la superficie ocular.

Los cambios de expresión de la CK15 fueron similares en ambos modelos de SIL, parcial y total. En los animales no tratados, la expresión de la CK15 se perdió en las zonas que habían sido dañadas, limbo superior en el modelo de SIL parcial y limbo superior e inferior en el modelo de SIL total. Por otro lado, en ambos modelos, la CK15 recuperó niveles de expresión similares a los de los controles sanos en los animales tratados con hAT-MSCs (Figuras 46 y 56).

En los tejidos control procedentes de animales sanos, la expresión del factor de transcripción p63, marcador de células madre epiteliales limbares, se observó en los núcleos celulares de las células basales del epitelio limbar superior e inferior. En los animales con SIL total sin tratamiento, no se observó expresión de este factor de transcripción en ninguno de los tejidos estudiados. En cambio, en el grupo de animales tratados con hAT-MSCs, la expresión de p63 se recuperó en las células basales del epitelio limbar inferior, pero no en el epitelio del limbo superior de algunos de los animales estudiados (Figura 57). Es decir, los animales tratados con hAT-MSCs recuperaron parcialmente la expresión del factor de transcripción p63.

Los cambios de expresión del factor de transcripción p63 fueron similares en ambos modelos de SIL, parcial y total. En los animales no tratados, la expresión de p63 se perdió en las zonas que habían sido dañadas, limbo superior en el modelo de SIL parcial

y limbo superior e inferior en el modelo de SIL total. Por otro lado, en los animales tratados con hAT-MSCs, la expresión de p63 se recuperó en el limbo superior en el modelo de SIL parcial y en el limbo inferior en el modelo de SIL total (Figuras 47 y 57).

Marcador de células madre epiteliales limbares CK15

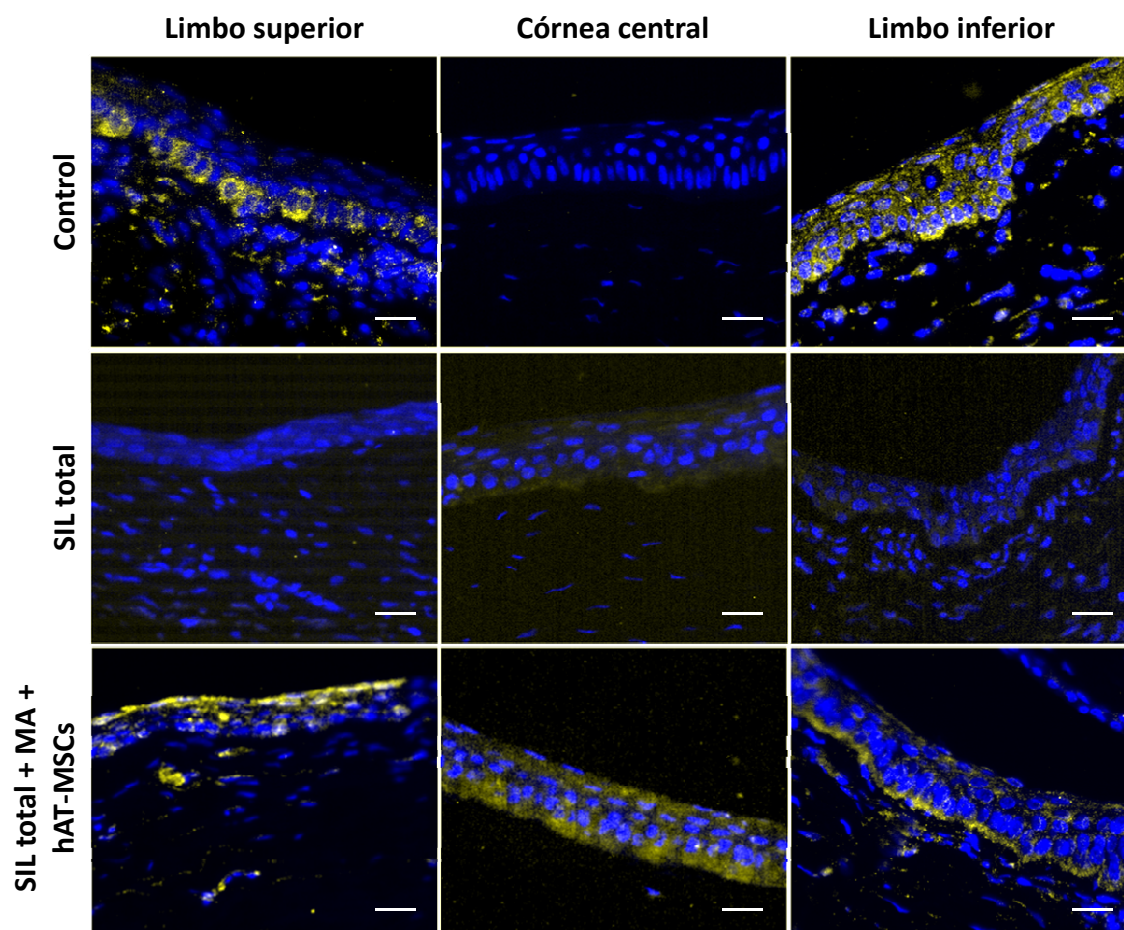


Figura 56. Análisis mediante inmunofluorescencia de la expresión del marcador de células madre epiteliales limbares CK15 en córnea y limbo en el modelo de SIL total en conejo. En condiciones control (animales sanos), la proteína CK15 (fluorescencia amarilla) se expresó exclusivamente en las células basales del epitelio limbar. En el grupo de animales con SIL sin tratamiento, la expresión de CK15 se perdió. En los animales tratados con hAT-MSCs, la proteína CK15 se expresó en el epitelio limbar (superior e inferior) y en el epitelio de la córnea central, distribuyéndose también en las capas más superficiales del epitelio. Núcleos celulares contrateñidos con el colorante Hoechst (fluorescencia azul). Imágenes representativas procedentes de 6 animales en cada grupo de estudio, excepto para el grupo de SIL total + MA + hAT-MSCs que estuvo formado por 5 animales. Escala de la barra: 100 μ m.

Marcador de células madre epiteliales limbares p63

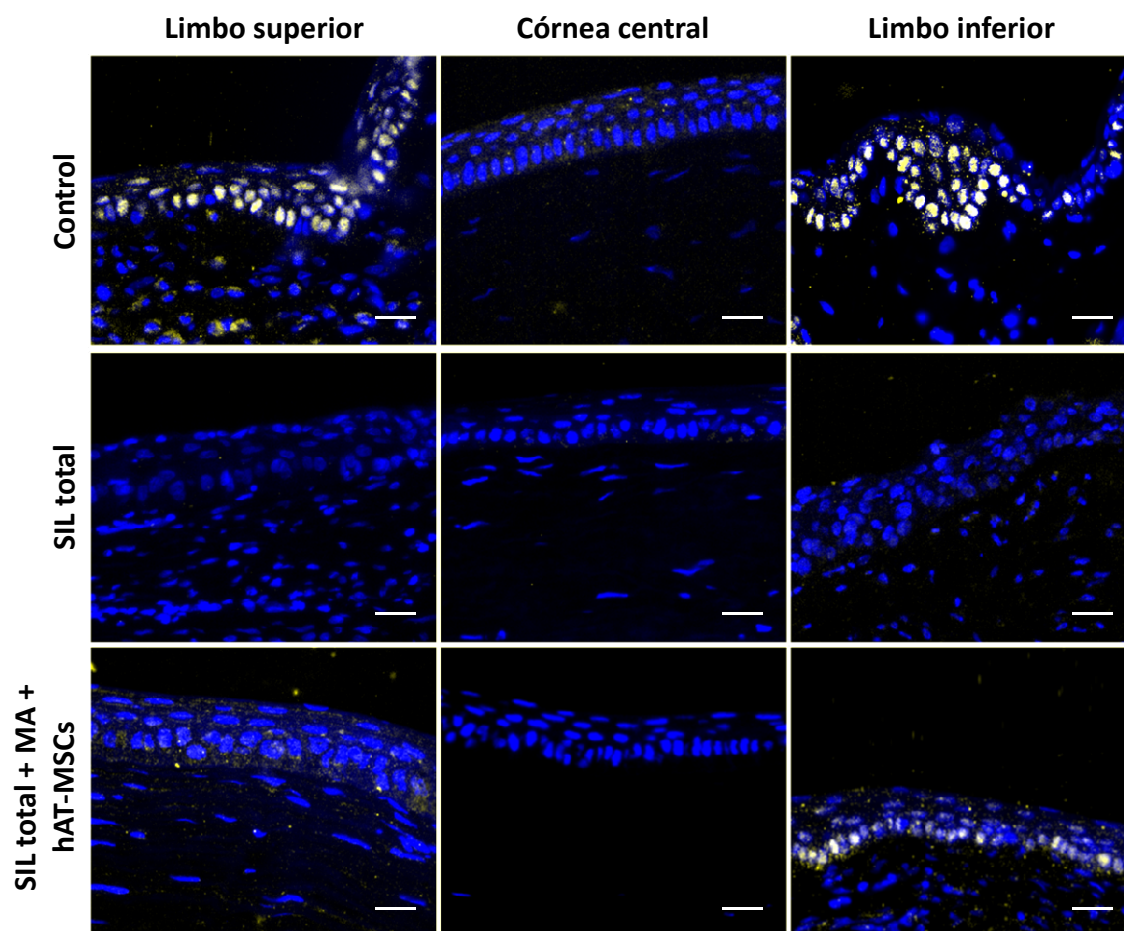


Figura 57. Análisis mediante inmunofluorescencia de la expresión del marcador de células madre epiteliales limbares p63 en córnea y limbo en el modelo de SIL total en conejo. En condiciones control (animales sanos), el factor de transcripción p63 (fluorescencia blanca debida a la co-localización de la fluorescencia azul y amarilla) se expresó exclusivamente en los núcleos de las células basales del epitelio limbar superior e inferior. En el grupo de animales con SIL sin tratamiento, la expresión de p63 se perdió. En el grupo tratado con hAT-MSCs, la expresión del p63 se observó en las células de las capas basales del limbo inferior, pero no en las del limbo superior. Núcleos celulares contrateñidos con el colorante Hoechst (fluorescencia azul). Imágenes representativas procedentes de 6 animales en cada grupo de estudio, excepto para el grupo de SIL total + MA + hAT-MSCs que estuvo formado por 5 animales. Escala de la barra: 100 μ m.

La expresión de la proteína de citoesqueleto CK7, característica de células conjuntivales secretoras, fue observada en las células epiteliales de la conjuntiva en el grupo control sano. En el epitelio corneal de los tejidos utilizados como controles sanos, no se observó expresión de la proteína CK7 y solamente alguna célula epitelial de la zona limbar expresó este marcador. Al igual que en el modelo de SIL parcial, en los tejidos procedentes del grupo de animales con SIL total, no se observó ningún cambio en la expresión de este marcador con respecto a los controles sanos, expresándose exclusivamente en el epitelio conjuntival y en alguna célula del epitelio limbar superior e inferior. En los grupos trasplantados con MA y hAT-MSCs, tampoco se observó ningún cambio en la expresión de la CK7 (Figura 58). Por otro lado, mediante la tinción con lectina se evidenció la presencia de mucinas en el interior de las células caliciformes de la conjuntiva. En las muestras control, obtenidas de animales sanos, se observó la presencia de células caliciformes únicamente en el epitelio de la conjuntiva. En los grupos de animales con SIL, tanto tratados como no tratados, se observó la presencia de células caliciformes teñidas por la lectina en el epitelio conjuntival y en el epitelio limbar, sin encontrar diferencias significativas entre los diferentes grupos de animales. Al igual que en el estudio histopatológico, en alguno de los animales que presentaban un SIL más grave, se observó la presencia de alguna célula caliciforme en la córnea central. Además, en estas muestras se constató una tinción difusa sobre la superficie del epitelio conjuntival y limbar, indicando la presencia de mucinas secretadas sobre la superficie de estos epitelios (Figura 58). Los resultados obtenidos con la lectina concuerdan con los obtenidos en el estudio histopatológico realizado mediante tinción con PAS, donde las células caliciformes se teñían en color púrpura (Figura 52).

Marcador de células epiteliales conjuntivales y de mucinas CK7/lectina

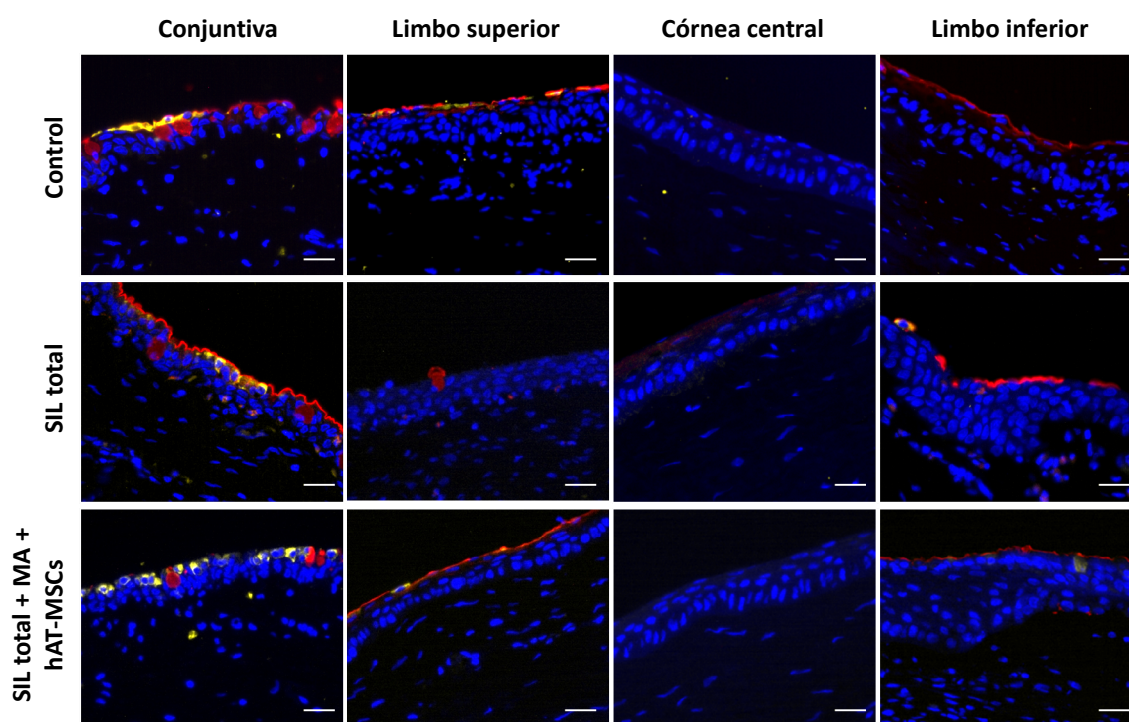


Figura 58. Análisis mediante inmunofluorescencia de la expresión de los marcadores de epitelio conjuntival CK7 y de mucinas (lectina) en córnea y limbo en el modelo de SIL total en conejo. En condiciones control (animales sanos), la proteína CK7 (fluorescencia amarilla) se expresó exclusivamente en conjuntiva y la lectina tiñó las mucinas (fluorescencia roja) presentes en las células caliciformes de la conjuntiva. Tanto en el grupo con SIL sin tratamiento como en el grupo con SIL trasplantado con MA y hAT-MSCs, la expresión de CK7 se mantuvo exclusivamente en conjuntiva. En los grupos de animales con SIL, tanto tratados como no tratados, se observó la presencia de células caliciformes teñidas por la lectina en el epitelio conjuntival y en el epitelio limbar, sin encontrar diferencias significativas entre los diferentes grupos de animales. Núcleos celulares contrateñidos con el colorante Hoechst (fluorescencia azul). Imágenes representativas procedentes de 6 animales en cada grupo de estudio, excepto para el grupo de SIL total + MA + hAT-MSCs que estuvo formado por 5 animales. Escala de la barra: 100 μ m.

Tabla 9. Expresión de los marcadores CK3, E-cadherina, CK15, p63 y CK7 en el modelo de SIL total en conejo. Cuantificación subjetiva utilizando la siguiente escala: - ausencia de expresión; + expresión baja; ++ expresión moderada; +++ expresión alta. LS: limbo superior, CC: córnea central, LI: limbo inferior, CJ: conjuntiva.

	Marcadores de epitelio corneal diferenciado						Marcadores de células madre epiteliales limbares						Marcador de epitelio conjuntival			
	CK3			E-cadherina			CK15			p63			CK7			
	LS	CC	LI	LS	CC	LI	LS	CC	LI	LS	CC	LI	CJ	LS	CC	LI
Control sano	+	+++	+	-	+++	-	+++	-	+++	+++	-	+++	+++	+	-	+
SIL total	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+++	+	-	+
SIL total + MA + hAT-MSCs	++	+	++	++	+++	++	+++	++	+++	-	-	++	+++	+	-	+

Con los resultados obtenidos en el modelo de SIL total se puede afirmar que las hAT-MSCs fueron bien toleradas tras su trasplante a la superficie ocular, frenando, además, el desarrollo de la neovascularización y de la opacidad corneal de forma significativa. Además, las hAT-MSCs migraron a las zonas inflamadas del estroma limbar, permanecieron allí durante al menos 8 semanas y favorecieron la recuperación parcial del fenotipo de la superficie ocular alterado por el SIL: se recuperó la expresión de los marcadores de epitelio corneal diferenciado CK3 y E-cadherina por parte de las células de la córnea central y la expresión de los marcadores de células madre epiteliales limbares CK15 y p63 por parte de las células basales del epitelio del limbo dañado (Tabla 9).

A modo de resumen, se puede concluir que el modelo de SIL parcial desarrollado fue un modelo mucho más leve que el modelo de SIL total, como indican tanto los datos clínicos como los datos moleculares. En este modelo, las hAT-MSCs trasplantadas fueron bien toleradas, mientras que en el modelo de SIL total se observó que los signos clínicos neovascularización y opacidad corneal se veían frenados tras el trasplante de hAT-MSCs. En ambos modelos, las hAT-MSCs fueron capaces de migrar hacia zonas inflamadas del estroma limbar y permanecer allí al menos 8 semanas. Además, a nivel molecular, en ambos modelos se evidenció una recuperación parcial del fenotipo corneal (CK3 y E-cadherina) y limbar (CK15 y p63). En el caso de los animales con SIL parcial tratados con hAT-MSCs la proteína CK3 se expresó en el epitelio corneal, mientras que en el modelo de SIL total trasplantado con hAT-MSCs la CK3 se expresó en el epitelio limbar y en las capas más superficiales del epitelio corneal. En los animales tratados con hAT-MSCs, en ambos modelos la E-cadherina se expresó en córnea y en limbo, con mayor expresión en el limbo del modelo de SIL total. En el caso de los marcadores de células madre epiteliales limbares CK15 y p63, su expresión fue recuperada tras el trasplante de hAT-MSCs en el epitelio limbar que había sido dañado, excepto en el limbo superior en algunos de los animales con SIL total trasplantados con hAT-MSCs.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Estudios *in vitro*

En el presente trabajo, se ha estudiado la capacidad que tienen las hAT-MSCs para adquirir un fenotipo similar al epitelial corneal y de regenerar el epitelio corneal dañado en un modelo animal de SIL.

En primer lugar, para estudiar la capacidad de las hAT-MSCs de adquirir *in vitro* un fenotipo similar al de las células epiteliales corneales, se recrearon algunas de las señales moleculares presentes típicamente en los microambientes corneal y limbar. Para ello, se cultivaron las hAT-MSCs sobre plástico o colágeno IV con MB condicionado con sobrenadantes recogidos del cultivo de células epiteliales corneales o de FL. El colágeno IV es uno de los principales componentes de la membrana basal del epitelio limbar, siendo mucho menos predominante en la membrana basal del epitelio de la córnea central.^{7,25-27} Para intentar simular las señales presentes en el microambiente del epitelio corneal *in vivo*, se utilizó la combinación de los sobrenadantes secretados por las células HCE y la ausencia de colágeno IV en el sustrato. Por otro lado, se recrearon ciertas características del microambiente del nicho limbar *in vivo* mediante la combinación de sobrenadantes secretados por los FL y la presencia de colágeno IV en el sustrato.^{161,174,175}

Ninguna de las condiciones de cultivo estudiadas afectó a la viabilidad de las hAT-MSCs. En cambio, el ciclo celular se vio influido en las células cultivadas bajo las condiciones de inducción de la diferenciación. Se observó un aumento en el número de células en estado quiescente dentro de la población celular y un consecuente descenso en el número de células en estado de proliferación. Estos datos se pueden relacionar con el efecto bien conocido de que el proceso de diferenciación celular suele ir acompañado de un descenso en la tasa de proliferación.¹⁷⁶

DISCUSIÓN

Las hAT-MSCs cultivadas con HCEcMB adquirieron una morfología más poligonal similar a la de las células epiteliales. En estas condiciones, se observó también un aumento de la complejidad celular y del contenido de gránulos citoplasmáticos. Estos datos se correlacionan con trabajos previos que describen un alto contenido de gránulos de glicógeno en las células epiteliales corneales.¹⁷⁷ Por lo tanto, las hAT-MSCs podrían adquirir ciertas características típicas de un fenotipo epitelial cuando son sometidas a un microambiente que contiene señales similares a las presentes en el microambiente del epitelio corneal.

Por otra parte, se observó que las células HCE expresaban los marcadores típicos de MSCs: CD73 y CD105. El CD73 (ecto-5'-nucleotidasa) se ha descrito expresado en diferentes tipos de células epiteliales.¹⁷⁸⁻¹⁸⁰ Sin embargo, esta es la primera vez que se ha identificado la expresión del CD105 (componente del receptor del TGF- β)⁹⁷ en células de linaje epitelial, lo que podría sugerir que esta molécula podría mediar la acción del factor TGF- β en las células epiteliales corneales.

El MFI del CD105 aumentó en las células cultivadas con HCEcMB, mientras que el MFI de los marcadores CD73 y CD90 no cambió de forma significativa. Estos resultados concuerdan con un trabajo previo en el cual cultivaban las hAT-MSCs con un medio condicionado con células del epitelio pigmentario de la retina para diferenciarlas hacia células epiteliales retinianas, las cuales mantenían la expresión de CD90.¹⁸¹ Por el contrario, otro grupo de investigación observó una disminución de la expresión de CD90 y un mantenimiento de los niveles de expresión de CD73 y CD105 en hAT-MSCs cultivadas con medio condicionado de células epiteliales de túbulo renal.¹⁸² En contraste con nuestros resultados, Ho *et al.*¹⁸³ observaron una disminución de la expresión del CD105 en las MSCs derivadas de grasa orbitaria cultivadas bajo condiciones inductoras de diferenciación hacia epitelio corneal. Estas diferencias entre ambos estudios pueden deberse a la diferente fuente de las MSCs estudiadas. La expresión del marcador CD105 en las HCE junto con el aumento del MFI del mismo en las hAT-MSCs cultivadas con HCEcMB sugieren que esta proteína podría ser un potencial marcador de diferenciación hacia epitelio corneal. Además, el TGF- β

secretado de forma natural por los fibroblastos y las células epiteliales corneales tiene una acción paracrina y/o autocrina y está implicado en el proceso de cicatrización de heridas corneales.¹⁸⁴ Todos estos datos sugieren que los cambios morfológicos y de expresión de marcadores de epitelio corneal observados en las hAT-MSCs podrían estar mediados por factores como el TGF- β . Esto es consistente con la conocida participación del TGF- β en procesos de inmunomodulación y de diferenciación, como la transición mesenquima-epitelio.^{147,185,186}

Se analizó la expresión de los marcadores específicos de epitelio corneal CK3 y CK12.⁴⁻⁶ Ambos marcadores se expresaron en bajos niveles en hAT-MSCs y FL cultivados bajo condiciones estándar. Estos datos están de acuerdo con las observaciones descritas por otros investigadores que afirman la expresión de CK3 y CK12 en BM-MSCs de conejo y en hAT-MSCs,^{87,150} y de otras citoqueratinas como la CK18 en hAT-MSCs.^{108,181,185}

Aunque el peso molecular de la proteína CK12 es 54 KDa, mediante *western-blotting* se detectó la CK12 en una banda de 108 KDa. Esto indica que la CK12 se encontraba en conformación de homodímero, fenómeno observado en aquellas queratinas que forman los filamentos intermedios.¹⁸⁷

Nuestros resultados mostraron que la proteína CK12 se expresó en todo el citoplasma de las hAT-MSCs cultivadas en condiciones estándar o crecidas en elevada confluencia con MB. Por otro lado, en las hAT-MSCs cultivadas con HCEcMB y FLcMB, la expresión de CK12 se localizó en áreas perinucleares. Este cambio de localización podría ser debido a un aumento de la síntesis de la proteína en el retículo endoplasmático,¹⁸⁸ como sugiere el incremento de la expresión proteica observado mediante *western-blotting*.

Los resultados obtenidos mostraron un aumento de la expresión de la CK12 en las hAT-MSCs cultivadas con HCEcMB en plástico mientras que la expresión de la CK3 no cambió de forma significativa. Ahmad *et al.*¹⁶¹ observaron un incremento de la expresión del ARNm de CK12 y CK3 en células madre embrionarias cultivadas con medio de cultivo específico para células epiteliales condicionado con FL. En esos experimentos, el

DISCUSIÓN

aumento de expresión de CK12 se produjo en una fase más precoz que el incremento de expresión de CK3. Si nuestros tiempos de incubación hubieran sido más prolongados, tal vez se habría observado también un aumento de los niveles de ARNm de CK3. Además, otros grupos de investigación observaron un aumento de expresión de los marcadores de epitelio corneal y la adquisición de un fenotipo similar al epitelial en células madre cultivadas con medios de cultivo condicionadas con FL.^{161,175} En nuestros experimentos, se evidenció que la expresión de marcadores de epitelio corneal fue mayor en las hAT-MSCs cultivadas con HCEcMB que en aquellas cultivadas con FLCMB. Ahmad *et al.*¹⁶¹ emplearon células madre embrionarias y Blazejewska *et al.*¹⁷⁵ utilizaron células madre de folículo piloso. Por lo tanto, estos tipos celulares parecen tener un comportamiento diferente al de las hAT-MSCs cuando son cultivadas bajo condiciones que simulan el microambiente del nicho limbar. De acuerdo con nuestros resultados, Notara *et al.*¹⁶⁵ observaron un aumento de CK12 en células madre embrionarias cultivadas sobre colágeno IV y con medio suplementado con EGF, mientras que no observaron este aumento de CK12 cuando cultivaron las células con medio condicionado con FL.

Nuestros resultados son acordes a los obtenidos por Jiang *et al.*,⁸¹ quienes, mediante la realización de co-cultivos de BM-MSCs con células estromales corneales, observaron que las BM-MSCs expresaban CK12 y adquirían un fenotipo similar al epitelial corneal. Igualmente, varios grupos de investigación han demostrado que las BM-MSCs o las MSCs de estroma limbar pueden adquirir un fenotipo similar al epitelial corneal cuando se cultivan con un medio para células madre limbares.^{141,142} De acuerdo con nuestros resultados, se ha descrito que las AT-MSCs de ratón pueden adquirir una morfología similar a la epitelial y expresar el marcador de epitelio corneal CK12 cuando son transfectadas con Pax-6.¹⁴³ En relación a esto, otros grupos de investigación observaron que las MSCs adquirirían un fenotipo similar al epitelial corneal cuando eran cultivadas en una córnea decelularizada¹⁴⁰ o trasplantadas sobre la superficie ocular de animales con córneas dañadas.^{75,83} En cambio, los estudios llevados a cabo por Ho *et al.*¹⁸³ mostraron que las MSCs derivadas de grasa subcutánea tenían menor capacidad para diferenciarse hacia un fenotipo epitelial corneal que las obtenidas a partir de grasa

orbitaria. Aunque sus resultados no son consistentes con los nuestros, las diferencias podrían explicarse por el hecho de que, en nuestro caso, las células se cultivaron durante más tiempo y a mayor confluencia, condición que se ha definido como un factor importante en la modulación de la diferenciación de las MSCs.¹⁶⁰ El aumento de expresión de CD105 y CK12, junto con la adquisición de una morfología más similar a la epitelial por parte de las hAT-MSCs cultivadas con HCEcMB sobre plástico, indican que las hAT-MSCs sometidas a señales similares a las presentes en el epitelio corneal pueden adquirir un fenotipo con características propias del epitelio corneal. Por otro lado, Vossmerbaeumer *et al.*¹⁸¹ diferenciaron hAT-MSCs en células de epitelio pigmentario de la retina con medio condicionado con estas mismas células.

Con estos resultados se ha demostrado de forma preliminar la capacidad de las hAT-MSCs extraoculares de adquirir características similares a las propias del fenotipo epitelial corneal cuando son sometidas a un microentorno con señales proporcionadas por un epitelio corneal diferenciado.

Estudios *ex vivo*

Para estudiar la capacidad de las hAT-MSCs de regenerar la superficie ocular dañada en un modelo animal, es necesario establecer previamente la dosis de hAT-MSCs más adecuada para su trasplante a la superficie ocular. Las dosis de MSCs aplicadas en los estudios preclínicos publicados varían mucho de unos trabajos a otros, dependiendo, además, de la vía de administración. Estas dosis celulares varían desde las 100.000 células hasta los 10.000.000 de células en una única administración. Las dosis más bajas suelen ser administradas sembradas sobre un sustrato, normalmente MA,^{80,145} o aplicadas de forma tópica sobre la superficie ocular,^{75,76} mientras que las dosis más altas son administradas mediante inyección intravenosa o intraperitoneal, principalmente.^{79,189,190} En nuestro caso, se eligió la administración de las células mediante su trasplante a la superficie ocular en MA por varias razones: Por un lado, la MA con células madre epiteliales limbares expandidas *in vitro* es el sistema de trasplante celular más utilizado actualmente en el tratamiento de SIL en la clínica

DISCUSIÓN

humana. Además, se trata de una administración local, por lo que de esta forma se asegura que las células se encuentran lo más cerca posible de la zona donde se quiere que lleven a cabo su acción terapéutica. Por otro lado, mediante el trasplante de las células sobre MA, se ponen en contacto las células con toda la superficie corneal y limbar, garantizando así que las células cubren toda la zona afectada por la enfermedad. Por último, hay datos que demuestran que la administración sistémica de MSCs puede conllevar la pérdida de células durante su migración hasta el tejido diana, acumulándose en algunos órganos, especialmente en el pulmón.¹⁹¹

Para el estudio de la dosis celular llevado a cabo en esta tesis, se utilizó un modelo de daño corneal en ojo de cerdo *ex vivo* desarrollado previamente por el grupo de la Prof. Julie T. Daniels.^{73,74} El modelo consiste en la realización de un daño epitelial que comprende la córnea y el limbo. Aunque el modelo había sido desarrollado tanto en ojo de conejo como de cerdo, en nuestro estudio se empleó el modelo desarrollado en cerdo ya que la córnea porcina guarda una mayor similitud con la córnea humana. Para abordar el estudio de las dosis de MSCs reflejadas en la bibliografía, se probaron diferentes cantidades de hAT-MSCs (250.000, 1.000.000 y 10.000.000) sembradas sobre MA y trasplantadas sobre el modelo de daño corneal *ex vivo*.

La córnea, en condiciones normales, se encuentra expuesta al exterior en contacto con el aire. Por lo tanto, los botones corneoesclerales trasplantados con diferentes dosis de hAT-MSCs se cultivaron en interfase aire-líquido para, por un lado, reproducir las condiciones naturales de la córnea y, por otro, favorecer la estratificación del epitelio corneal.¹⁹²

En contraposición a la estratificación descrita en la bibliografía,¹⁹² en las muestras mantenidas con epitelio durante 2 semanas en interfase aire-líquido, se observó una disminución en el número de capas de epitelio en comparación con las muestras control que fueron fijadas con epitelio en el momento de la obtención. Esta pérdida de células epiteliales se podría deber a que el tejido se encontraba en condiciones *ex vivo* y, por lo tanto, las células madre epiteliales limbares habrían perdido en gran medida la

capacidad de regenerar el epitelio corneal como lo harían durante la vida del animal. Además, al encontrarse en interfase aire-líquido, las células epiteliales estuvieron más expuestas a los factores adversos externos que si se hubieran mantenido sumergidas en el medio de cultivo. En un trabajo publicado recientemente, estudiaron el mantenimiento de córneas de conejo *ex vivo* en interfase aire-líquido comparando un sistema estático frente a un sistema en movimiento que permitía que las córneas estuvieran sumergidas en medio de cultivo de forma intermitente, simulando el parpadeo. En concordancia con nuestros resultados, observaron que en condiciones estáticas el número de capas de epitelio corneal disminuía de forma más acusada que cuando las muestras eran mantenidas en el sistema dinámico.¹⁹³

En un principio, para estudiar la reepitelización de los botones corneoesclerales del modelo *ex vivo* se levantaron las MA de la superficie ocular transcurridas 2 semanas desde el trasplante de las hAT-MSCs en MA. Se observó que las MA estaban muy adheridas a la superficie de las muestras y que costaba levantarlas de las mismas. En relación a esto, en las MA que habían sido levantadas de la superficie ocular de los botones corneoesclerales, se observó la presencia de células no marcadas con BrdU, provenientes del propio botón corneoescleral. Además, estas células no marcadas con BrdU fueron observadas tanto en las muestras que habían sido trasplantadas con MA sin células, como en las muestras trasplantadas con las diferentes dosis de hAT-MSCs. Estas células no marcadas podrían proceder de la proliferación de células madre epiteliales que no hubieran sido bien eliminadas del limbo al generar el daño corneal en los botones corneoesclerales.

Por otro lado, las células hAT-MSCs presentes en las MA levantadas presentaron un marcaje con BrdU diferente al habitual. Este marcaje no se localizó en los núcleos celulares, sino que en la mayoría de las células aparecía en el citoplasma. Se confirmó que este marcaje era específico mediante la utilización de controles negativos (omisión del anticuerpo primario e inmunofluorescencia de células no marcadas). Esta deslocalización del marcaje se pudo deber a que las células podrían haber incorporado la molécula de BrdU no solo en el núcleo, sino también en el ADN mitocondrial y de

DISCUSIÓN

esta manera pudo aparecer también marcado el citoplasma celular. Además, el escaso marcaje encontrado en los núcleos celulares podría deberse a una competencia directa o enmascaramiento de la tinción con el marcaje con yoduro de propidio (utilizado para marcar el ADN).

Se observó una escasa migración celular desde las MA a los botones corneoesclerales en el modelo de daño corneal *ex vivo*. Se ha descrito que las MSCs tienen la capacidad de migrar hacia las zonas lesionadas mediante la quimioatracción producida por las quimiocinas secretadas en los tejidos tras un daño.^{129,135} La causa de la baja migración pudo ser la ausencia de señales específicas para la migración de las MSCs. El daño en el epitelio corneal se realizó una vez que el tejido había sido extraído de los animales, por lo tanto, el tejido podría no haber secretado las señales específicas frente al daño generado. A pesar de ello, se observaron algunas, aunque muy pocas, hAT-MSCs en el estroma corneal, muy cercanas al epitelio.

Debido a que la mayoría de las células habían quedado adheridas en las MA, los datos obtenidos en cuanto a la recuperación del epitelio corneal (mediante tinción con fluoresceína y análisis histológico) no eran válidos. Dado que el proceso de levantamiento de la MA no se realizaría en un trasplante, ya que *in vivo* la MA sería reabsorbida en la superficie ocular, y para evitar que los resultados se vieran afectados por la metodología, se realizaron ensayos en los que no se levantó la MA de la superficie ocular.

Puesto que no se encontraron diferencias entre las distintas dosis celulares estudiadas en los ensayos en los que se levantó la MA y que el modelo *ex vivo* presentaba limitaciones, el experimento realizado sin levantar las MA se realizó solamente con la dosis celular de 250.000 hAT-MSCs. Se eligió esta dosis celular ya que era la dosis que estaba siendo utilizada en el ensayo clínico puesto en marcha a mediados de 2012 por nuestro grupo de trabajo, en colaboración con la Unidad de Producción Celular del IBGM de la Universidad de Valladolid, en el que se estaba comparando la eficacia del

trasplante alogénico de BM-MSCs frente al de células madre epiteliales limbares para el tratamiento del SIL (EudraCT: 2010-353520-42; ClinicalTrials.gov: NCT01562002).

Una vez realizado el estudio sin levantar las MA de la superficie de los botones corneoesclerales, se observó que el mantenimiento de la MA sobre la superficie protegía el epitelio formado. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre el número de capas de células epiteliales formadas cuando se trasplantó MA sin células o con 250.000 hAT-MSCs. La presencia de células epiteliales en los botones corneoesclerales trasplantados con MA sin células indicaba que las células que no habían sido bien eliminadas del epitelio durante la generación del daño habían podido proliferar y generar alguna capa de epitelio en la córnea. En los botones que habían sido trasplantados con 250.000 hAT-MSCs, se observaron células marcadas con BrdU en las capas de epitelio, pero no en el estroma corneal como se había visto en los botones en los que se había levantado la MA. Cabría haber esperado que una pequeña cantidad de hAT-MSCs también hubiera migrado hasta las zonas del estroma cercanas al epitelio en las muestras en las que no se levantaron las MA. Debido al bajo número de células que habrían migrado y a que los cortes histológicos de 4 μm son una representación muy escasa del tejido completo (córnea de 15 mm de diámetro), las células podrían no haber sido observadas en estos cortes a pesar de haber migrado hasta el estroma.

Deshpande *et al.*⁷³ observaron que las células madre epiteliales limbares sembradas sobre lentes de contacto y trasplantadas en un modelo de daño corneal *ex vivo* en conejo migraban a la superficie corneal transcurridos 3 días. Posteriormente, vieron que, además, las células estratificaban cuando el modelo se mantenía en cultivo en interfase aire-líquido. En nuestro caso, los botones corneoesclerales no se dejaron en cultivo tras levantar las MA y no se observó que las células que había sobre la superficie de la córnea hubieran estratificado. Para que esto hubiera sucedido, las hAT-MSCs trasplantadas tendrían que haberse diferenciado previamente a células epiteliales corneales. A pesar de que no se estudió la expresión de marcadores de epitelio corneal diferenciado en estos ensayos, es posible que las hAT-MSCs no se diferenciaron hacia epitelio corneal, ya que en las muestras en las que se levantaron las MA solo se

DISCUSIÓN

encontraron hAT-MSCs en algunas zonas del estroma cercanas al epitelio y en las MA, aunque éstas podrían haberse desprendido del epitelio. Igualmente, en los ensayos en los que no se levantaron las MA, se observó la presencia de hAT-MSCs en la superficie de la córnea junto con otras células no hAT-MSCs. En ambos casos, las hAT-MSCs presentaban una morfología fusiforme que distaba mucho de la epitelial. Por otro lado, en su estudio⁷³ observaron que en los casos en los que la adhesión celular al sustrato fuera muy estable o el cultivo celular se mantenía durante más de 1 día sobre el sustrato provocaba una baja migración celular a la superficie ocular, aunque no analizaron si quedaban o no células adheridas a las lentes de contacto tras retirarlas de la superficie ocular. En nuestro trabajo, se observó que gran parte de las células quedaban adheridas a las MA al ser éstas levantadas, por lo que se observaron grandes defectos epiteliales con las diferentes dosis celulares estudiadas. En este sentido, aunque el tiempo de cultivo previo al trasplante utilizado en nuestro trabajo fue de 1 día, la MA podría representar un sustrato al que las MSCs se adhieren firmemente y de forma estable, ya que posee una membrana basal muy rica en proteínas de adhesión tales como fibronectina, colágeno IV y laminina.¹⁹⁴ Por ello, y por la ausencia de señales que atrajeran a las MSCs hacia el tejido, es por lo que se podría haber observado una escasa migración de las células desde la MA hasta el tejido.

Por otro lado, en los trabajos de Notara *et al.*^{74,165} realizaron el trasplante de una monocapa celular. Posteriormente, dejaron que la monocapa estratificara durante los días posteriores hasta que se estableció un epitelio estratificado sobre la córnea del modelo *ex vivo*. Además, en estos trabajos, la monocapa celular había sido levantada de placas de cultivo de poliestireno y trasplantada sobre la superficie ocular sin un sustrato al que las células estuvieran íntimamente adheridas y que pudiera dificultar su migración. Para ello, se utilizaron láminas no adhesivas de Tegapore™. Tal vez, para el estudio de las diferentes dosis celulares hubiera sido más adecuado el empleo de una aproximación similar a la utilizada en este estudio para así facilitar la migración de las células hacia la superficie ocular del modelo *ex vivo*.

En otro trabajo llevado a cabo por el mismo grupo de investigación,¹⁹⁵ se estudió el trasplante de células madre epiteliales limbares sembradas sobre membranas de ácido poli-láctico-co-glicólico sobre el modelo *ex vivo* de conejo. En este caso, transcurridas 4 semanas desde el momento del trasplante, se observó que las células se encontraban en la superficie de la córnea. Además, no se levantaron las membranas de los botones corneoesclerales, por lo que se asemejaría a lo encontrado en la segunda aproximación de nuestro estudio, en la cual no se levantaron las MA de la superficie ocular. Además, compararon el mantenimiento del modelo de daño corneal *ex vivo* sumergido en medio de cultivo frente al cultivo en interfase aire-líquido y comprobaron que en las muestras mantenidas en interfase aire-líquido, las células aparecían más íntimamente adheridas a la membrana basal de la córnea.

Por otro lado, la menor migración celular observada en nuestro trabajo con respecto a otros estudios podría ser debida al tipo celular empleado. En los trabajos descritos anteriormente, las células trasplantadas fueron epiteliales corneales o células madre embrionarias diferenciadas a epitelio corneal, mientras que en nuestro estudio se trasplantaron hAT-MSCs. Para que se produzca la migración de las MSCs hacia el tejido dañado es necesaria la presencia de señales específicas, mientras que las células epiteliales corneales podrían tener afinidad por estos tejidos de forma natural para migrar y anclarse de forma específica a las proteínas expresadas por la membrana basal de la córnea.

La ausencia de resultados concluyentes puede ser debida a que el modelo de daño corneal *ex vivo* no es un buen modelo para el estudio de las diferentes dosis de hAT-MSCs. Las MSCs necesitan reconocer las quimiocinas producidas en la zona de lesión para migrar y llevar a cabo sus funciones reparadoras.^{129,135} Al tratarse de un tejido *ex vivo* que no pudo responder de forma natural al daño, las MSCs no recibieron las señales necesarias para migrar. Además, la MA pudo retener firmemente a las hAT-MSCs impidiéndolas migrar, lo que podría haberse evitado mediante la utilización de otro tipo de sustrato en el que no se produjera una adhesión tan estable o firme de las células.

Estudios *in vivo*

Para el estudio de tolerancia y eficacia del trasplante de hAT-MSCs sobre la superficie ocular fue necesario el desarrollo de un modelo experimental de SIL *in vivo*. El animal de elección para el desarrollo del modelo de SIL en el presente trabajo fue, en un primer momento, el cerdo ya que su ojo posee características muy similares al ojo humano y, además, posee un tamaño adecuado para la realización de las cirugías, la inducción del SIL y el trasplante de MA. Asimismo, la córnea porcina posee una estructura similar a la córnea humana, presentando membrana de Bowman, y se ha descrito recientemente que el limbo de cerdo está formado por estructuras similares a las empalizadas de Vogt del limbo humano.⁷⁴ Se han podido corroborar estos datos analizando la superficie ocular del cerdo mediante microscopía confocal e histología, donde se observó la presencia de estructuras en crestas y valles (epitelio-estroma) similares a las empalizadas de Vogt humanas.

El modelo de SIL desarrollado en cerdo mediante daño criogénico del limbo evolucionó adecuadamente y reprodujo los signos clínicos que caracterizan la enfermedad en humanos: neovascularización, opacidad corneal y defectos epiteliales. Además, estos signos clínicos se mantuvieron sin revertir de forma espontánea durante todo el periodo de seguimiento. Hasta el momento, no se ha descrito ningún modelo de SIL desarrollado en cerdo, por lo que cabe destacar que este sería el primer modelo que reproduce los signos clínicos típicos de la enfermedad en humanos. La elección del tipo de daño se realizó en base a que la lesión criogénica tiene la ventaja de ser una quemadura por frío, lo que permite inducir un modelo más estable y más fácilmente controlable que los modelos generados mediante quemadura química. No obstante, no se ha encontrado en la bibliografía ningún modelo de SIL desarrollado mediante dicha metodología, por lo que sería necesario realizar estudios comparativos de inducción de SIL mediante ambos tipos de quemadura para poder confirmar las ventajas de la quemadura criogénica frente a la quemadura química. En cuanto al seguimiento del modelo, no se utilizó una escala de valoración para evaluar los signos clínicos durante la evolución del modelo, aunque sí que se tomaron fotografías que reflejaban el progreso

de la enfermedad. Asimismo, se recogieron citologías de impresión corneal durante los días de revisión con el fin de estudiar la presencia de células caliciformes en el epitelio corneal. Esta técnica permitió observar la evolución del fenotipo epitelial que poseía la córnea pero, por otro lado, se trata de una técnica mediante la cual se desprenden células de la superficie corneal, lo que puede interferir en el proceso de reepitelización y, por lo tanto, en la evolución de la enfermedad. Al final del periodo de seguimiento, se realizó el estudio anatómico y estructural de la susuperficie ocular mediante microscopía laser confocal. Esta técnica permitió la realización de secciones ópticas finas que fueron desde las capas más superficiales del epitelio hasta las zonas más profundas del estroma, permitiendo así visualizar la estructura completa de la córnea y el limbo. La desventaja de esta técnica es que los tejidos se podrían haber visto alterados para el posterior análisis histológico, ya que desde la enucleación hasta la fijación transcurrieron aproximadamente unas 10 horas y, además, fueron sometidos a la presión que ejerce el cabezal del láser sobre la superficie ocular. Por todas las razones mencionadas, en los ensayos realizados en conejo no se utilizaron las técnicas de citología por impresión corneal ni de microscopía laser confocal.

Por otro lado, cuando en este modelo se trasplantaron MA sin células mediante sutura a la esclera, se desarrolló una reacción adversa muy severa que produjo un empeoramiento de los signos clínicos y de la inflamación en la superficie ocular. Esta reacción adversa pudo ser provocada por el traumatismo generado durante la cirugía, ya que durante el proceso de sutura, el cirujano tuvo grandes dificultades para pasar la aguja por la esclera debido a que estos animales poseen unos tejidos de gran consistencia y dureza que les confiere una enorme protección frente a agresiones externas y/o traumatismos. Debido a la reacción desarrollada tras el trasplante de la MA, este modelo tuvo que ser descartado para la realización de trasplantes mediante sutura quirúrgica sobre la superficie ocular. Aunque en el presente trabajo no se continuó con este modelo, puede considerarse un buen modelo de SIL para el estudio de las bases fisiopatológicas de la enfermedad y/o siempre que se utilice otro método de administración, ya sea el trasplante de células en un sustrato mediante el uso de pegamentos tisulares o la utilización de otras vías de administración como la

DISCUSIÓN

administración tópica, la inyección subconjuntival o, incluso, la inyección sistémica.^{75,190,196,197}

Una vez descartado el cerdo, el animal de elección para el desarrollo del modelo de SIL fue el conejo. Al igual que el cerdo, el conejo tiene un tamaño ocular adecuado para la realización de los procedimientos quirúrgicos. Por otro lado, la córnea de conejo tiene una relativa similitud con la córnea humana, aunque en menor medida que la córnea porcina, ya que posee la misma estructura histológica que la córnea humana, diferenciándose entre sí en las proporciones de las diferentes capas, y en que la capa de Bowman es rudimentaria en conejos.¹⁹⁸ Además, en comparación con el cerdo, el conejo es un animal de fácil manejo, estabulación y bajo coste. Otra importante razón por la que se eligió el conejo para llevar a cabo este trabajo fue que en la bibliografía actual el conejo es el modelo más utilizado para el desarrollo y el estudio del SIL.^{86-88,167}

Debido a que el desarrollo del modelo de SIL en conejo está muy bien definido en la bibliografía y a que uno de los modelos más representados se desarrolla mediante la eliminación del epitelio corneal por quemadura química, seguida de una limbectomía quirúrgica,^{86,87,199} este fue el procedimiento seleccionado para desarrollar el SIL en el conejo.

En el modelo de SIL parcial, desarrollado para testar la tolerancia y la eficacia preliminar de las hTA-MSCs trasplantadas sobre la superficie ocular, se realizó una limbectomía parcial que comprendía el limbo superior y temporal (de VII a I según los husos horarios). Se realizó la limbectomía parcial con el fin de desarrollar un modelo de SIL leve/moderado donde poder observar cualquier complicación o intolerancia tras el trasplante de las hAT-MSCs. Fueron seleccionadas las zonas superior y temporal como las zonas a dañar asumiendo que, como ocurre en el humano, el limbo superior contiene mayor cantidad de células madre que el resto de zonas limbares.^{200,201}

Durante las primeras semanas posteriores a la realización del daño, se desarrollaron de forma leve los signos clínicos que caracterizan la enfermedad en humanos (neovascularización, opacidad corneal y defectos epiteliales). Además, estos signos

clínicos se mantuvieron durante todo el periodo de seguimiento sin revertir de forma espontánea. Para evaluar los signos clínicos se utilizó una escala de valoración de 0 a 4 puntos de menor a mayor severidad, similar a las utilizadas en otros modelos de SIL descritos por numerosos grupos de investigación.^{81,82,146,147,167} Se observó que la neovascularización desarrollada en la córnea fue mayor en la zona superior de la misma, coincidiendo con la zona del daño limbar. Este dato podría apoyar la hipótesis asumida de que, al igual que en el limbo humano, la zona del limbo superior es la más rica en células madre epiteliales limbares y que el daño generado podría haber provocado que no se pudiera regenerar el epitelio corneal de forma normal, desencadenando la neovascularización de la zona. Por otro lado, se observó que durante las 2 semanas posteriores a la realización del daño, el defecto epitelial se recuperaba en gran medida, aunque se mantuvo sin llegar a cerrarse por completo durante todo el periodo de seguimiento. Estos datos se pueden relacionar con los obtenidos por el grupo de Chen *et al.*⁹¹ donde observaron que en 1-2 semanas se cerraban los defectos epiteliales creados en un modelo de SIL parcial en conejo desarrollado mediante limbectomía.

Una vez establecido el modelo de SIL parcial, se observó que los signos clínicos evolucionaban durante las primeras semanas y que a partir de la tercera semana estos se mantenían estables en el tiempo. Por ello, y apoyados en otros trabajos donde establecían la tercera semana como el momento del trasplante en modelos de SIL en conejo,¹⁷³ se decidió este tiempo como el momento para la aplicación del tratamiento. Según la bibliografía, el momento de la aplicación del tratamiento puede hacerse en la fase aguda de la enfermedad, cuando se aplica justo después de la inducción del modelo,^{78,146,148,199} o en la fase crónica, administrado en una etapa más estable de la enfermedad, como sería nuestro caso.^{83,87,173}

Se trasplantó MA sin células sobre la superficie ocular de 3 animales con SIL parcial con el fin de asegurar que en este modelo no se desarrollaba una importante reacción inflamatoria debido al proceso de sutura, como ocurrió en el modelo porcino de SIL. En este caso, la cirugía del trasplante no produjo ninguna reacción y los signos clínicos no

DISCUSIÓN

empeoraron después del trasplante de MA sin células. En comparación con el cerdo, el conejo posee una esclera menos dura, más fácilmente suturable y menos reactiva. Además, los signos clínicos en el grupo de animales trasplantados con MA no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo de animales con SIL parcial sin trasplante. En concordancia con nuestros resultados, existen varios trabajos en los que no encontraron diferencias entre los signos clínicos neovascularización, opacidad corneal y defecto epitelial del grupo de animales con SIL sin tratamiento y los del grupo de animales con SIL trasplantados con MA.^{80,87,167,202} Por el contrario, otras investigaciones señalan que el trasplante de MA sobre modelos de SIL desarrollados en conejo o rata acelera el proceso de reepitelización comparado con el grupo de animales con SIL sin trasplante.^{81,86,203} Las diferencias encontradas en estos trabajos en cuanto al efecto de la MA sobre la repitelización corneal podrían deberse a diversas variables ya que las especies animales empleadas, la forma de inducir el modelo de SIL, el momento de la realización del trasplante y los sistemas de valoración y análisis de los signos clínicos fueron diferentes. A pesar de que en humanos la MA favorece la epitelización corneal,⁴⁹ no se vio este efecto en el modelo de SIL parcial en conejo. El escaso número de animales utilizado en este grupo de estudio también podría ser la causa de no haber observado este efecto de la MA en el epitelio corneal de los conejos.

La MA se reabsorbió por completo entre la primera y la segunda semana de seguimiento. Por lo tanto, para asegurar la protección del trasplante frente al parpadeo las tarsorrafias fueron mantenidas durante 2 semanas. Como en nuestro caso, el grupo de Zhang *et al.*²⁰⁴ señaló que la mayoría de las MA se reabsorben por completo durante los 10 primeros días tras la realización del trasplante. En cambio, en otro trabajo,²⁰² describen que la MA se reabsorbe entre la segunda y la quinta semana post-trasplante. En este caso, la variabilidad en el tiempo de reabsorción de la MA podría deberse a que el modelo de SIL era muy inestable y variable ya que se indujo mediante quemadura química con NaOH.²⁰² Por otro lado, en el modelo porcino, la MA se reabsorbió por completo durante la primera semana tras el trasplante. En humanos, sin embargo, se ha descrito que la MA es reabsorbida por la superficie ocular entre la tercera y la quinta semana tras el trasplante, dependiendo de la patología subyacente.²⁰⁵ En la experiencia

clínica de nuestro grupo de trabajo, cuando la MA tiene células limbares se reabsorbe entre la primera y la octava semana (EudraCT: 2010-203535-42; ClinicalTrials.gov: NCT01562002).⁷¹

Con el fin de obtener unos datos más precisos y objetivos, en el modelo de SIL total se mejoró el sistema de evaluación incluyendo la valoración de otros signos clínicos que no habían sido medidos en el modelo de SIL parcial, como la invasión del tejido conjuntival y la longitud de la misma y de los vasos sanguíneos hacia el centro corneal. Además, la córnea fue dividida en 5 áreas y se valoraron los signos clínicos en cada una de las áreas por separado, de manera que se obtuvieran datos más objetivos y representativos. Se introdujo la medida de la longitud de los vasos sanguíneos que estaban penetrando hacia el centro corneal. Este signo clínico, además, fue valorado mediante dos escalas diferentes, en mm y con la escala Efron. La escala Efron es la utilizada en la práctica clínica diaria, de esta manera se pudieron tener datos similares a los que se obtienen en la clínica humana. Por otro lado, se introdujo la valoración de la penetración del tejido conjuntival hacia la córnea, ya que en el modelo de SIL total se comenzó a observar como este tejido penetraba hacia la córnea en alguno de los animales. Este signo clínico fue valorado en función del área que el tejido conjuntival ocupaba sobre la córnea y, además, según la longitud del tejido que estaba penetrando hacia el centro corneal. En el modelo de SIL total también se incluyeron modificaciones a la hora de valorar el defecto epitelial. Durante la toma de fotografías de la superficie ocular teñida con fluoresceína sódica se comenzó a utilizar un filtro amarillo de 515 nm con el fin de mejorar la visualización de la fluoresceína, la cual emite a una longitud de onda de 520 nm. Por último, para evitar la formación de arcos de cuerda del hilo de sutura sobre la superficie ocular, en el modelo de SIL total la sutura realizada para el trasplante de la MA fue mediante puntos sueltos, a diferencia del modelo de SIL parcial donde la sutura realizada fue continua. Además, con el fin de proteger y favorecer el buen estado de la superficie ocular en el modelo de SIL total, se retiraron los puntos de sutura una vez reabsorbida la MA (transcurridas 2 semanas desde la realización del trasplante) mientras que en el modelo de SIL parcial los puntos no fueron retirados tras la reabsorción de la MA. La presencia de las suturas durante todo el periodo de

DISCUSIÓN

seguimiento en el modelo de SIL parcial podría haber empeorado el estado de la superficie ocular de los animales, aumentando la neovascularización.²⁰⁶ Además, en el modelo parcial, el hilo de la sutura continua generaba arcos de cuerda que pudieron rozar sobre los tejidos de manera reiterada, lo que también podría haber producido un empeoramiento del estado de la superficie ocular en el modelo de SIL parcial. A pesar de ello, en los animales con SIL parcial trasplantados con MA sin o con hAT-MSCs, no se observó un aumento en la severidad de los signos clínicos. En el modelo porcino de SIL, la sutura realizada fue continua y aunque en este caso la sutura se retiró transcurrida 1 semana desde el momento de la realización del trasplante, los arcos de cuerda formados sobre la superficie ocular podrían haber contribuido a la reacción inflamatoria generada tras el trasplante de la MA.

En el caso del modelo de SIL total desarrollado en conejo, se observó el desarrollo de los signos clínicos neovascularización y opacidad corneal durante las primeras semanas de seguimiento aunque, cómo era de esperar, de forma más severa que en el modelo parcial de SIL. Estos datos apoyan lo encontrado en la bibliografía, donde observan la aparición de neovascularización transcurrida 1 semana desde la inducción del SIL,⁸⁸ incluso en modelos que utilizan una metodología diferente a la nuestra para la creación de la lesión, como son la quemadura química^{77,146,147,207-209} o la queratectomía.²¹⁰ Concretamente, en el trabajo de Ono *et al.*²¹⁰ observaron que transcurrida 1 semana desde la creación de la lesión, la neovascularización y la opacidad corneal tenían una severidad de aproximadamente 1,5 puntos, mientras que en nuestro modelo la severidad alcanzada durante la primera semana fue inferior a 1 punto. Se ha de tener en cuenta que tanto el modelo de SIL como las escalas de valoración utilizadas son diferentes y que, en nuestro caso, se realizaron las medidas mediante la valoración independiente de 5 áreas de la córnea. Por otro lado, en el modelo de SIL total los signos clínicos se mantuvieron a lo largo de todo el periodo de seguimiento sin revertir de forma espontánea. A diferencia de lo observado en el modelo de SIL parcial, en el modelo de SIL total, la neovascularización se desarrolló por toda la superficie ocular, sin aparecer con mayor tendencia o mayor severidad en una zona concreta. Debido a que en este caso la limbectomía fue total (360° del limbo), todas las áreas de la córnea

fueron afectadas en igual medida. De manera similar a lo observado en el modelo de SIL parcial, el defecto epitelial se recuperó en gran proporción durante las 2 semanas siguientes a la realización de la lesión, pero se mantuvo sin cerrar por completo durante todo el periodo de seguimiento. En algunos trabajos llevados a cabo por otros grupos de investigación, también se ha observado una gran recuperación del defecto epitelial durante las 2 primeras semanas después de la creación de la lesión, pero sin llegarse a reepitelizar por completo.^{167,203,204} Por otro lado, en 2 de los 6 conejos en los que se desarrolló el SIL total, se produjo una invasión del tejido conjuntival hacia el centro corneal, signo que no fue observado en el modelo de SIL parcial. Este dato corroboró que el modelo de SIL total desarrollado fue más severo que el modelo de SIL parcial. Además, con estos resultados se pudo confirmar que, en condiciones normales, el limbo actúa de barrera física entre la conjuntiva y la córnea, impidiendo la invasión del tejido conjuntival sobre la córnea, función que se ve afectada en casos de SIL graves.

En el grupo de animales con SIL parcial trasplantados con hAT-MSCs, no se observaron diferencias en la evolución de los signos clínicos con respecto al grupo de animales con SIL parcial sin tratamiento. La ausencia de resultados que apunten a que el tratamiento es eficaz podría deberse a la levedad del modelo desarrollado, ya que se partió de unos valores muy bajos para los signos clínicos estudiados, lo que dificultó observar una mejora significativa en los mismos. Del mismo modo, tampoco se observó una reacción de intolerancia o empeoramiento de los signos clínicos tras el trasplante de las hAT-MSCs, por lo que con este modelo de SIL parcial y leve, se pudo demostrar que las hAT-MSCs son bien toleradas cuando son trasplantadas sobre la superficie ocular. Ha de tenerse en cuenta que las células trasplantadas sobre la superficie ocular de los conejos fueron de origen humano. Gracias a la baja inmunogenicidad que poseen,¹²¹ las hAT-MSCs fueron bien toleradas sin necesidad de inmunosuprimir a los conejos, incluso aunque se realizó un trasplante xenogénico. Se realizó este tipo de trasplante ya que de cara a la traslación clínica, es necesario realizar los ensayos preclínicos en animales con las mismas células que posteriormente se quieren llevar al ensayo clínico 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

DISCUSIÓN

han observado que las MSCs humanas no produjeron reacción de rechazo inmune cuando fueron trasplantadas sobre la superficie ocular de ratones,⁷⁵ ratas^{76,80,82} y conejos^{78,151} sin inmunosuprimir.

A diferencia de lo observado en el modelo de SIL parcial, en el modelo de SIL total se observó que la evolución de los signos clínicos neovascularización y opacidad corneal se veía frenada tras el trasplante de hAT-MSCs con respecto al grupo de animales con SIL total sin tratamiento, donde los signos clínicos neovascularización y opacidad corneal continuaron aumentando a lo largo del periodo de seguimiento. A pesar de que las MSCs tienen un papel proangiogénico en muchos tejidos, existen diversos trabajos de investigación en los cuales se ha observado una disminución de la neovascularización tras el tratamiento con MSCs en diferentes modelos de SIL o de quemadura corneal. En concreto, se ha demostrado que las hAT-MSCs trasplantadas en lentes de contacto esclerales sobre la superficie ocular de un modelo de SIL desarrollado mediante quemadura química en conejos disminuyen la neovascularización y la opacidad corneal.¹⁵¹ Igualmente, en un modelo de quemadura corneal en conejo, se ha visto que las AT-MSCs administradas en la superficie ocular mediante la combinación de tres vías: aplicación tópica, en bolsillo estromal e inyección subconjuntival, atenúan la neovascularización y la opacidad corneal.²⁰⁹ Por otro lado, en un modelo de SIL desarrollado en conejo, se ha descrito que las BM-MSCs de conejo poseen una mayor capacidad que las AT-MSCs de conejo para reducir la neovascularización y la opacidad corneal cuando son trasplantadas sobre la superficie ocular en membranas de ácido poliláctico.²¹¹ Además, existen numerosos trabajos en los que tras la administración de BM-MSCs o MSCs de estroma limbar, se advirtió una disminución de la neovascularización acompañada de una disminución de la opacidad corneal, como ocurrió en nuestro estudio.^{80-82,144-147,197,212} En casos en los que solo se ha estudiado uno de estos dos signos clínicos, y no conjuntamente, se ha descrito la disminución de la neovascularización^{77,148} o de la opacidad corneal^{79,190,213} tras la administración de MSCs. Estos datos parecen indicar que los signos clínicos neovascularización y opacidad corneal podrían tener una evolución íntimamente relacionada. Por otro lado, no se observaron diferencias en cuanto al defecto epitelial entre el grupo de animales con SIL

total tratado con hAT-MSCs y el grupo de animales con SIL total sin tratamiento. En ambos casos, el defecto epitelial se mantuvo sin cerrar por completo durante todo el periodo de seguimiento. En cambio, a diferencia de lo observado en nuestro estudio, existen datos que apoyan la recuperación de los defectos epiteliales tras el tratamiento con MSCs en modelos animales de SIL o de quemadura corneal.^{77,81,145,197,211,213} Concretamente, las hAT-MSCs han demostrado contribuir a la regeneración del epitelio corneal en varios modelos experimentales de quemadura corneal e incluso en un paciente con úlceras corneales recurrentes.^{75,76,78,151,152,209,214,215} A pesar de no haber encontrado diferencias significativas, el defecto epitelial fue algo mayor en el grupo de animales sin tratamiento que en el grupo de animales tratados con hAT-MSCs. Por ello, y dado que la variabilidad entre animales fue grande, si se hubiera aumentado el número de conejos en los grupos de estudio, tal vez se podría haber observado una recuperación significativa del epitelio corneal tras el trasplante de hAT-MSCs.

Mediante histopatología, se observó que en el modelo de SIL parcial el número de capas de epitelio en córnea y limbo no disminuyó con respecto al grupo de animales sanos. En cambio, en el modelo de SIL total, este número de capas de células epiteliales disminuyó en los animales sin tratamiento con respecto a los animales sanos. Por otro lado, en los tejidos del modelo de SIL parcial se observó la presencia de células inflamatorias en el limbo superior (dañado) e inferior (no dañado). Aunque la zona de limbo inferior no se había dañado mediante limbectomía quirúrgica, sí que se eliminó el epitelio de esta zona con n-heptanol. Por lo tanto, la inflamación pudo ser desarrollada en el limbo inferior como consecuencia del contacto con el n-heptanol. En el caso del modelo de SIL total la presencia de células inflamatorias fue mayor en comparación con el SIL parcial y se distribuyó tanto en córnea como en limbo superior e inferior. Además, en el modelo de SIL total el estroma corneal apareció más desestructurado que en el modelo de SIL parcial. Con todos estos datos, se pudo comprobar que el modelo de SIL total se desarrolló de forma más severa que el modelo de SIL parcial confirmando los resultados obtenidos en la evaluación clínica. En el caso del modelo de SIL parcial no se observaron diferencias a nivel histológico entre los grupos de animales estudiados. Esta ausencia de diferencias podría deberse a que la inflamación desarrollada en el modelo

DISCUSIÓN

de SIL parcial fue demasiado leve como para observar una mejoría sin cuantificar el número de células inflamatorias. En cambio, en el modelo de SIL total se observó una disminución de la inflamación y una recuperación en la estructura estromal en los animales que fueron tratados con hAT-MSCs. En diversos trabajos, se ha descrito el papel antiinflamatorio que tienen las hAT-MSCs en la superficie ocular. Zeppieri *et al.*⁷⁶ observaron una disminución de la inflamación corneal en un modelo de quemadura corneal en rata tras la aplicación tópica de hAT-MSCs. Lin *et al.*⁷⁵ demostraron que se producía una disminución de la infiltración de macrófagos en la córnea cuando las ratas con quemadura corneal eran tratadas con MSCs de grasa orbitaria. Espandar *et al.*¹⁵¹ observaron una disminución de la inflamación y de la desorganización de las fibras de colágeno del estroma corneal cuando se trasplantaron hAT-MSCs en lentes de contacto sobre la superficie ocular de un modelo de SIL inducido mediante quemadura química en conejo. El trabajo de tesis llevado a cabo por del Hierro *et al.*²¹⁴ también demostró que las hAT-MSCs tienen capacidad antiinflamatoria al ser aplicadas sobre un modelo de SIL desarrollado mediante quemadura química en conejo. También se ha descrito el papel antiinflamatorio de MSCs procedentes de otros tejidos. Concretamente, Holan *et al.*²¹¹ han demostrado que las BM-MSCs de conejo tienen una mayor capacidad antiinflamatoria que las AT-MSCs de conejo al ser trasplantadas en membranas de ácido poliláctico sobre la superficie ocular de un modelo de SIL. Además, diversos autores han observado una disminución de la inflamación en el estroma corneal y/o de la desorganización de las fibras de colágeno tras la administración de BM-MSCs, tanto en modelos de quemadura química en rata,^{77,216} como en modelos de SIL desarrollados en rata^{80,81,147,190} y conejo.^{148,217} Además, un reciente estudio llevado a cabo por Acar *et al.*¹⁹⁷ ha demostrado que las MSCs obtenidas de estroma limbar pueden disminuir la inflamación en un modelo de quemadura corneal en rata.

Con todos estos resultados, se puede decir que las MSCs juegan un papel antiinflamatorio en la superficie ocular dañada. Además, se sabe que algunas de las moléculas implicadas en las propiedades antiinflamatorias de las MSCs son la IL-10 y el TGF- β . Por otro lado, se ha descrito la participación del TSG-6 como una de las proteínas antiinflamatorias secretada por las MSCs ante un daño tisular. Esta proteína

actúa a nivel de córnea disminuyendo la infiltración de neutrófilos y reduciendo la secreción de citoquinas proinflamatorias y de quimiocinas.^{190,216,218}

Por otro lado, en ambos modelos de SIL, parcial y total, se observó que aparecían algunas células caliciformes en el epitelio del limbo, tanto en el superior, como en el inferior. En el modelo de SIL parcial no se observó la presencia de células caliciformes en el epitelio corneal, mientras que en el modelo de SIL total solamente se observaron células caliciformes en el centro corneal en los 3 conejos en los que el tejido conjuntival había invadido la córnea, 2 de los cuales pertenecían al grupo sin tratamiento, mientras que el otro había sido tratado con hAT-MSCs. Por lo tanto, en general, no se observó la presencia de células caliciformes en el epitelio corneal, salvo que el tejido conjuntival hubiera invadido por completo la córnea. En relación a esto, ha sido publicado que en quemaduras corneales puede no observarse la aparición de células caliciformes en la córnea,⁴⁰ lo que explicaría la ausencia de células caliciformes en el modelo de SIL en conejo, ya que durante la inducción del modelo se realizó una quemadura del epitelio corneal y limbar. Por otra parte, se ha descrito que las células caliciformes que migran en un primer momento desde la conjuntiva hacia el epitelio corneal en modelos experimentales desarrollados en conejos acaban desapareciendo de la superficie de la córnea al cabo de unas pocas semanas.^{87,214,219,220} En el caso del modelo porcino de SIL, aunque en las citologías de impresión corneal recogidas durante las primeras revisiones se observaron gran cantidad de células caliciformes, a lo largo del tiempo de seguimiento la presencia de las mismas fue disminuyendo, aunque sin desaparecer por completo como se observó en la histología a tiempo final. A pesar de ello, en todo momento se observaron mayor cantidad de células caliciformes en el modelo porcino que en los modelos desarrollados en conejo.

En cuanto a la migración de las células, en el presente trabajo se ha observado la migración de las hAT-MSCs desde las MA trasplantadas sobre la superficie ocular hasta el estroma del limbo. Las zonas donde se observó la presencia de las hAT-MSCs coincidían con las áreas con mayor cantidad de células inflamatorias. En ambos modelos de SIL, parcial y total, en conejo se detectó la presencia de hAT-MSCs tanto en

DISCUSIÓN

el estroma del limbo superior como en el estroma del limbo inferior transcurridas 8 semanas desde el momento del trasplante. La capacidad de migración de las MSCs hacia tejidos dañados o inflamados ha sido descrita y comprobada en modelos experimentales de SIL. Dos grupos de investigación vieron que las hAT-MSCs y las MSCs de grasa orbitaria administradas tópicamente en modelos de quemadura corneal migraban hasta el epitelio y el estroma de la córnea y el limbo.^{75,76} De acuerdo con nuestros resultados, varios trabajos han demostrado que las BM-MSCs administradas de forma tópica o sistémica migraban hacia el estroma de la córnea y el limbo dañados.^{146,147,213,217} En cambio, otros grupos de investigación observaron que las BM-MSCs y las MSCs de estroma limbar administradas por diferentes vías migraban hasta el epitelio corneal, pero no hasta el estroma como se evidenció en nuestro estudio.^{80,83,197,214} Las diferencias con respecto al sitio de localización de las MSCs entre estos trabajos y el nuestro se podrían deber a que tanto el tipo celular administrado como las especies animales utilizadas y la metodología empleada para la realización del daño fueron diferentes. Además, en estos casos, el tiempo de seguimiento también fue menor al tiempo de seguimiento estudiado en nuestro modelo y, tal vez, las MSCs podrían haber continuado migrando hasta el estroma si se hubieran realizado seguimientos a más largo plazo. Existen también trabajos en los que se ha observado que las MSCs, tanto adiposas como de médula ósea, administradas mediante inyección subconjuntival, se acumulaban en el sitio de inyección y no migraban hacia los tejidos dañados o solo migraba una pequeña cantidad de células hacia el epitelio corneal.^{75,77,214} Por último, en otro modelo de SIL en rata, se ha observado que las MSCs inyectadas intraperitoneales o sistémicamente no migran hacia la córnea, sino que llevan a cabo su acción terapéutica desde la distancia.¹⁹⁰

Una de las rutas de señalización más conocidas por las que se sabe que está regulado el mecanismo de migración y *homing* de las MSCs es la mediada por la quimiocina CXCL12 o SDF-1 y su receptor CXCR4.^{191,215} Se ha descrito que las MSCs expresan CXCR4 y que, gracias a ello, son capaces de migrar desde sus nichos sanos hacia los tejidos dañados, donde hay niveles elevados de CXCL12/SDF-1.²²¹ Además, se ha demostrado que en el epitelio del limbo humano sano se expresa significativamente más CXCL12/SDF-1 que

en el epitelio de la córnea humana sana y que en el estroma del limbo se expresa más CXCR4 que en el estroma de la córnea.^{222,223} Por otro lado, se sabe que en situaciones de inflamación, los tejidos expresan mayor cantidad de CXCL12/SDF-1.²²¹ Aunque no se poseen datos de lo que ocurre con la expresión de estas proteínas a nivel de córnea y limbo en los modelos experimentales de SIL, la expresión de CXCL12/SDF-1 podría estar elevada en el estroma limbar dañado y ser la responsable de la migración de las hAT-MSCs hacia el mismo.

Mediante inmunofluorescencia se estudiaron los cambios producidos a nivel molecular en los modelos de SIL parcial y total desarrollados en conejo. En el caso del marcador de epitelio corneal diferenciado CK3, en los animales con SIL parcial sin tratar su expresión aumentó en el epitelio del limbo, tanto superior como inferior, pero no se vio afectada en la córnea central. Esto podría deberse a que las células madre epiteliales limbares residentes, células no dañadas en el limbo inferior y células remanentes tras el daño en el limbo superior, se estuvieran diferenciando y migrando desde el limbo hacia la córnea central para reepitelizarla. Por el contrario, en el caso del modelo de SIL total, la expresión del marcador de epitelio corneal diferenciado CK3 se perdió tanto en el epitelio corneal como en las capas más superficiales del epitelio limbar en los animales con SIL no tratados. De acuerdo con estos resultados, en los modelos de SIL desarrollados en rata y en conejo por varios grupos de investigación se observó una disminución de la expresión de los marcadores CK3/12 en el epitelio corneal.^{82,167,204,224} También ha sido descrita la disminución de la expresión de CK3 en modelos de SIL desarrollados en cabra.^{225,226} Además, esta alteración en la expresión de las CK ya había sido previamente descrita en el epitelio corneal en diferentes enfermedades como síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide cicatricial o quemaduras químicas.²²⁷ La pérdida de este marcador estaría confirmando que el SIL conlleva la pérdida del fenotipo de epitelio corneal como se ha visto en otro trabajo en el que estudian la afectación de la expresión de diferentes marcadores en un modelo de SIL total en conejo desarrollado de forma similar al nuestro.²²⁸

DISCUSIÓN

En el grupo de animales con SIL parcial trasplantados con MA no se observaron grandes cambios en la expresión de los marcadores con respecto al grupo con SIL sin tratamiento. Solamente se observó una disminución de la expresión del marcador de células epiteliales corneales diferenciadas CK3 en córnea central. De acuerdo con este resultado, Reinshager *et al.*⁸⁷ observaron una disminución de la expresión de CK3 en el epitelio corneal tras el trasplante de MA sin células sobre la superficie ocular de conejos con SIL. Por otro lado, Jiang *et al.*⁸¹ no observaron cambios en la expresión de la CK12 entre el grupo de animales con SIL y el grupo de animales con SIL trasplantados con MA sin células, en ambos casos no se observó expresión de CK12. A diferencia de nuestros resultados, en otros trabajos se vio una recuperación parcial de la expresión de las proteínas CK3, CK3/12 y p63 en los animales con SIL trasplantados solo con MA con respecto a los animales con SIL no trasplantados.^{82,167} Las diferencias encontradas podrían deberse a que en los ensayos en los que se recuperó el fenotipo corneal la MA no había sido previamente desepitelizada mientras que sí que se desepitelizó tanto en nuestros estudios como en los trabajos de Reinshager *et al.* y Jiang *et al.* Por lo tanto, las células de la propia MA podrían estar jugando un papel regenerador en la superficie corneal.

Aunque no se observaron diferencias entre los grupos de estudio (tratados y sin tratar) del modelo de SIL parcial en cuanto a signos clínicos e histopatología, sí que se encontraron diferencias a nivel molecular de los marcadores de epitelio corneal diferenciado y de células madre epiteliales limbares. De modo similar, otros dos grupos de investigación han descrito la ausencia de diferencias a nivel clínico en modelos experimentales de SIL trasplantados con BM-MSCs,^{83,87} a pesar de que en ambos trabajos sí que encontraron diferencias a nivel molecular tras el trasplante de BM-MSCs. En los animales con SIL parcial tratados con hAT-MSCs el marcador de células epiteliales corneales diferenciadas CK3 recuperó los niveles de expresión que mostraba en los animales sanos, expresándose en córnea central y solo en las capas más superficiales de epitelio limbar. Las hAT-MSCs podrían haber ayudado a las células madre residentes a recuperar el fenotipo más rápidamente que en ausencia de estas. Además, en los animales con SIL total trasplantados con hAT-MSCs se observó que el

marcador de epitelio corneal diferenciado se expresaba en el epitelio corneal y limbar, de forma similar a cómo se expresaba en los animales con SIL parcial sin tratamiento. Estos datos podrían estar indicando una recuperación del fenotipo corneal a partir de las células madre limbares remanentes que no habrían sido eliminadas por completo del nicho limbar. Las hAT-MSCs podrían estar llevando a cabo un papel regenerador mediante la secreción de moléculas con efecto trófico sobre las células madre limbares, promoviendo su proliferación y diferenciación hacia epitelio corneal para reparar los defectos epiteliales y recuperar el fenotipo epitelial corneal. En relación con nuestros resultados, varios grupos de investigación han observado que tras la administración sistémica o el trasplante de BM-MSCs sobre la superficie ocular en modelos animales de SIL o de quemadura corneal se recuperaba la expresión de CK3 y/o CK12 en el epitelio corneal.^{81,82,87,144,215} Lin *et al.*⁷⁵ vieron que algunas de las MSCs de grasa orbitaria administradas tópicamente se encontraban en el limbo y la córnea y expresaban CK3. Gu *et al.*⁸³ demostraron que las BM-MSCs trasplantadas en matrices de fibrina migraban hasta el epitelio corneal y expresaban CK3. Por el contrario, del Hierro *et al.*²¹⁴ observaron expresión de CK3 solo en 2 de los 8 ojos tratados con hAT-MSCs en un modelo de SIL desarrollado en conejos mediante quemadura química y Ma *et al.*⁸⁰ no observaron expresión de CK3 o panCK en el epitelio corneal de las ratas trasplantadas con BM-MSCs en MA.

En el caso de la proteína de unión intercelular E-cadherina, su expresión no se vio modificada en los animales con SIL parcial no tratados, pero sí que se vio disminuída en el epitelio corneal de los animales con SIL total sin tratamiento. Estos resultados sugieren que las uniones intercelulares del epitelio corneal estaban debilitadas en el modelo de SIL total debido a la pérdida del fenotipo epitelial corneal, pero no en el modelo de SIL parcial. De acuerdo con nuestros resultados, se ha descrito la disminución de la expresión de E-cadherina en ratones transgénicos con defectos en el desarrollo del epitelio corneal.²²⁹

En el caso de los animales con SIL parcial tratados con hAT-MSCs, la expresión de la E-cadherina se vio levemente aumentada en el epitelio limbar. En los animales con SIL

DISCUSIÓN

total tratados con hAT-MSCs, la expresión de E-cadherina no solo aumentó en el epitelio corneal, sino también en el limbar. Las células madre limbares remanentes que no hubieran sido eliminadas por completo del nicho limbar se podrían estar diferenciando a epitelio corneal desde el limbo hacia la córnea central, reforzando las uniones intercelulares que le confieren la alta impermeabilidad que caracteriza al epitelio corneal. Del mismo modo, las hAT-MSCs trasplantadas podrían estar contribuyendo a la creación de un ambiente propicio para que las células madre limbares puedan llevar a cabo su función de regeneración del epitelio corneal. Estos resultados están en concordancia con los encontrados en otro trabajo donde observaron un aumento de la proteína intercelular conexina 43, propia de las uniones comunicantes de tipo gap, en el epitelio corneal tras el trasplante de BM-MSCs en un modelo de SIL en conejo.⁸⁷

La expresión de los marcadores de células madre limbares CK15 y p63 se perdió en el limbo superior (limbo dañado) en los animales con SIL parcial sin tratamiento y tanto en el limbo superior como en el limbo inferior en los animales con SIL total no tratados. Estos resultados confirmaron la eliminación de la mayor parte de las células madre limbares de las zonas dañadas mediante la limbectomía quirúrgica. En varias publicaciones se ha demostrado la pérdida de los marcadores de células madre limbares cuando se desarrollaron modelos experimentales de SIL, tanto en conejo como en cabra.^{82,89,225} Por otro lado, en los animales con SIL parcial sin tratamiento, la expresión de la CK15 aumentó en las capas superiores del epitelio del limbo inferior. Este hecho se podría deber a que las células madre limbares residentes en el epitelio del limbo inferior estuvieran proliferando y diferenciándose hacia células epiteliales corneales para regenerar el epitelio corneal dañado. Por ello, las células que se encontraban en las capas superiores del epitelio limbar inferior presentaron un fenotipo intermedio entre células madre limbares (expresaron CK15) y células de epitelio corneal diferenciado (expresaron CK3). Estas células podrían ser células amplificadas transitorias que se estuvieran diferenciando y migrando desde el limbo hacia el centro corneal.

La expresión de CK15 y p63 se recuperó en el limbo superior (área dañada) en los animales con SIL parcial trasplantados con hAT-MSCs y parcialmente en las capas basales del epitelio limbar de los animales con SIL total tratados con hAT-MSCs. Las hAT-MSCs podrían estar desempeñando un papel protector para las células madre limbares remanentes que no habrían sido eliminadas por completo del nicho limbar, ayudándolas en su supervivencia, proliferación y función, mediante la creación de un ambiente más propicio por medio de la secreción de factores paracrinos.³⁴ Estos factores podrían estar favoreciendo la proliferación y la autorrenovación de las células madre limbares y, por lo tanto, estarían aumentando el número de células madre limbares en las capas basales del limbo, para posteriormente poder llevar a cabo su función de regeneración del epitelio corneal. Además, las células presentes en el epitelio limbar expresaban también el marcador de epitelio corneal diferenciado CK3, por lo que podrían ser células amplificadas transitorias con un fenotipo intermedio entre célula madre y célula diferenciada. En concordancia con estos resultados, en varios trabajos se ha descrito un aumento de la expresión de p63 en el epitelio limbar en modelos experimentales de SIL tras la administración de BM-MSCs.^{82,146,215} Por el contrario, el grupo de Reinshagen *et al.*⁸⁷ no observó diferencias en cuanto a la expresión del p63 en el epitelio limbar tras el trasplante de BM-MSCs.

El marcador de células secretoras de epitelio conjuntival CK7 no sufrió ningún cambio de expresión en los grupos de animales con SIL parcial y total sin tratamiento. Al igual que en los animales sanos, su expresión se mantuvo en algunas células del epitelio conjuntival y, en menor proporción, en el epitelio limbar. Por el contrario, en algunos modelos de SIL se describe el aumento de expresión de los marcadores de células epiteliales conjuntivales CK4^{85,167} y CK13⁸¹ en el epitelio corneal. A pesar de que la CK4 ha sido definida como marcador de células epiteliales conjuntivales,³⁵ se ha visto que este marcador se expresa en las capas más superficiales del epitelio corneal en conejos, por lo que no es un buen marcador de epitelio conjuntival.¹⁷³ Además, la proteína analizada (CK7) en el presente trabajo es un marcador de células secretoras, por lo que queda evidenciado que las células secretoras de la conjuntiva no se vieron afectadas por el desarrollo del SIL. En el caso de la tinción con lectina, la cual marcó las mucinas

DISCUSIÓN

presentes en las células caliciformes, se observó que en los animales con SIL parcial y total sin tratar aparecían células caliciformes en el epitelio limbar, así como una tinción difusa sobre la superficie del epitelio conjuntival y limbar que indicaba la presencia de mucinas secretadas sobre la superficie de estos epitelios. Además, en los conejos que presentaron el SIL total más grave, se observó la presencia de células caliciformes teñidas con lectina en el epitelio corneal, tal y como se había visto previamente mediante tinción con PAS.

Por último, no se observaron diferencias en la expresión del marcador de células epiteliales secretoras de la conjuntiva CK7 entre los diferentes grupos de estudio. En todos los casos, la proteína CK7 se expresó en algunas células del epitelio conjuntival y en menor proporción en el epitelio limbar. Por ello, se puede afirmar el trasplante de las hAT-MSCs no modificó la expresión de dicho marcador en la superficie ocular. En el caso de la tinción con lectina, no se vieron diferencias entre los diferentes grupos de estudio, observándose células caliciformes en el epitelio del limbo y una tinción difusa sobre el epitelio limbal y conjuntival debida a las mucinas secretadas sobre la superficie de los mismos. Tomando en conjunto estos resultados, junto con los obtenidos mediante histología, se puede afirmar que la presencia de células caliciformes en córnea central fue muy baja en ambos modelos de SIL en conejo. Como ya se ha señalado anteriormente, esta ausencia de células caliciformes podría deberse a que durante la inducción del modelo se realizó una quemadura del epitelio corneal⁴⁰ o a que células caliciformes que hubieran migrado en un primer momento desde la conjuntiva hacia el epitelio corneal acabaran desapareciendo de la superficie de la córnea al cabo de unas pocas semanas.^{87,214,219,220}

Aunque algunos autores atribuyen a las MSCs la capacidad de transdiferenciación hacia epitelio corneal,^{75,81-83,87} solamente dos trabajos han demostrado que las células MSCs que habían sido administradas *in vivo* expresaban el marcador CK3 una vez que habían migrado hasta el epitelio corneal.^{75,83} Ha de tenerse en cuenta que nuestro grupo de investigación y otros grupos han descrito que las MSCs cultivadas en condiciones estándar expresan el marcador CK3 *in vitro*.^{87,150} Por lo tanto, puede que la expresión

de CK3 por parte de las MSCs en el epitelio corneal de los modelos *in vivo* no esté indicando una transdiferenciación real. Por otro lado, los resultados obtenidos durante la fase *in vitro* de este trabajo demuestran que las hAT-MSCs pueden adquirir ciertas características similares a las del epitelio corneal. Aunque en la fase *in vivo* de este trabajo no se ha demostrado que las hAT-MSCs se estén transdiferenciando hacia epitelio corneal, sí que se ha visto que contribuyen a su regeneración. Estos datos podrían sugerir que la expresión de los marcadores de epitelio corneal por parte de las hAT-MSCs podría estar implicada en el papel regenerador que tienen estas células sobre la superficie ocular. Conjuntamente, los resultados obtenidos en el presente trabajo y los obtenidos por otros autores parecen indicar que la acción de las MSCs en la recuperación del epitelio corneal se basa en la secreción de moléculas que actúan a nivel paracrino disminuyendo la neovascularización, la inflamación^{77,80,147} y proporcionando un ambiente propicio para la proliferación y supervivencia de las células madre residentes en los tejidos.^{230,231} Aunque ya había sido previamente demostrada la capacidad de las hAT-MSCs extraoculares de migrar hasta tejidos de la superficie ocular y de disminuir la neovascularización, la opacidad corneal y la inflamación en la misma,^{76,151,214} es la primera vez que se demuestra que estas células pueden contribuir a recuperar el fenotipo corneal y limbar.

En conjunto, el trabajo que ha dado lugar a esta tesis doctoral ha abierto la puerta a una nueva terapia para el tratamiento del fracaso de la superficie ocular por deficiencia de células madre epiteliales limbares. Las hAT-MSCs representan una fuente de células madre eficiente, cuya disponibilidad y accesibilidad no ofrece limitaciones y cuyas propiedades inmunomoduladoras y regeneradoras permitirán, no solo escapar de la inmunoreacción inducida por el alotrasplante, sino también obtener beneficios directos que incrementarían las posibilidades terapéuticas y disminuirían sustancialmente los costes sanitarios.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Las células madre mesenquimales de tejido adiposo humano (hAT-MSCs) son capaces de adquirir características similares a las propias del fenotipo epitelial corneal cuando son sometidas a un microentorno con señales proporcionadas por un epitelio corneal diferenciado.
2. El modelo de daño corneal *ex vivo* no es un modelo útil para estudiar la dosis celular más adecuada con la que realizar un trasplante a la superficie ocular. Para abordar este tipo de estudios, es necesario realizar ensayos de dosis-respuesta en modelos animales en los que los tejidos vivos puedan responder, tanto al daño generado, como al tratamiento recibido.
3. El modelo porcino de síndrome de insuficiencia límbica (SIL) es un buen modelo para estudiar las bases fisiopatológicas y moleculares de la enfermedad, ya que reproduce de manera fehaciente las características del SIL en humanos. Sin embargo, no es un buen modelo en el que poder ensayar nuevas terapias que requieran el uso de sutura quirúrgica.
4. Los modelos de SIL parcial y total desarrollados en conejo reproducen los grados progresivos de severidad que se presentan en la patología en humanos. Estos modelos son adecuados para el estudio de nuevas terapias para el tratamiento del SIL antes de ser consideradas para su traslación a la clínica humana.
5. Las hAT-MSCs trasplantadas sobre la superficie ocular de un modelo experimental de fracaso de la superficie ocular por deficiencia de células madre de limbo (o SIL) son bien toleradas, migran hacia los tejidos inflamados, frenan la evolución de la neovascularización y de la opacidad corneal, ejercen un efecto antiinflamatorio y contribuyen a la recuperación del fenotipo epitelial corneal y limbar.
6. Finalmente, los resultados de esta tesis doctoral permiten proponer el trasplante de hAT-MSCs como una nueva terapia celular para el tratamiento del fracaso de la superficie ocular por deficiencia de células madre epiteliales limbares en humanos.

CONCLUSIONES

Esto es debido a que estas células representan una fuente alternativa de células madre cuya disponibilidad y accesibilidad no ofrece limitaciones y cuyas propiedades inmunomoduladoras y regeneradoras permitirían, no solo escapar de la inmunoreacción inducida por el alotrasplante, sino también obtener beneficios directos que incrementarían las posibilidades terapéuticas y disminuirían sustancialmente los costes sanitarios.

LIMITACIONES DEL TRABAJO

El presente trabajo tiene una serie de limitaciones que han de tenerse en cuenta a la hora de valorar las conclusiones obtenidas.

En primer lugar, el estudio *in vitro* llevado a cabo para analizar la capacidad de diferenciación de las hAT-MSCs hacia células epiteliales corneales, como cualquier experimento realizado *in vitro*, simplifica el nivel de complejidad que tendría un tejido completo o, incluso, un individuo. Como consecuencia, se impide el análisis de las interacciones entre los diferentes tipos celulares y moléculas presentes en el organismo vivo y reduce el posible estudio de las respuestas producidas frente a determinados estímulos. En concreto, en este estudio se intentaron reproducir algunas de las señales presentes en el microambiente de la córnea y el limbo. Para ello, se utilizaron dos sustratos diferentes y los factores secretados por dos tipos celulares presentes en la córnea y el limbo. A pesar de ello, la aproximación *in vitro* está siempre alejada de la verdadera complejidad que presenta el microambiente *in vivo* de la córnea y el limbo.

Por otro lado, el modelo de daño corneal en ojo de cerdo *ex vivo* también resultó ser un modelo alejado del comportamiento *in vivo*. Al tratarse de un tejido *ex vivo*, la respuesta generada frente al daño no fue tal y como se produciría en un tejido vivo. Por lo tanto, no se pudo observar migración de las hAT-MSCs hacia los tejidos dañados, ya que no se activaron los procesos de quimiotaxis. Además, el procedimiento técnico de levantar la MA realizado en el modelo *ex vivo* no fue el adecuado ya que modificó los resultados de recuperación del epitelio corneal.

Durante el estudio *in vivo* se utilizaron exclusivamente hAT-MSCs procedentes de un único donante. Se procedió de esta forma para evitar la variabilidad entre células procedentes de diferentes donantes que podrían dispersar los resultados pero, en consecuencia, las conclusiones no podrán ser completamente extrapolables a células de otros donantes. Lo ideal hubiera sido haber realizado el estudio con una mezcla de células procedente de varios donantes diferentes. De esta forma se habría eliminado la

LIMITACIONES DEL TRABAJO Y FUTURAS INVESTIGACIONES

variabilidad entre donantes y los datos habrían sido representativos de células procedentes de varios donantes.

También existen limitaciones en los modelos *in vivo* desarrollados. El desarrollo de la enfermedad puede variar de unas especies a otras, por lo que no puede ser del todo extrapolable al humano. Además, se encontró una elevada variabilidad biológica entre animales, lo que hace necesario aumentar considerablemente el número de animales por grupo para poder obtener datos con significación estadística. En este trabajo ha de tenerse en cuenta que el número de animales estudiado por grupo ha sido bajo. Por último, las escalas de valoración utilizadas en la evaluación de los signos clínicos en los modelos *in vivo* fueron subjetivas y, por ello, menos precisas, ya que no reflejaron pequeñas variaciones producidas en los signos clínicos.

FUTURAS INVESTIGACIONES

El proyecto intramural “BioScaff-EYE” del Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), en el que participó el IOBA junto con otros 5 grupos de investigación para el desarrollo de “bionichos” de células madre para la reconstrucción de la superficie ocular, fue transferido a la industria mediante un contrato de investigación y licencia con la empresa Ferrer Internacional S.A. en octubre de 2012. Bajo el amparo de este contrato, se está trabajando para diseñar, desarrollar y explotar productos de terapias avanzadas basados en el uso de células madre y biomateriales para la regeneración de la superficie ocular. Los conocimientos generados en la presente tesis doctoral, así como los modelos de SIL desarrollados están sirviendo de base para el abordaje de los nuevos objetivos planteados en este proyecto.

Asimismo, y al haber logrado resultados positivos en el ensayo clínico en humanos en el que se trasplantaron BM-MSCs frente a células epiteliales limbares (EudraCT: 2010-203535-42; ClinicalTrials.gov: NCT01562002), se planteará en el futuro la puesta en marcha de un ensayo clínico que enfrente ambos tipos celulares, BM-MSCs y hAT-MSCs.

LIMITACIONES DEL TRABAJO Y FUTURAS INVESTIGACIONES

Esto será posible tras la demostración en esta tesis de su buena tolerancia y eficacia a nivel preclínico.

ENGLISH SUMMARY

INTRODUCTION AND JUSTIFICATION

Corneal transparency and visual function are dependent upon the integrity of the outermost epithelial layer that is maintained and continuously renewed by a population of stem cells. These stem cells are located in the basal epithelium of the circular transitional zone between the cornea and conjunctiva-sclera known as the sclero-corneal limbus.^{7,11,12,14} The limbus provides a unique local microenvironment niche in which limbal epithelial stem cells are surrounded by an extracellular matrix containing other non-stem cells. The microenvironment provides the cues or signals required to maintain the limbal epithelial stem cell phenotype.^{7,12,13} Dysfunction of limbal epithelial stem cells (LSCD) or of the limbal niche can occur as a consequence of a multitude of conditions, e.g., chemical or thermal burns, radiation, cicatrizing-autoimmune pathologies, trauma, infections etc. This usually results in chronic pain, persistent ocular surface inflammation, corneal opacity, and blindness.^{36,37}

In cases of unilateral ocular trauma or disease, transplantation of autologous limbal epithelial stem cells extracted from the limbal niche of the contralateral, unaffected healthy eye and expanded *in vitro* is the technique of choice so far.^{59,67-69} In case of bilateral disease, which is actually more frequent, the recovery of a limbal biopsy is not possible due to the lack of healthy tissue. The use of deceased donor tissue in these cases transforms an autologous transplant into an allogenic one. To avoid immune rejection, allogenic transplantations require long-term systemic immunosuppression that subsequently increases the potential morbidity and health costs.⁵⁵ The ideal solution for bilateral diseases would be to maintain transplants of autologous origin by using an extraocular source of stem cells or stem cells that do not trigger the immune system.

In recent years, mesenchymal stem cells (MSCs) have emerged as a major form of cell therapy. MSCs are pluripotent and, under the appropriate conditions, have the capacity to differentiate into mesodermal and non-mesodermal cell lineages.^{135,136,232}

INTRODUCTION AND JUSTIFICATION

The MSCs have immunomodulatory properties. They can act as immunosuppressive cells by inhibiting the activation and proliferation of T and B lymphocytes and dendritic cells.^{123,125,126} Besides, MSCs do not express major compatibility complex class II antigen or the classic co-stimulatory molecules¹²⁴ and thus they are likely to have a non-immunogenic phenotype. Therefore, transplantation of MSCs to inflamed ocular surfaces may have therapeutic benefit. Due to their immunosuppressive properties and release of anti-inflammatory and anti-angiogenic factors *in situ*,¹⁴⁷ they could represent a promising therapy in cases of ocular surface failure caused by LSCD.

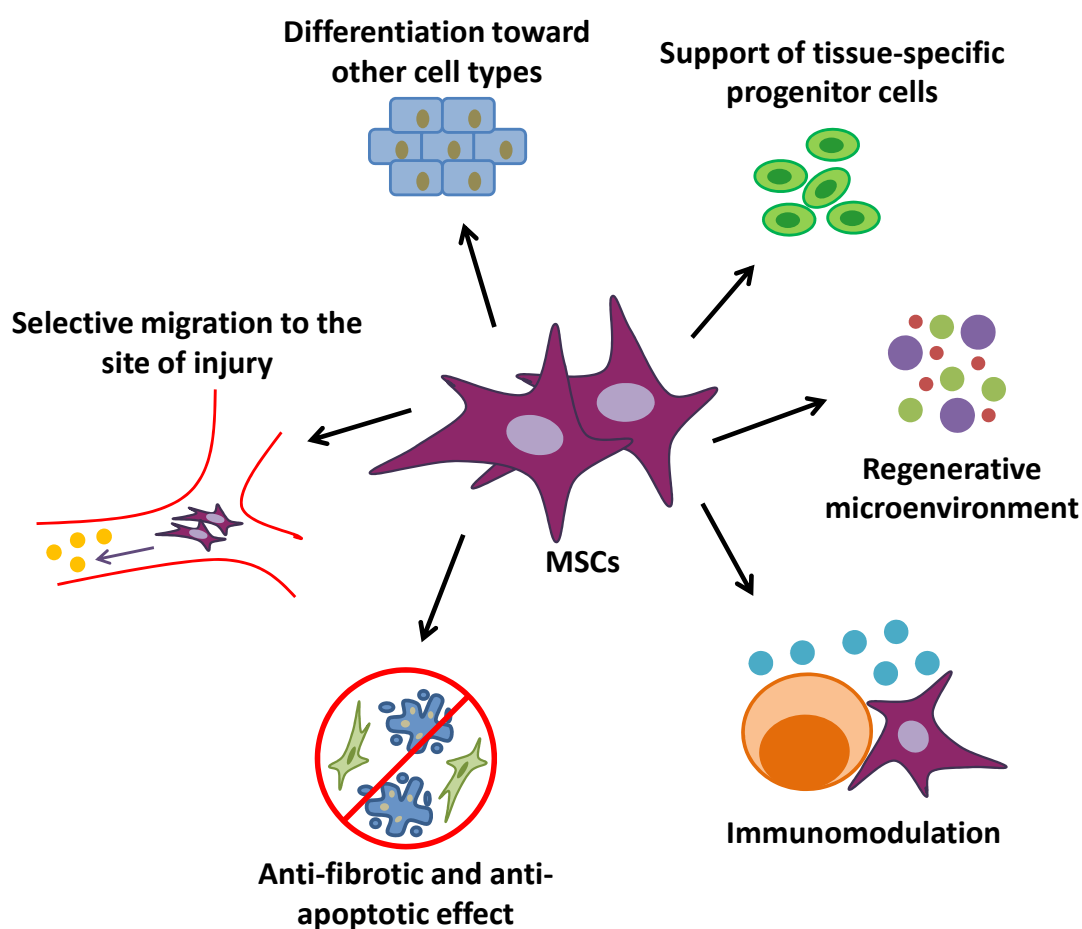


Figure 1. Properties of MSCs. MSCs have the capacity to differentiate into other cell types, to support of tissue-specific progenitor cells, to provide a regenerative microenvironment, to have immunomodulatory, anti-fibrotic, and anti-apoptotic properties and to migrate to the site of injury. Adapted from the original image: Holan V, Javorkova E. Mesenchymal stem cells, nanofiber scaffolds and ocular surface reconstruction. *Stem Cell Rev.* 2013;9(5):609-19.

HYPOTHESIS

Human adipose tissue-derived MSCs (hAT-MSCs) are able to acquire *in vitro* some features of corneal epithelial-like cells. Furthermore, transplantation of these cells to the ocular surface may improve the damaged corneal epithelium in an *in vivo* animal model of LSCD.

OBJECTIVES

1. To test the *in vitro* differentiation potential of hAT-MSCs to corneal epithelial-like cells.
2. To determine the adequate dose of hAT-MSCs to perform a transplantation onto the ocular surface in an *ex vivo* corneal wound model.
3. To develop an *in vivo* animal model of ocular surface failure due to LSCD.
4. To test the tolerance and the efficacy of hAT-MSCs to regenerate the ocular surface in the previously developed animal model of LSCD.

METHODOLOGY

This study was approved by the IOBA Research Committee, the University of Valladolid Ethics Committee, and the Animal Care and Ethics Committee of the University of Valladolid. All procedures followed the guidelines of the Declaration of Helsinki for research involving human tissues, and the standards of ARVO (Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Visual Research).

1. Isolation and expansion of hAT-MSCs

Subcutaneous human adipose tissue from six different donors was obtained from cosmetic liposuction procedures after written informed consent was obtained. Cells were isolated using the procedure previously described by Zuk *et al.*¹³⁶ Lipoaspirates were digested at 37°C for 30 minutes with 0.075% collagenase type I, incubated with 160 mM NH₄Cl erythrocyte lysing buffer, and filtered through 100 µm and 40 µm mesh filters. Until passage (P) 3-4, cells were cultured in basal medium (BM) composed of low-glucose (1 g/L) Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), GlutaMAX™, 1 mM sodium pyruvate, 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin at 37°C, 5% CO₂ and 95% humidity. Under standard culture conditions the cells were cultured in BM and the passages were made at a density of 3,000-6,000 cells/cm² when cultures reached 90% of confluence.

2. Immunophenotypic analysis

According to the International Society for Cellular Therapy (ISCT) position statement,⁹⁶ cell surface marker expression was performed by flow cytometry. P3-4 hAT-MSCs were harvested, washed and blocked with 40 µg/ml immunoglobulin G at room temperature for 15 minutes. Afterwards, cells were incubated with 10 µl anti-human monoclonal antibodies (Table 1) at 4°C for 30 minutes in darkness. Alternatively, they were incubated with the corresponding mouse anti-human isotypic-matched controls IgG1-

METHODOLOGY

FITC, IgG1-PE, IgG1-APC, IgG1-PC7 and IgG2a-FITC. For each assay, at least 5×10^4 cells were analyzed.

Table 1. Primary antibodies used in flow cytometry experiments.

Antibody	Specificity	Clone
CD14-FITC	Monocytes and Macrophages	RM052
CD19-PE	B cells	SJ25C1
CD34-PC7	Hematopoietic stem cells	581
CD45-FITC	Pan-leukocyte marker	J33
HLADR-FITC	Antigen-presenting cells	357
CD73-PE	Mesenchymal stem cells	AD2
CD90-FITC	Mesenchymal stem cells	F15-42-1-5
CD105-APC	Mesenchymal stem cells	2H6F11

3. *In vitro* multilineage differentiation

For adipogenic and osteogenic differentiation, P3-4 hAT-MSCs were cultured at a density of 10,000 cells/cm² using a StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit for 15 days and a StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit for 29 days following the manufacturer's instructions. To achieve chondroblast differentiation pellets, 10⁶ hAT-MSCs were maintained in StemXVivo™ Chondrogenic Base Media with StemXVivo™ Chondrogenic Supplement for 27 days. Adipocyte and osteoblast differentiation was evidenced by Oil Red O and von Kossa staining, respectively. To confirm chondroblast differentiation, hAT-MSCs pellets were fixed with paraformaldehyde, embedded in Optimal Cutting Temperature Compound (OCT), sectioned, and stained with Alcian blue dye.

4. Isolation and expansion of human limbal fibroblasts

Human corneoscleral tissues from 10 different deceased donors were obtained from the Barraquer Eye Bank (Barcelona, Spain). Excessive sclera, conjunctiva, and iris were removed, and the central corneal button was extracted. The limbal epithelium was separated from the stroma by incubation with 5 mg/ml dispase II. Then the limbal

stroma was digested with 2 mg/ml collagenase I overnight at 37°C, and the resulting cell pellets were cultured and expanded in BM plus 1% non-essential amino acids at 37°C, 5% CO₂, and 95% humidity until P3.

5. Conditioning of culture media and coating of tissue culture plates with collagen IV

Conditioning of hAT-MSCs BM by human corneal epithelial (HCE) cells,¹⁵⁸ kindly provided by Arto Urtti (University of Helsinki, Finland),¹⁵⁹ was performed by culturing confluent HCE cells with 200 µl/cm² hAT-MSCs BM for 24 hours. HCE-conditioned BM (HCEcBM) was collected daily for 4 consecutive days and finally pooled. Conditioning of hAT-MSCs medium by limbal fibroblasts (LF) was performed following the protocol previously described by Ahmad *et al.*¹⁶¹ with some modifications. Mitotically inactivated LF were cultured with 200 µl/cm² hAT-MSCs BM, and the LF-conditioned BM (LFcBM) was collected daily for 7 days and finally pooled. Pools of harvested culture media were centrifuged at 277 g, filtered through a 0.22 µm pore to avoid any kind of cross contamination, and stored at -80°C until used. Tissue culture plates were coated with collagen IV following the protocol previously described by Ahmad *et al.*¹⁶¹ and following the manufacturer's instructions.

For the induction of corneal epithelial differentiation, P3-4 hAT-MSCs from four different donors were plated separately at a density of 40,000/cm² on polystyrene and collagen IV coated tissue culture plates. Epithelial differentiation was induced with 200 µl/cm² BM, HCEcBM, or LFcBM. Culture media were changed twice a week. Cell viability and cell cycle were studied by flow cytometry with the Annexin V-FITC Kit and Coulter® DNA Prep™ Reagents Kit, respectively, following the manufacturer's protocols. For each assay, at least 2 x 10⁴ cells were analyzed.

6. RNA isolation and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was isolated from P3-4 hAT-MSCs cultured under different differentiation conditions for 1, 8, 15, and 22 days using a previously described method.²²² TaqMan® Universal PCR Master Mix and specific Taqman® probes for cytokeratin 3 (*CK3*, Hs00365080_m1), cytokeratin 12 (*CK12*, Hs00165015_m1) and glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (*GAPDH*, 4352934E) were used. Results were analyzed by the comparative “cycle-threshold method”.²³³ *GAPDH* was used as a housekeeping reporter gene, and hAT-MSCs grown in BM on plastic for each corresponding time point were used for calibration.

7. Western-blotting

P3-4 hAT-MSCs incubated for 15 days under differentiation-inducing conditions were homogenized in ice-cold radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer plus protease and phosphatase inhibitors (100 µg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.033 U/ml aprotinin, 1 mM sodium orthovanadate). Homogenate proteins (20 µg) were separated by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 10% polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked in 5% dried milk and 4% FBS in Tris-buffered saline with 0.05% Tween-20 for 1 hour at room temperature and then incubated with the primary antibodies diluted in blocking buffer (Table 2) overnight at 4°C. Membranes were incubated for 1 hour at room temperature with the secondary antibodies donkey anti-mouse-HRP 1:5000 or donkey anti-rabbit-HRP 1:2000. Protein extracts from HCE cells were used as positive controls. Immunoreactive bands were visualized by a chemiluminescence method using the ChemiDoc Gel Documentation System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), and images were analyzed with the Quantity One software (Bio-Rad Laboratories) using hAT-MSCs cultured with BM on plastic as the control.

Table 2. Primary antibodies used in western-blotting and immunofluorescence experiments.

Antibody	Specificity	Clone	Dilution and technique
Ab-1 (CD90)	Fibroblasts	AS02	1:40 (IMF)
BrdU	hAT-MSCs (AM <i>ex vivo</i>)	BU-33	1:500 (IMF)
BrdU-DyLight 650	hAT-MSCs (histology)	Policlonal	1:100 (IMF)
CK3	Corneal epithelial cells	AE5	1:50 (IMF); 1:500 (WB)
CK7	Conjunctival epithelial cells	OV-TL 12/30	1:50 (IMF)
CK12	Corneal epithelial cells	H60	1:50 (IMF); 1:200 (WB)
CK15	Limbal epithelial stem cells	LHK15	1:50 (IMF)
E-cadherina	Corneal epithelial cells	36	1:100 (IMF)
GAPDH	Housekeeping	10B8	1:500 (WB)
Pan-CK	Epithelial cells	80	1:50 (IMF)
p63	Limbal epithelial stem cells	4A4	1:50 (IMF)
S100A4 (FSP1)	Fibroblasts	1B10	1:100 (IMF)
Vimentin	Fibroblasts	V9	1:500 (IMF)

Abbreviations: WB, western-blotting; IMF, immunofluorescence.

8. Immunofluorescence

The samples were permeabilized with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.3% Triton X-100. After that, samples were incubated for 1 hour with 5% donkey or goat serum in PBS at room temperature to block nonspecific binding and then at 4°C overnight with cell-specific monoclonal antibodies (Table 2) diluted in blocking buffer. Afterwards, the cells were incubated for 1 hour at room temperature in darkness with corresponding secondary antibody (Alexa Fluor® 488 donkey anti-mouse IgG 1:200, Alexa Fluor® 488 donkey anti-rabbit IgG 1:300 or PECy5 goat anti-mouse 1:100) diluted in PBS. Finally, cell nuclei were counterstained with propidium iodide or Hoechst and visualized in an inverted fluorescence microscope. Primary antibodies were omitted in negative control studies. Immunofluorescence against 5'-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) was performed to locate hAT-MSCs. To that end, firstly the samples were incubated with 2 M HCl at room temperature for 30 min, to allow the entry of the antibody in the DNA, and neutralized with sodium borate buffer (10 mM NaOH, pH 8.5).

9. hAT-MSCs culture onto amniotic membrane

P3-4 hAT-MSCs were labeled with BrdU in order to locate them.⁸³ When hAT-MSCs achieved 70% of confluence, they were incubated with 10 μ M BrdU in BM (200 μ /cm²) for 24 hours at 37°C. Human amniotic membrane (AM) was obtained from cesarean section after written informed consent was obtained. AM was processed using the procedure previously described by Tseng *et al.*¹⁶⁴ with some modifications. The AM was received in physiological saline containing antibiotics. The AM was cut into pieces of approximately 4 cm x 4 cm, and stored in DMEM-glycerol (1:1) solution at -80°C. Immediately before use, AM was thawed, washed with Hank's balanced salt solution (HBSS) three times for 10 minutes, and treated with 0.25% trypsin-EDTA for 10 minutes at room temperature. After that, trypsin was inactivated with FBS, and the AM was scraped to remove the epithelium and cut into 2 cm x 2 cm pieces. Three different cell doses (250,000, 1,000,000 and 10,000,000 hAT-MSCs) were seeded onto the AM with 250 μ l of culture medium to allow adhesion of the cells to the AM. After 2 hours, 200 μ l/cm² of BM was added.

10. *Ex vivo* corneal wound model

The *ex vivo* corneal wound model was based on previous works.^{73,74,165} Porcine eyes were obtained from a slaughterhouse. Excess of muscle and conjunctival tissues was removed, and eyes were disinfected using 2% betadine antiseptic solution and PBS containing antibiotic and antimycotics. Then, corneal and limbal epithelium was debrided by n-heptanol, using a crescent knife. The corneoscleral button was excised and its back was filled with DMEM/F12 containing 0.5% agar to maintain the shape of the button. Positive controls were established following the same process without the heptanol-scraping step. AM with hAT-MSCs were transplanted to the ocular surface of the *ex vivo* model with the cells facing down. Buttons were maintained in air-liquid interface culture. Two weeks after the transplantation, AM were lifted (or not) from the buttons and fixed with 4% formaldehyde. Epithelial defects were evaluated using sodium fluorescein, cobalt blue flash and yellow filter. Finally, corneoscleral buttons

were rinsed with PBS and fixed with 4% formaldehyde to perform the histopathology and immunofluorescence analysis.

11. Animal models of LSCD

A total LSCD model was created in 8 pigs (*Sus scrofa*). Animals were tranquilized by intramuscular injection of 0.35 mg/kg midazolam, 5 mg/kg ketamine and 0.02 mg/kg atropine, and anesthetized by intravenous injection of 4-6 mg/kg propofol. The anesthesia was maintained by isoflurane inhalation. Denudation of corneal surface was performed by cotton swab soaked with n-hepanol for 1 minute¹⁶⁶ and then, a 360° cryogenic limbectomy was performed. Three weeks after the injury, AM without cells was transplanted onto the ocular surface of 4 animals and sutured with 9.0 nylon. After surgery, the eyelids were closed, and systemic antibiotics were administered daily for the first week. Animals were euthanized 12 weeks after the creation of the injury by intravenous injection of pentobarbital sodium.

Partial and total LSCD models were created in 15 adult New Zealand white rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Rabbits were anesthetized by intramuscular injection of 50 mg/Kg ketamine and 7 mg/Kg xylazine, complemented with topical ophthalmic anesthesia. Denudation of corneal surface was performed by cotton swab soaked with n-hepanol for 1 minute. Surgical 180° (superior and temporal limbus, n=9) or 360° (n=6) limbal peritomy were performed by crescent knife. Topical anti-inflammatory and antibiotics, and systemic analgesics and antibiotics were administered daily for 5 days. Three weeks after the creation of the injury, AM without or with hAT-MSCs was transplanted to the ocular surface and sutured with Surgipro™ II 7.0 polypropylene suture. After surgery, the eyelids were closed with a partial tarsorrhaphy using 5.0 silk sutures, and topical anti-inflammatory and antibiotics, and systemic analgesics and antibiotics were administered daily for 5 days. Two weeks after the transplantation, the eyelids were re-opened. Animals were euthanized 11 weeks after the creation of the injury by intravenous injection of pentobarbital sodium. Samples of cornea and limbus were collected and fixed in 4% formaldehyde for histopathology.

12. Clinical evaluation

Corneal neovascularization, corneal opacity, and corneal epithelial defects (fluorescein staining) were clinically examined weekly by slit lamp and assessed from 0 to 4 by two different researchers (Table 3).¹⁶⁷ Epithelial defect area was measured by the image-processing program Image J. In the total LSCD model developed in rabbits, the cornea was divided in five different areas and each area was scored for each clinical sign. In addition, conjunctival invasion (Table 3) and neovessel length (Efron scale)¹⁶⁸ were evaluated.

Table 3. Criteria for ocular surface evaluation.

Score	Neovascularization	Corneal opacity	Epithelial defect	Conjunctival invasion
0	None	None	None	None
1	Area \leq 1/4	Mild	Area \leq 1/4	Area \leq 1/4
2	1/4 < area \leq 1/2	Moderate	1/4 < area \leq 1/2	1/4 < area \leq 1/2
3	1/2 < area \leq 3/4	Severe, pupil seen faintly	1/2 < area \leq 3/4	1/2 < area \leq 3/4
4	Area > 3/4	Severe, pupil not visible	Area > 3/4	Area > 3/4

13. Corneal impression cytologies and laser scanning *in vivo* confocal microscopy

In the LSCD porcine model, corneal impression cytologies were collected weekly to detect goblet cells (Periodic Acid Schiff (PAS) staining) in the central cornea, as a sign of conjunctival in-growth. Anatomy of the porcine limbus and cornea was analyzed by *in vivo* laser scanning confocal microscopy at the end of follow-up (12 weeks).

14. Histopathology analysis

Histopathology analysis was performed to evaluate the degree of damage created in the limbal and corneal epithelium and its recovery after transplantation. Samples were processed, embedded in paraffin, and cut in 4 μ m slices with a microtome. PAS staining

was performed to show goblet cells (in purple color) in the limbal or corneal epithelium, and inflammatory cells and blood vessels in the corneal and limbal stroma.

15. Statistical analysis

Data were reported as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistics were analyzed using the Statistical Procedures for the Social Sciences (SPSS 18.0, IBM Corporation, Somers, NY, USA) and under guidance of the IOBA Statistical Unit (Dr. Itziar Fernández). Two-sided P-values ≤ 0.05 were considered statistically significant. Statistical significance was determined by two-way factorial repeated measures analysis of variance (ANOVA) and analyzed by Bonferroni post hoc tests for multiple comparisons. The comparison between two groups was made using Student's t-test. For analysis of clinical signs, Friedman test (more than two groups) or Wilcoxon test (two groups) were used to compare between groups. Kruskal-Wallis test (more than two groups) or U de Mann-Whitney test (two groups) were used to compare over time.

RESULTS

1. Characterization of undifferentiated hAT-MSCs

Cultured stromal cells in P3-4 isolated from lipoaspirates from six different donors fulfilled the minimal criteria for MSCs established by the ISCT.⁹⁶ In the analysis by flow cytometry, P3-4 hAT-MSCs were positive for the surface markers CD73, CD90, and CD105 (> 95% of the population) and were negative for CD14, CD19, CD34, CD45, and HLA-DR (< 2% of the population). When hAT-MSCs were cultured under adipogenic conditions, we observed a significant number of intracellular lipid droplets stained with Oil Red O. Under osteogenic conditions, calcium deposits, as shown by von Kossa staining, were present in the hAT-MSCs. Chondrogenic differentiation micromass culture of hAT-MSCs resulted in the formation of dense nodules and the appearance of sulphated proteoglycans in the extracellular matrix stained by Alcian Blue (data not shown).

2. Effect of differentiation-inducing conditions on hAT-MSCs morphology, viability, and cell cycle

Under standard conditions, hAT-MSCs had a spindle-like shape and low complexity. When hAT-MSCs were cultured to over-confluence with BM and LFcBM on plastic and collagen IV for 15 days, they also had a spindle-like shape as shown by phase contrast microscopy. However, cells cultured with HCEcBM acquired a more polygonal, epithelial-like morphology (Figure 2). Additionally, confluence decreased and the cells acquired an epithelial-like growth in monolayers. Cell complexity was affected by the different culture conditions, as shown by flow cytometry. The highest increase in cell complexity occurred in cells incubated with HCEcBM (Figure 2). These results were correlated with the increase in cytoplasmic granules observed by inverted phase contrast microscopy (Figure 2). The substratum had no significant effect on cell complexity. hAT-MSCs viability was around 95% in all culture conditions. Analysis of cell

cycle showed that 75% of hAT-MSCs grown under standard conditions were in phase G1/G0. This percentage increased up to 85% when cells were cultured in the other non-standard conditions (data not shown).

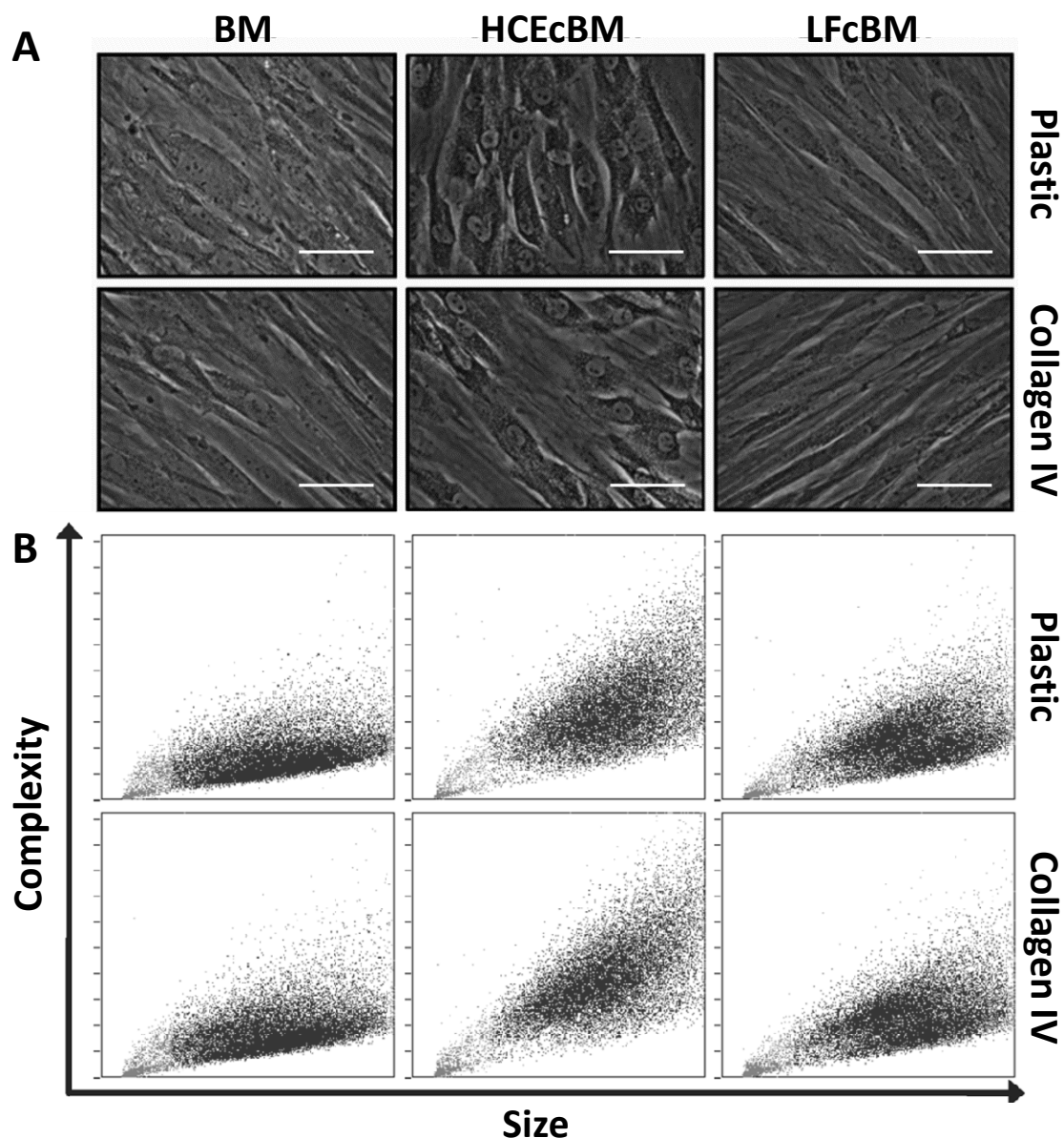


Figure 2. Acquisition of epithelial-like cell morphology and increase of cell complexity in hAT-MSCs under different culture conditions. Bright phase contrast microphotographs and flow cytometry histograms of cell size and complexity of 40,000 hAT-MSCs/cm² in P3-4 cultured for 15 days in BM, HCEcBM, and LFcBM on plastic and collagen IV. hAT-MSCs cultured with HCEcBM acquired epithelial-like characteristics. Representative images from 4 independent experiments. Scale bar: 50 μ m.

RESULTS

3. Effect of differentiation-inducing conditions on hAT-MSCs immunophenotype

The expression of CD73, CD90, CD105, CD14, CD19, CD34, CD45, and HLA-DR markers was analyzed by flow cytometry in hAT-MSCs grown for 15 days under different conditions. The percentage of cells expressing the positive surface markers for hAT-MSCs CD73, CD90, CD105 (> 95% of the population) and the negative surface markers CD14, CD19, CD34, CD45, and HLA-DR (< 2% of the population) was not affected in cells grown under the different test conditions compared to hAT-MSCs cultured in standard conditions (data not shown).

The mean fluorescence intensity (MFI) reflects the average amount of protein expressed per cell in absolute units. The MFI of the surface markers CD73, CD90, and CD105 increased under differentiation conditions when compared to standard conditions (Figure 3). For CD105, the increase was significantly greater in cells grown in HCEcBM compared to cells grown in BM and LFcBM. There were no significant differences in the MFI of cells grown on plastic and collagen IV. The surface markers CD14, CD19, CD34, CD45, and HLA-DR did not change when compared to hAT-MSCs grown under standard conditions.

We also studied the expression of these markers in HCE cells and LF. Surprisingly, HCE cells expressed CD73 and CD105 markers (82% and 67% of the population, respectively), but none of the others. Human LF expressed CD73, CD90, and CD105 markers (97%, 95% and 86% of the population, respectively; data not shown). These were similar to the marker pattern shown by hAT-MSCs. However, MFIs for CD73, CD90, and CD105 in HCE cells and LF were lower than in hAT-MSCs under any culture condition. Of these, the MFI for CD73 in HCE cells was significantly lower than in hAT-MSCs and LF (data not shown).

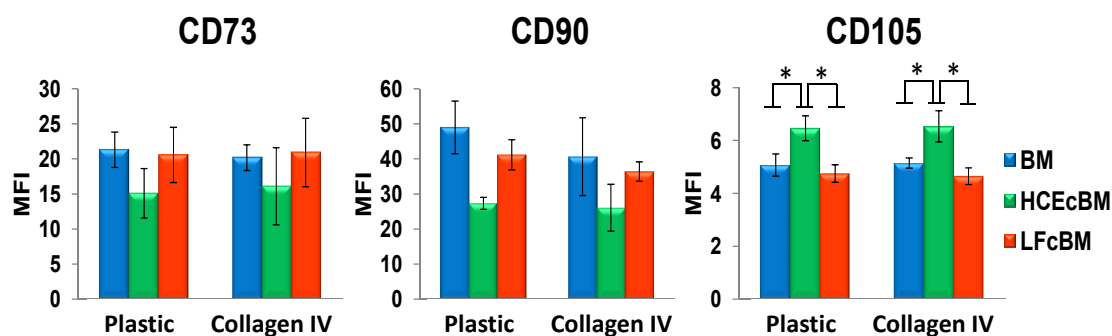


Figure 3. CD73, CD90, and CD105 mean fluorescence intensity (MFI) in hAT-MSCs under different culture conditions. The MFIs for CD73, CD90, and CD105, markers of undifferentiated hAT-MSCs, were analyzed by flow cytometry of 40,000 hAT-MSCs/cm². The cells were in P3-4 and cultured on plastic and collagen IV for 15 days in BM, HCEcBM, and LFcBM. MFI is the average amount of protein expressed in absolute units per cell. Data represent the mean \pm SEM from 4 independent experiments. Statistical significance was assessed by two-way factorial ANOVA. The MFI for CD105 was increased in hAT-MSCs cultured with HCEcBM. * $p < 0.05$.

4. Gene and protein expression analysis of corneal epithelial markers

To analyze how the different test conditions affected the expression of specific markers of corneal epithelial cells in hAT-MSCs, the expression of CK3 and CK12 was analyzed by RT-PCR, western-blotting, and immunofluorescence microscopy. The relative mRNA expression of *CK3* was significantly lower in hAT-MSCs incubated with LFcBM compared to BM at day 22 (Figure 4). For hAT-MSCs grown on collagen IV, the decrease in *CK3* mRNA expression was significant on day 1 of culture for cells incubated with either HCEcBM or LFcBM compared to BM. Although the relative expression of *CK3* in cells grown over plastic was higher than in cells grown over collagen IV, the differences were not statistically significant (Figure 4).

In the case of the *CK12* marker, the relative *CK12* mRNA expression remained stable over time in hAT-MSCs incubated with LFcBM (Figure 4) on both plastic and collagen IV substrata. In hAT-MSCs incubated with HCEcBM, the relative expression of *CK12* increased over time, reaching the highest point after 8 days of culture for both substrata. The differences were significant at 8 and 15 days in cells grown with HCEcBM on plastic with respect to the same conditions at 1 day of culture. The relative increase of *CK12* mRNA expression in cells grown with HCEcBM on plastic for 8, 15, and 22 days

RESULTS

was statistically significant with respect to cells cultured for these same periods with BM and LFcBM (Figure 4). For cells grown on collagen IV, the relative *CK12* expression was significantly greater at 8 days for cells cultured with HCEcBM compared with LFcBM. Although the increase was higher in cells grown on plastic than in cells cultured on collagen IV, the difference was not significant (Figure 4).

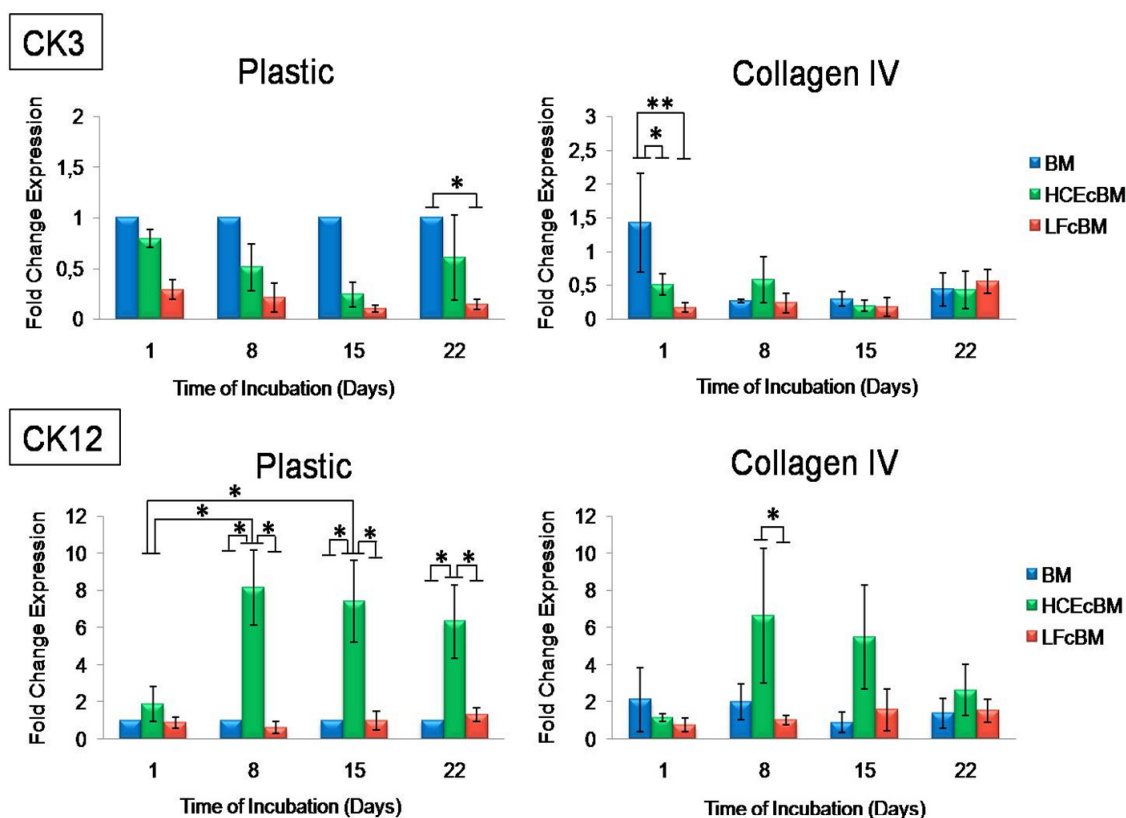


Figure 4. Relative expression of *CK3* and *CK12* mRNA in hAT-MSCs under different culture conditions. Relative mRNA expression of *CK3* and *CK12* was analyzed by RT-PCR of 40,000 hAT-MSCs/cm². The cells were in P3-4 and cultured on plastic and collagen IV in BM, HCEcBM, and LFcBM at 1, 8, 15, and 22 days. Data represent the mean \pm SEM from 4 independent experiments. Statistical significance was assessed by two-way factorial ANOVA. *CK12* mRNA expression in hAT-MSCs cultured with HCEcBM was significantly increased compared to the other media. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

The expression of *CK3* and *CK12* protein was studied by western-blotting analysis and quantified by densitometry. Protein extracts from HCE cells were used as positive control for the identification of *CK3* and *CK12* specific bands (data not shown). At 15 days, hAT-MSCs expression of *CK3* was detected in a 64 kDa band under all growth conditions. For cells grown on collagen IV, the expression of *CK3* significantly decreased with HCEcBM

compared to those cultured with BM (Figure 5). The expression of CK12 by hAT-MSCs was detected in a 108 KDa band under all growth conditions. For hAT-MSCs grown on plastic for 15 days, the expression of CK12 was significantly higher in cells incubated with HCEcBM compared with BM and LFcBM (Figure 5). Although the expression of CK12 was higher in hAT-MSCs grown on plastic, the differences between substrata were not significant.

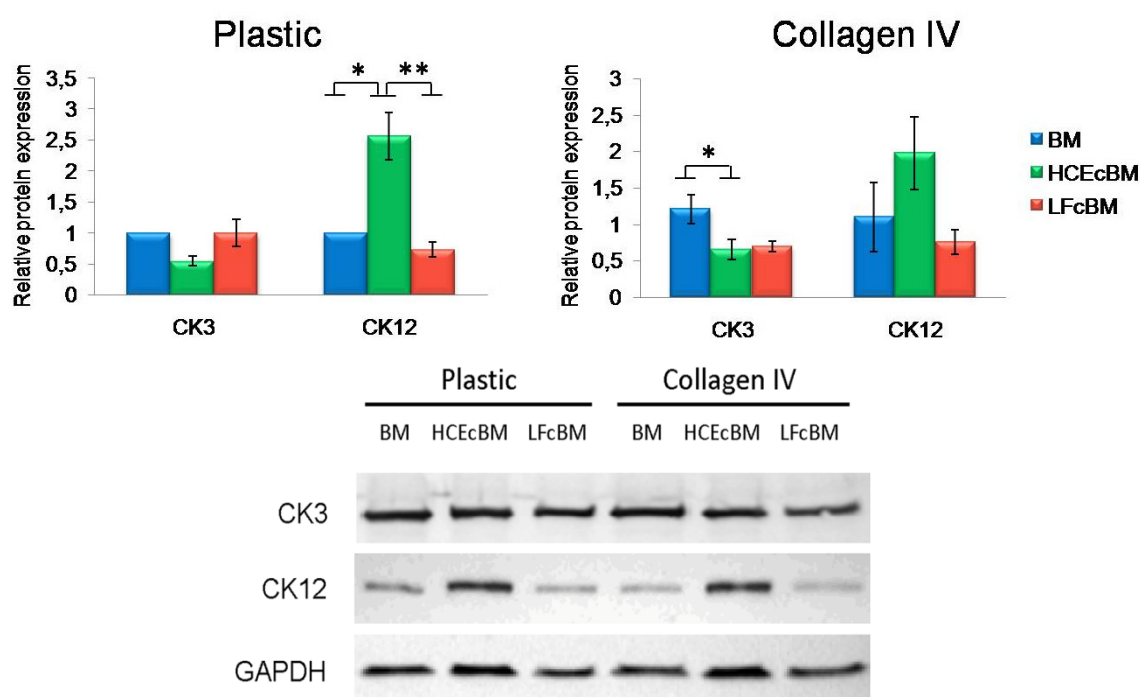


Figure 5. CK3 and CK12 protein expression in hAT-MSCs under different culture conditions. The protein expression of CK3 and CK12 was analyzed by immunoblot analysis of 40,000 hAT-MSCs/cm². The cells were in P3-4 and cultured on plastic and collagen IV for 15 days in BM, HCEcBM, and LFcBM. Representative immunoblots from 3 independent experiments. Densitometry of 3 independent experiments. hAT-MSCs grown in BM on plastic were used as the control. Data were normalized by GAPDH and represent the mean \pm SEM from 3 independent experiments. Statistical significance was assessed by two-way factorial ANOVA. CK12 protein expression in hAT-MSCs cultured with HCEcBM was significantly increased compared to the other media. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

The expression of CK3 and CK12 proteins was also analyzed by immunofluorescence microscopy. The expression of some cytokeratins, such as CK12, CK3, and CK18, has been previously described in MSCs.^{87,108,150,181,185} Consistent with this study, we saw that hAT-MSCs and LF grown under standard conditions showed moderate expression

RESULTS

of CK3 and CK12 (data not shown). The expression of CK3 remained in cells grown under all of the different conditions for 15 days, but was higher in cells grown on plastic than in cells grown on collagen IV (Figure 6). However, CK12 was expressed with more intensity in hAT-MSCs grown for 15 days under each condition. CK12 protein was present throughout the cytoplasm in HCE cells, LF (data not shown), and hAT-MSCs cultured under standard conditions and in BM (Figure 6). However, in hAT-MSCs incubated with HCEcBM and LFcBM, CK12 was located in the perinuclear area (Figure 6). There were no significant differences between plastic and collagen substrata in CK12 expression.

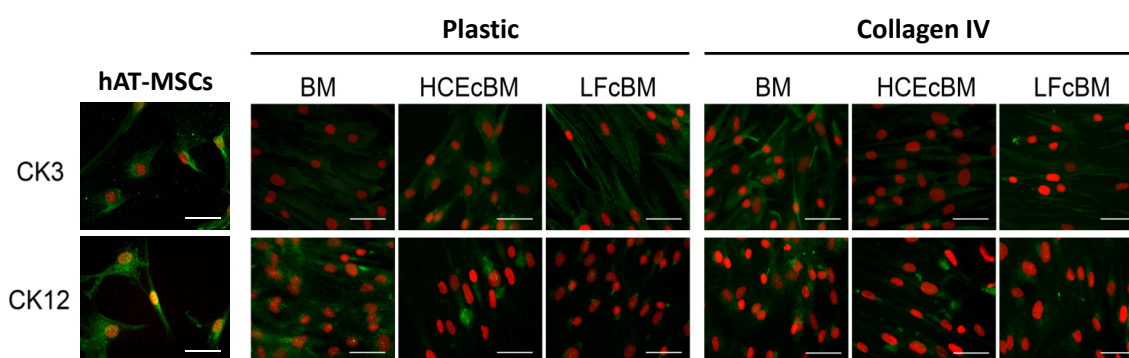


Figure 6. Analysis by immunofluorescence of CK3 and CK12 protein expression in hAT-MSCs under different culture conditions. Analysis of the CK3 and CK12 expression (green fluorescence) by immunofluorescence of 40,000 hAT-MSCs/cm². The cells were in P3-4 and cultured on plastic and collagen IV for 15 days in BM, HCEcBM, LFcBM. Representative images from 3 independent experiments. Nuclear cell staining was performed with propidium iodide (red). CK12 protein expression was located in the perinuclear area of hAT-MSCs cultured in HCEcBM and LFcBM. Scale bar: 50 μ m.

5. Cell dose study in the *ex vivo* corneal wound model

An *ex vivo* corneal wound model, developed by the research group directed by Prof. Julie T. Daniels (Department of Ocular Biology and Therapeutics, Institute of Ophthalmology, University College London), was used to study the adequate hAT-MSCs dose to transplant it to the ocular surface. To carry out this study, a 3 month-stay was performed in this laboratory, so that the present PhD thesis meets the International-awarded Doctorate Degree requirements.

5.1. Studies performed lifting the AM

Effect of different cell doses in the epithelial defect size

Two weeks after the application of AM with 250,000, 1,000,000, and 10,000,000 hAT-MSCs on the ocular surface, the AM were lifted and the epithelial defects were analyzed by visual inspection using topical fluorescein and by histopathology. Epithelial defects were higher than 1.2 cm², and only 1-2 epithelial layers were observed on the transplanted buttons with the different cell doses, without differences between them. The presence of cells was observed in the lifted AM from the corneoscleral buttons by phase contrast microscopy and by immunofluorescence against BrdU. In the AM transplanted with different hAT-MSCs doses the presence of hAT-MSCs (marked with BrdU) and non-hAT-MSCs cells (unmarked with BrdU) were confirmed, without differences among different cell doses. Only a few hAT-MSCs were located in the superficial stroma (close to the epithelium) of the buttons transplanted with different cell doses, without differences between them. Therefore, during the lifting of the AM, cells (hAT-MSCs and cells from the button) were kept attached to the AM. Thus, cell layers could have been lost during this process and the results would have been affected.

Then, the same study was performed without lifting the AM from eyes after 2 weeks in culture. This study was carried out transplanting AM without cells or with 250,000 hAT-MSCs, based on the cell dose used in the clinical trial carried out at IOBA with bone marrow-derived MSCs (BM-MSCs) to treat patients with LSCD (EudraCT: 2010-203535-42; ClinicalTrials.gov: NCT01562002).

5.2. Studies performed without lifting the AM

Effect of different cell doses in the epithelial defect size

Corneoscleral buttons, transplanted with AM (without hAT-MSCs or with 250,000 hAT-MSCs) and fixed after 2 weeks in culture without lifting the AM, were processed for

RESULTS

histopathology analysis. One or 2 epithelial layers were found in cornea and limbus of the samples transplanted with AM without hAT-MSCs or with 250,000 hAT-MSCs, without differences between them (Figure 7).

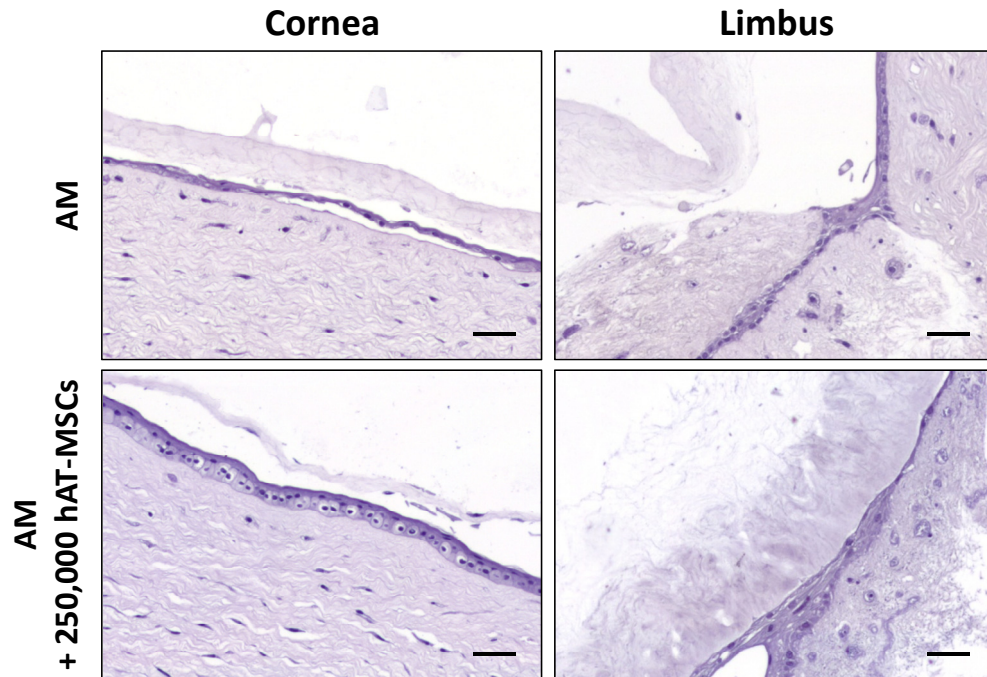


Figure 7. Histopathology analysis (PAS staining) of the corneoscleral buttons without lifting the AM of the *ex vivo* corneal wound model. One or 2 epithelial layers were found in cornea and limbus of the samples transplanted with AM without hAT-MSCs or with 250,000 hAT-MSCs, without differences between them. Representative images from 4 experiments. Scale bar: 50 μm .

hAT-MSCs location

hAT-MSCs location was studied by immunofluorescence against BrdU in the samples transplanted with AM and 250,000 hAT-MSCs and fixed without lifting the AM. Presence of hAT-MSCs was found in the corneal and limbal epithelium. Epithelium consisted of hAT-MSCs (marked with BrdU) and non-hAT-MSCs cells (unmarked with BrdU) (Figure 8).

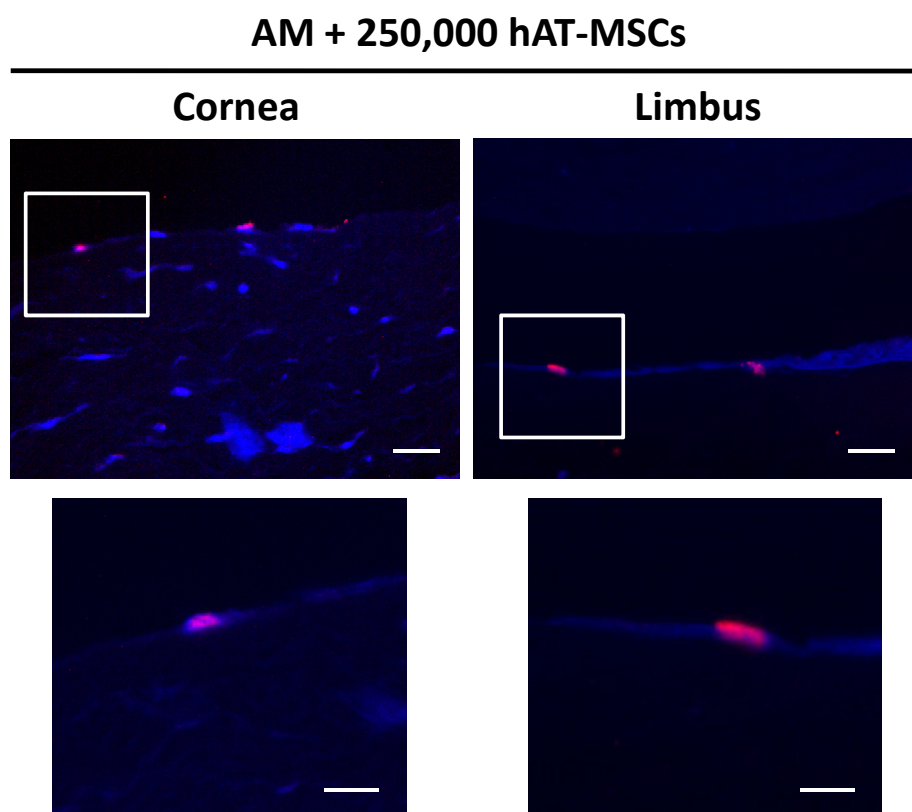


Figure 8. hAT-MSCs location in the corneoscleral samples transplanted with 250,000 hAT-MSCs without lifting the AM in the *ex vivo* corneal wound model. By immunofluorescence against BrdU, hAT-MSCs (in red) were found in the corneal and limbal epithelium of the buttons transplanted with 250,000 hAT-MSCs. Cell nuclei stained with Hoescht in blue. Representative images from 4 experiments. Scale bar: 50 μm (on top) and 20 μm (at bottom).

Results showed that the *ex vivo* corneal wound model was not adequate to study the best cell dose to transplant to the ocular surface. Therefore, it could not be established which cell dose was the most adequate. Based on the clinical trial carried out in IOBA with BM-MSCs to treat patients with LSCD (EudraCT: 2010-203535-42; ClinicalTrial.gov: NCT01562002), we chose a dose of 250,000 cells to transplant to the ocular surface in the LSCD experimental models.

6. Total LSCD porcine model

A total LSCD porcine model that clinically and pathologically resembled human LSCD was successfully developed by cryogenic injury. Neovascularization, corneal opacity and epithelial defects were developed during the first weeks after the creation of the injury.

RESULTS

Presence of goblet cells in the central cornea was observed, as a sign of conjunctival in-growth, by corneal impression cytology and histopathology. Inflammatory cells and loss of structure at the limbal stroma were revealed by histopathology and laser scanning confocal microscopy.

A large inflammatory reaction was observed after the transplantation of AM (without cells) to the ocular surface of the LSCD porcine model. This reaction could have been caused by the high resistance of porcine tissues to the passage of the needle during suture process. For this reason, the LSCD porcine model was discarded for the study of new therapies that need to be sutured on the ocular surface. Additionally, this model could be used to study the pathophysiology and molecular basis of the disease and those therapies that could be applied without the need of suturing.

7. Partial LSCD model in rabbit

7.1. Clinical course of the model

The partial LSCD model was developed in 6 rabbits. Neovascularization and corneal opacity were observed 1 week after the development of the injury and maintained along the follow-up. These clinical signs had a severity around 2 points in the evaluation scale (neovessels covering between $\frac{1}{4}$ and $\frac{1}{2}$ of the total cornea and moderate corneal opacity). The neovessels appeared mainly in the superior area of the cornea (superior and temporal limbus were the damaged areas). Epithelial defects were partially recovered during the first 2 weeks. Along the follow-up, the epithelial defects were maintained with 1 point of severity (area smaller than $\frac{1}{4}$ of the total cornea) or with an area smaller than 0.25 cm^2 (Figure 9).

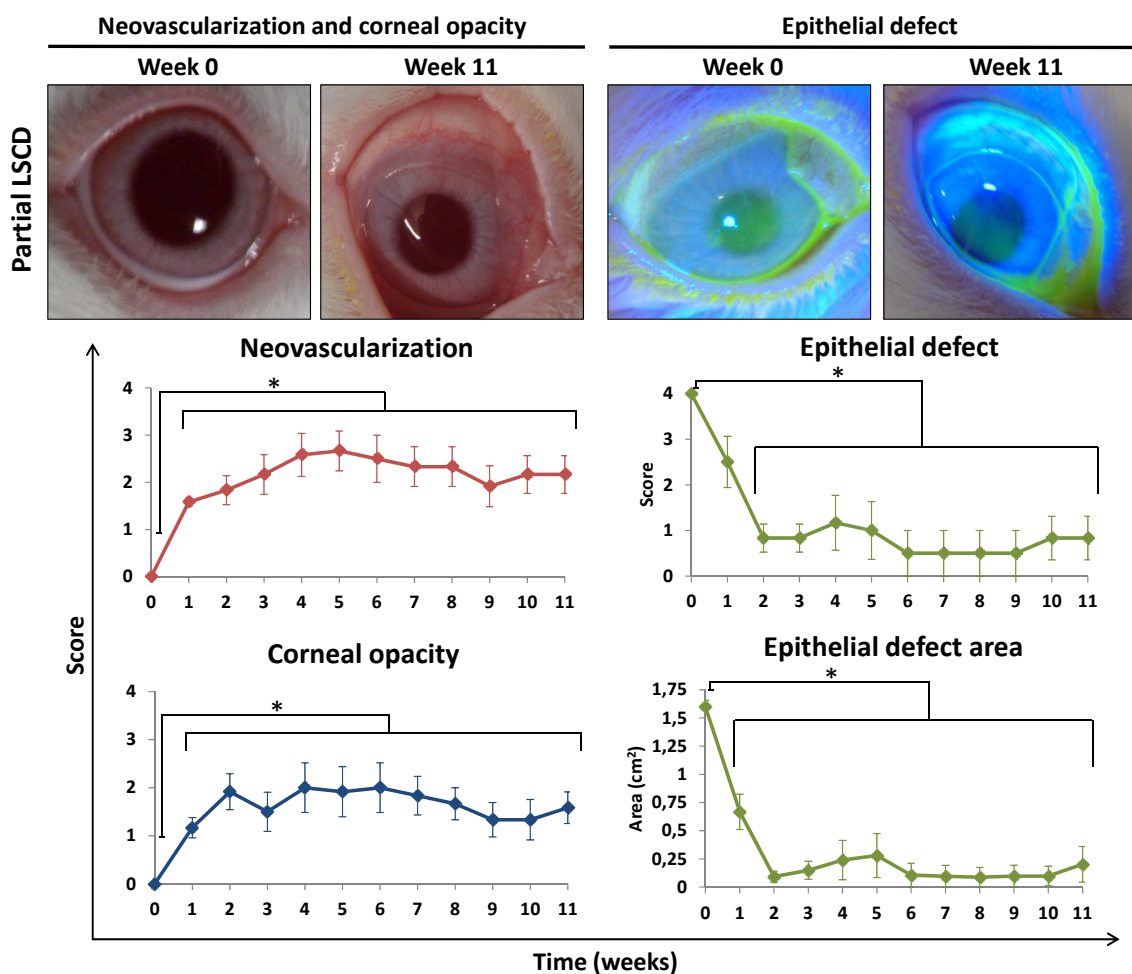


Figure 9. Ocular surface evaluation in the partial LSCD model developed in rabbits. Neovascularization and corneal opacity were developed 1 week after the injury. Epithelial defects (sodium fluorescein in green) were partially recovered during the first 2 weeks. Week 0 represents the moment immediately after the injury. Representative images from 6 animals. Statistical tests: Kruskal-Wallis, U de Mann-Whitney and one-way ANOVA. * $p \leq 0.05$.

7.2. Transplantation of AM

Three weeks after injury, AM without cells were transplanted to the ocular surface of 3 rabbits with partial LSCD. No adverse reactions were observed. Similarly to the partial LSCD group without treatment, neovascularization and corneal opacity were developed during the first week after the damage. Moreover, epithelial defects were partially recovered during the first 2 weeks after the injury. Clinical signs were milder (neovessels and epithelial defects covering less than $\frac{1}{4}$ of the total cornea, mild corneal opacity) than in the partial LSCD group without AM, although without statistical

RESULTS

differences. The model did not react negatively to the surgical suturing process. However, clinical signs did not improve after AM transplantation to the ocular surface.

7.3. Transplantation of hAT-MSCs

Three weeks after injury, hAT-MSCs seeded onto AM were transplanted to the ocular surface of 6 rabbits. As in the other groups, neovascularization and corneal opacity were developed during the first week after damage, and epithelial defects were partially recovered. Before transplantation, neovessels were covering between $\frac{1}{4}$ and $\frac{1}{2}$ of the total cornea, corneal opacity was moderate and epithelial defects were smaller than $\frac{1}{4}$ of the total cornea. Clinical signs did not change after the hAT-MSCs transplantation. There were not significant differences between the non-transplanted and the hAT-MSCs transplanted groups (Figure 10). These results indicated that hAT-MSCs were well tolerated in the ocular surface of the partial LSCD model.

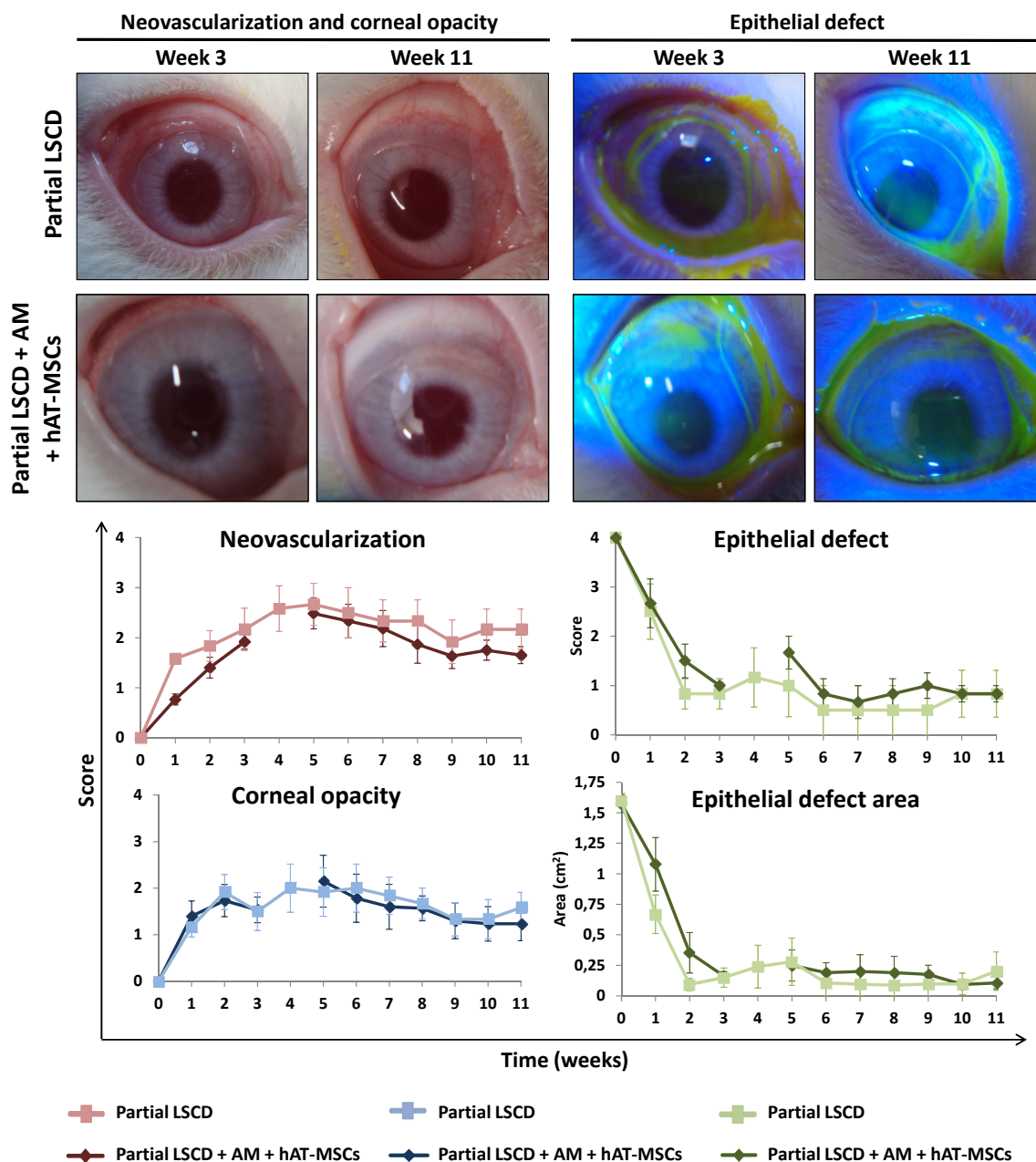


Figure 10. Ocular surface evaluation in the partial LSCD model in rabbit transplanted with AM and hAT-MSCs. Neovascularization and corneal opacity were developed during the first week after the creation of the injury. Epithelial defects were partially recovered during the first 2 weeks. Clinical signs did not change after the hAT-MSCs transplantation. There were not significant differences between the non-transplanted and the transplanted groups. Week 0 represents the moment immediately after the injury. Week 3 represents the moment before transplantation. Representative images from 6 animals of each group. Statistical tests: Friedman, Wilcoxon, Kruskal-Wallis, U de Mann-Whitney, t-Student, and one-way ANOVA.

RESULTS

7.4. Histopathology analysis

At the end of the follow-up (week 11), 4-5 epithelial layers were observed in the central cornea and 6-7 in the limbus (superior and inferior) of the control group (healthy animals). The same number of layers was revealed in the partial LSCD group without treatment. Goblet cells (purple cells) were noted in the limbal epithelium (superior and inferior) of the 3 study groups (partial LSCD without treatment, partial LSCD with AM, and partial LSCD with AM and hAT-MSCs), without differences among them. Inflammatory cells were found in the limbal stroma (superior and inferior) of the 3 study groups. However, central cornea was maintained healthy without goblet cells, inflammation or neovessels, demonstrating that this was a mild model of LSCD. There were no differences among the 3 study groups. There was no adverse reactions in the tissues after the transplantation of hAT-MSCs, which confirmed that the ocular surface tolerated well these cells (Figure 11).

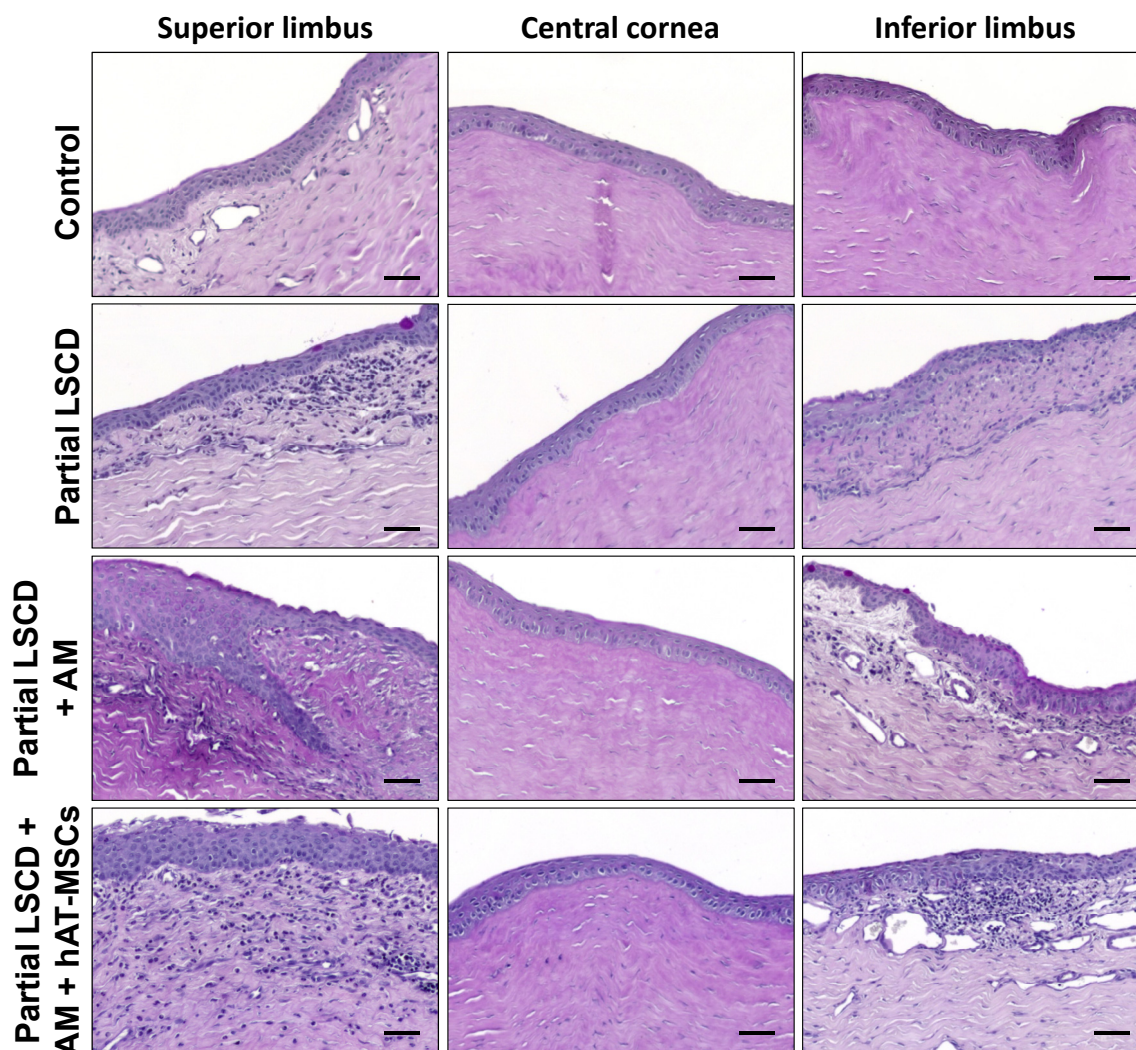


Figure 11. Histopathology (PAS staining) of corneal and limbal tissues in the partial LSCD model in rabbits. Control tissues from healthy animals presented 4-5 epithelial layers in the central cornea and 6-7 in the limbus. Goblet cells (purple cells) and inflammatory cells were observed in the limbal epithelium or in the limbal stroma, respectively, of the 3 study groups (partial LSCD without treatment, partial LSCD with AM, and partial LSCD with AM and hAT-MSCs). There were not differences among the 3 study groups. Representative images from 6 animals of each group, except for the group with AM that consisted in 3 animals. Scale bar: 50 μ m.

7.5. hAT-MSCs location

hAT-MSCs labeled with BrdU were located in the inflamed areas of the limbal stroma (superior and inferior) 8 weeks after the transplantation. hAT-MSCs were not observed in the central cornea. Cell migration to the inflamed areas and its maintenance there, at least 8 weeks, was proved after the transplantation of 250,000 hAT-MSCs to the ocular surface of the partial LSCD model in rabbits (Figure 12).

RESULTS

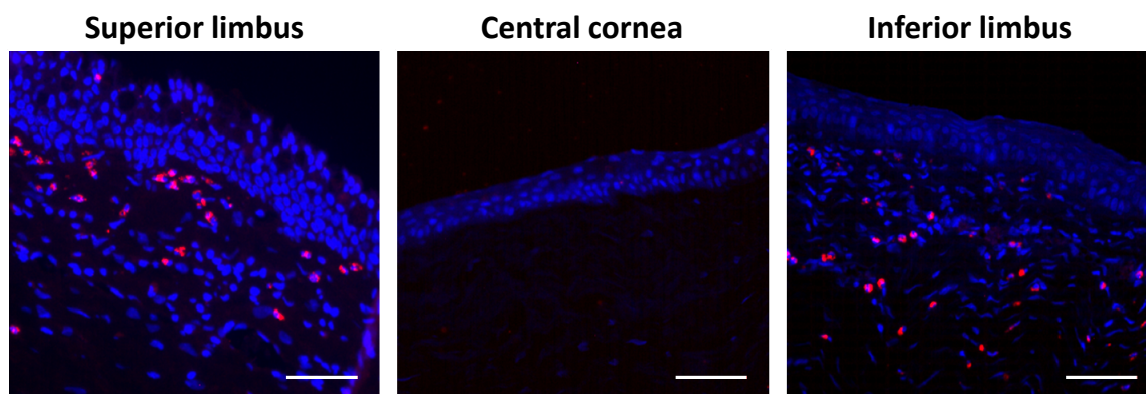


Figure 12. hAT-MSCs location in the ocular surface tissues of the partial LSCD model developed in rabbits. hAT-MSCs were located (immunofluorescence against BrdU, in red) in the inflamed areas of the limbal stroma (superior and inferior) 8 weeks after the transplantation. Nuclei stained in blue with Hoechst. Representative images from 6 animals. Scale bar: 50 µm.

7.6. Phenotypic analysis

Table 4. CK3, E-cadherin, CK15, p63 and CK7 expression in the partial LSCD model developed in rabbits. Subjective evaluation: – absence; + mild expression; ++ moderate expression; +++ high expression. SL: superior limbus, CC: central cornea, IL: inferior limbus, CJ: conjunctiva.

	Corneal epithelial cell markers						Limbal stem cell markers						Conjunctival cell marker			
	CK3			E-cadherin			CK15			p63			CK7			
	SL	CC	IL	SL	CC	IL	SL	CC	IL	SL	CC	IL	CJ	SL	CC	IL
Control	+	+++	+	-	+++	-	+++	-	+++	+++	-	+++	+++	+	-	+
Partial LSCD	++	+++	++	-	+++	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	+	-	+
Partial LSCD + AM	+	+	+	-	+++	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	+	-	+
Partial LSCD + AM + hAT-MSCs	+	+++	+	+	+++	-	+++	-	+++	++	-	+++	+++	+	-	+

The corneal epithelial marker CK3 increased in limbal epithelium in the partial LSCD model but not in the hAT-MSCs transplanted group. E-cadherin expression did not change in the different study groups. The expression of limbal stem cell markers CK15 and p63 was lost in the superior limbus (damaged area) of the partial LSCD model, and partially recovered in the transplanted group. Differences were not found in the CK7 expression among the different study groups.

8. Total LSCD model in rabbit

8.1. Clinical course of the model

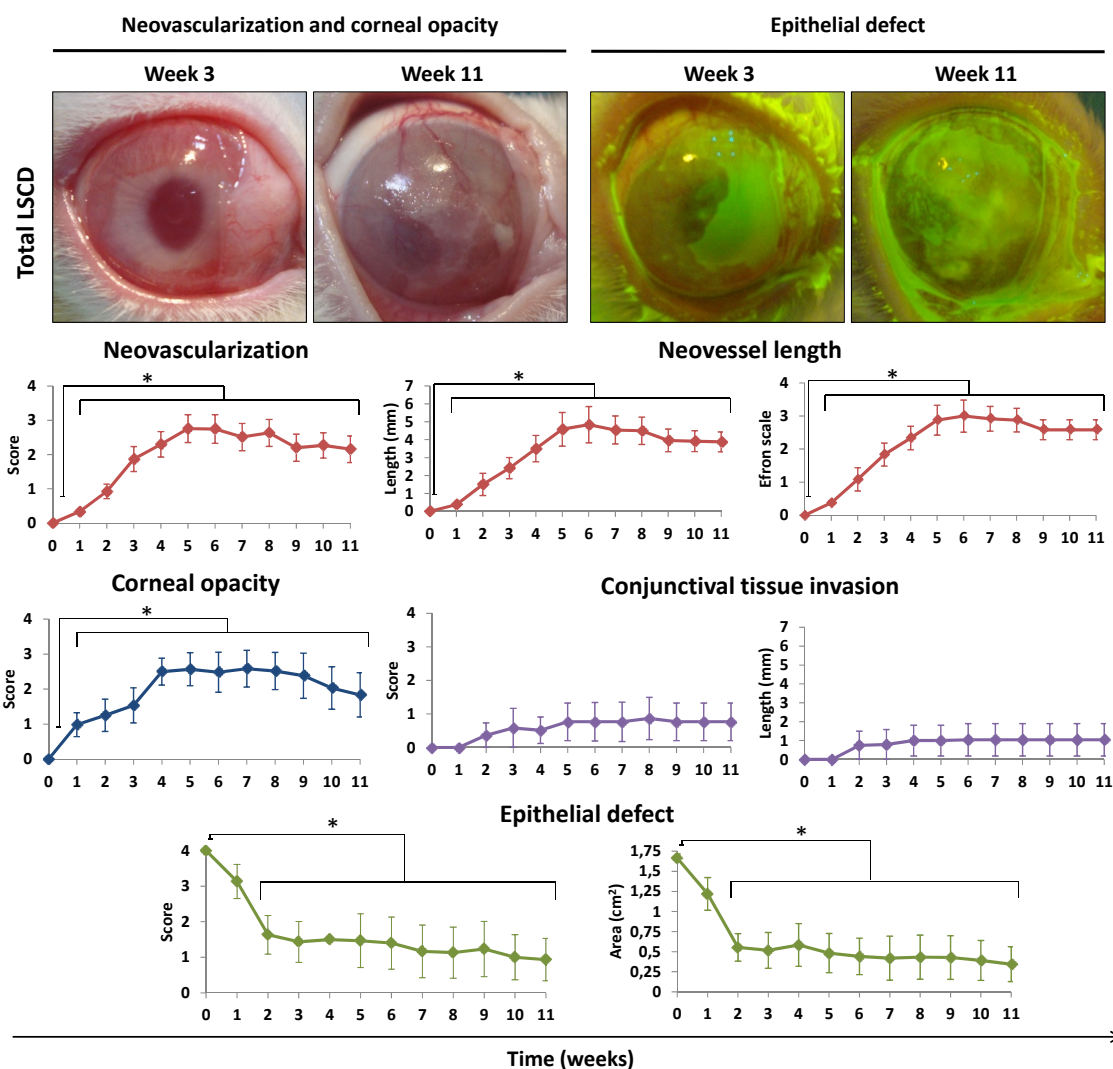


Figure 13. Ocular surface evaluation in the total LSCD model developed in rabbits. Neovascularization and corneal opacity were developed during the first weeks after the injury and maintained during the follow-up. Neovessel length increased up to 5 mm (or 3 points according to Efron scale). A conjunctival invasion was observed in some animals, but overall it was not significant. Epithelial defects (fluorescein staining in green) were partially recovered during the first 2 weeks. Week 0 represents the moment immediately after the injury. Representative images from 6 animals. Statistical tests: Kruskal-Wallis, U de Mann-Whitney and one-way ANOVA. * $p \leq 0.05$.

RESULTS

A total LSCD model was developed in 6 rabbits. Neovascularization and corneal opacity developed during the first weeks after the injury and maintained along the follow-up. These clinical signs reached a severity around 2.5 points in the evaluation scale. Furthermore, neovessel length increased until 5 mm (or 3 points according to Efron scale). Moreover, a thick conjunctiva invasion was developed on the cornea surface in 2 of the 6 animals, but overall this invasion was not significant. Epithelial defects were partially recovered during the first 2 weeks. However, epithelial defects were maintained with 1.5 point of severity or with an area around 0.5 cm² throughout the follow-up (Figure 13).

8.2. Transplantation of hAT-MSCs

Three weeks after the creation of the injury, hAT-MSCs seeded onto amniotic membrane were transplanted to the ocular surface of 5 rabbits. As in the other groups, neovascularization and corneal opacity were developed during the first week after the damage, and epithelial defects were partially recovered. In the total LSCD group without treatment a significant increase in neovascularization was observed, in particular between week 3 and the following weeks (weeks 5, 6, 7, 8, and 10). However, the neovascularization increase was not observed after the hAT-MSCs transplantation. Neovessel length was higher in the total LSCD group without treatment than in the hAT-MSCs transplanted group during the weeks 5, 6, 7, 8, 9, and 11. Furthermore, according to the Efron scale, a significant increase was noted in the non-transplanted group between week 3 and weeks 5-11, whereas in the transplanted group this increment was not observed. Regarding corneal opacity, there was an increase from week 3 to weeks 4-8 in the non-transplanted group. However, corneal opacity did not increase after the hAT-MSCs transplantation. Conjunctival invasion was not significant, but one of the 5 animals showed a thick conjunctival invasion on the cornea surface. Although differences in epithelial defects were not found, it was higher in the total LSCD group without treatment than in the transplanted group. These results seem to indicate that hAT-MSCs transplantation could prevent the LSCD progression (Figure 14).

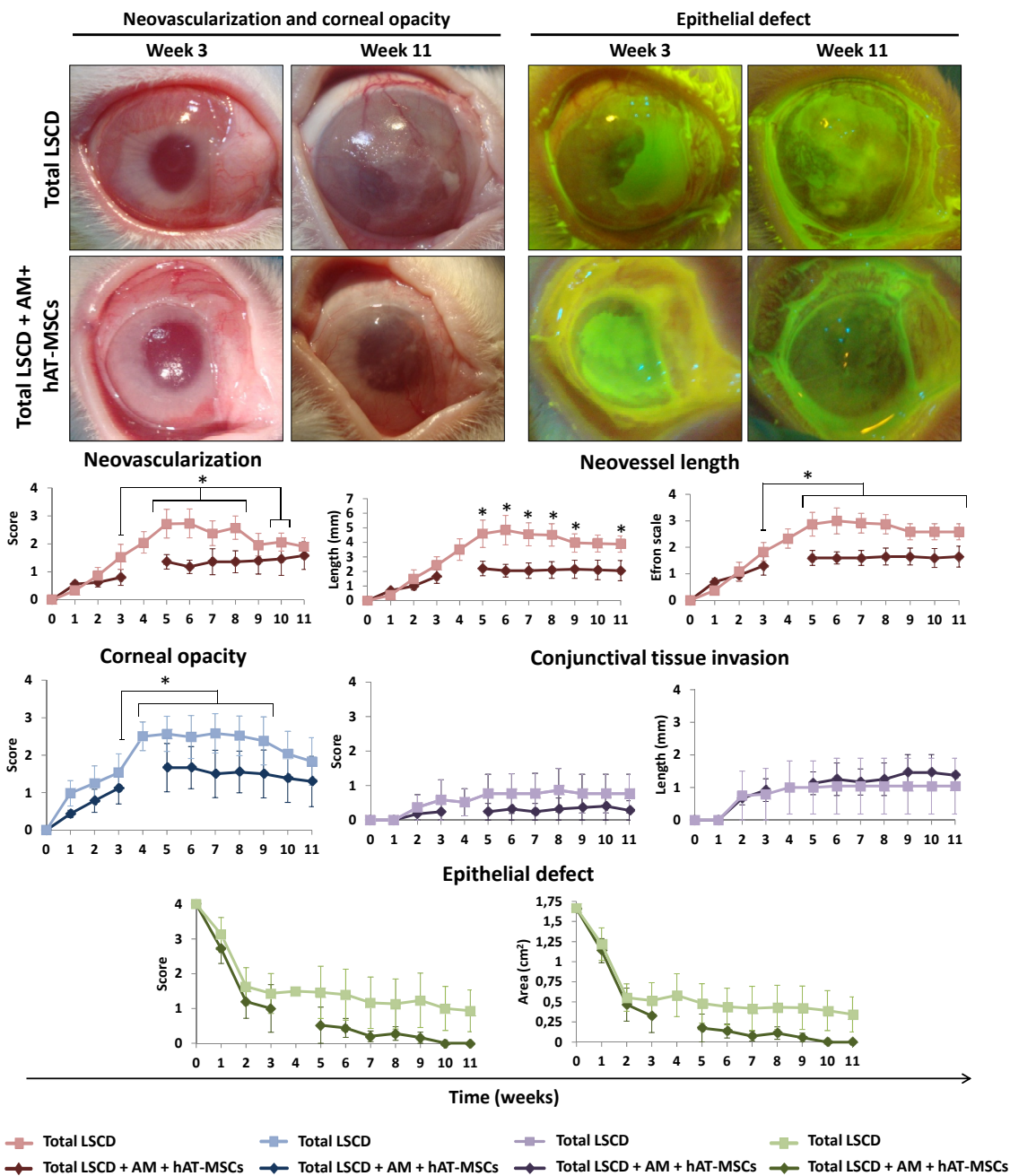


Figure 14. . Ocular surface evaluation in the total LSCD model in rabbit transplanted with AM and hAT-MSCs. In the total LSCD group without treatment a significant increase in neovascularization, neovessel length, and corneal opacity was observed between week 3 and the following weeks. Neovessel length was higher in the total LSCD group without treatment than in the hAT-MSCs transplanted group. One of the 5 animals showed a thick conjunctival invasion on the cornea surface, but overall it was not significant. Week 0 represents the moment immediately after the creation of the injury. Week 3 represents the moment before transplantation. Representative images from 6 animals of each group, except for the group with AM and hAT-MSCs that consisted of 5 animals. Statistical tests: Friedman, Wilcoxon, Kruskal-Wallis, U de Mann-Whitney, t-Student, and one-way ANOVA. *p ≤ 0.05.

RESULTS

8.3. Histopathology analysis

At the end of the follow-up (week 11), 4-5 epithelial layers were observed in the central cornea and 6-7 in the limbus (superior and inferior) of the control group (healthy animals). In the total LSCD group without treatment, the number of epithelial layers was lower (2-3 epithelial layers) in the central cornea and in the limbus. Furthermore, the epithelium was disorganized, and goblet cells (purple cells) were present in the limbal epithelium (superior and inferior), as a sign of conjunctival in-growth. In 2 of the 6 animals with total LSCD, goblet cells were noted in the central cornea. Inflammatory cells and disorganization of the fibers were found in the limbal stroma (superior and inferior) and in the stroma of the central cornea, demonstrating that the total LSCD model was more severe than the partial LSCD model. In the hAT-MSCs transplanted group, similarly to the non-transplanted group, there were fewer epithelial layers than in the healthy tissues. Moreover, goblet cells and inflammatory cells were seen in the limbal epithelium and into the limbal stroma, respectively. In 1 of these animals, goblet cells and inflammation were also noted in the central cornea. However, the hAT-MSCs transplanted eyes showed less presence of inflammatory cells and less disorganization in the stroma of the central cornea in comparison with the non-transplanted group (Figure 15).

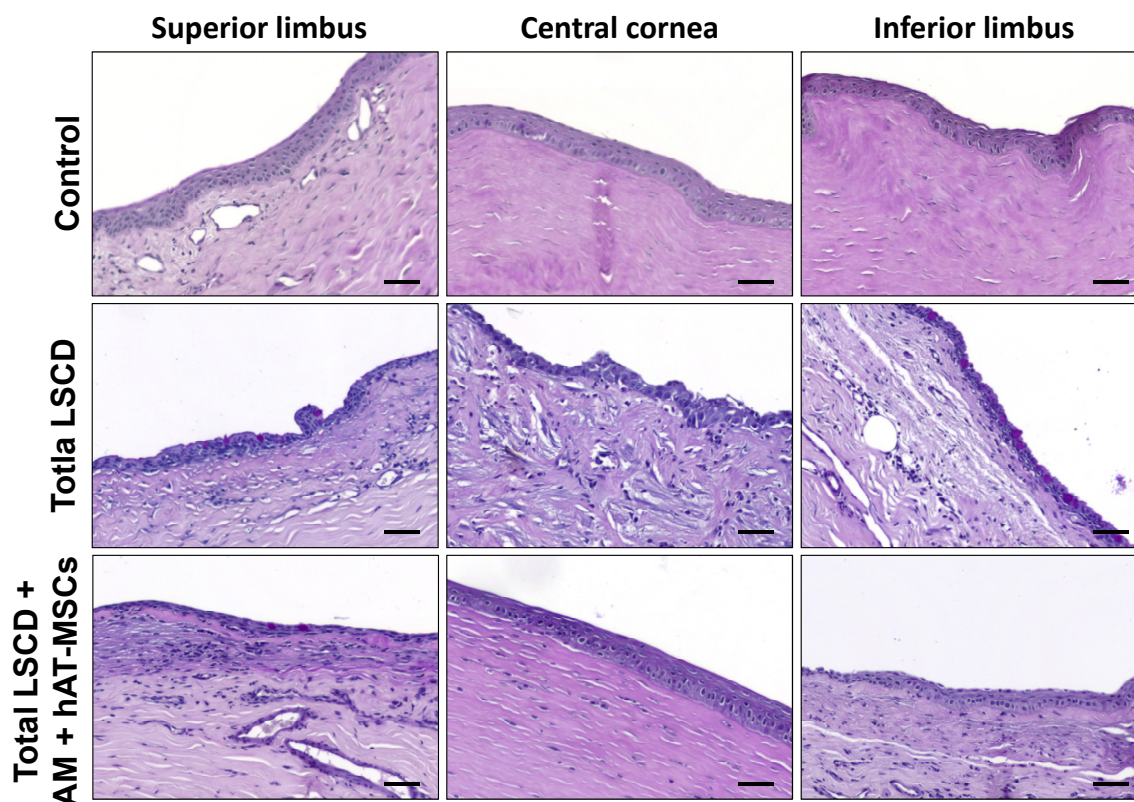


Figure 15. Histopathology (PAS staining) of corneal and limbal tissues in the total LSCD model developed in rabbits. Control tissues from healthy animals presented 4-5 epithelial layers in the central cornea and 6-7 in the limbus. Goblet cells (purple cells) and inflammatory cells were observed in the limbal epithelium and into the limbal stroma, respectively, of the 2 study groups (total LSCD without treatment and total LSCD with AM and hAT-MSCs). The non-transplanted group presented a disorganized corneal stroma and inflammatory cells in the stroma of the central cornea. The hAT-MSCs transplanted eyes showed less presence of inflammatory cells and less disorganization in the stroma of the central cornea. Representative images from 6 animals of each group, except for the hAT-MSCs transplanted group that consisted of 5 animals. Scale bar: 50 μ m.

8.4. hAT-MSCs location

hAT-MSCs labeled with BrdU were located in the inflamed areas of the limbal stroma (superior and inferior) 8 weeks after the transplantation. Cell migration to the inflamed areas and its maintenance there, at least 8 weeks, was proved after the transplantation of 250,000 hAT-MSCs to the ocular surface of the total LSCD model in rabbits (Figure 16). A correlation between the amount of hAT-MSCs and the level of inflammation was detected; those animals with a more prominent inflammatory infiltrate also had a

RESULTS

larger amount of hAT-MSCs. Specifically, in the animal in which inflammation was observed in the central cornea, hAT-MSCs were located in the same area.

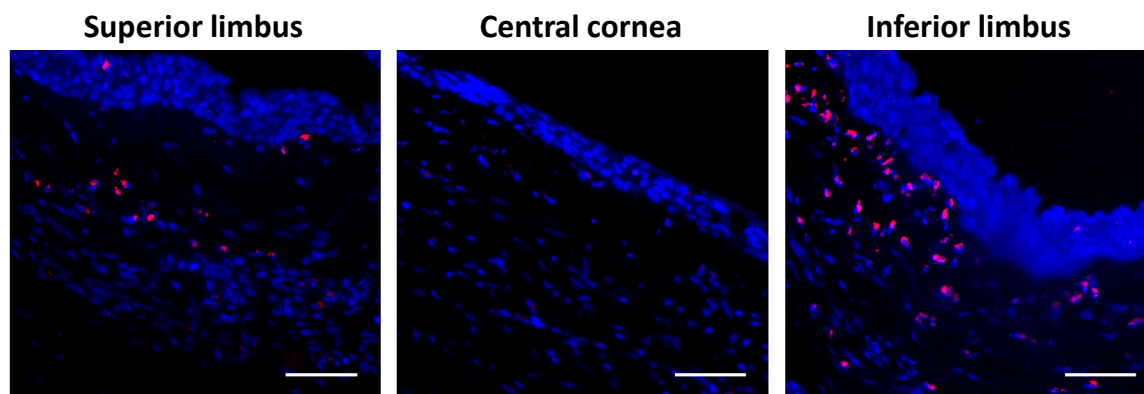


Figure 16. hAT-MSCs location in the ocular surface tissues of the total LSCD model developed in rabbits. hAT-MSCs were located (immunofluorescence against BrdU, in red) in the inflamed areas of the limbal stroma (superior and inferior) 8 weeks after the transplantation. Nuclei stained in blue with Hoechst. Representative images from 5 animals. Scale bar: 50 μ m.

8.5. Phenotypic analysis

Table 5. CK3, E-cadherin, CK15, p63 and CK7 expression in the total LSCD model developed in rabbits. Subjective evaluation: – absence; + mild expression; ++ moderate expression; +++ high expression. SL: superior limbus, CC: central cornea, IL: inferior limbus, CJ: conjunctiva.

	Corneal epithelial cell markers						Limbal stem cell markers						Conjunctival cell marker			
	CK3			E-cadherin			CK15			p63			CK7			
	SL	CC	IL	SL	CC	IL	SL	CC	IL	SL	CC	IL	CJ	SL	CC	IL
Control	+	+++	+	-	+++	-	+++	-	+++	+++	-	+++	+++	+	-	+
Total LSCD	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+++	+	-	+
Total LSCD + AM + hAT-MSCs	++	+	++	++	+++	++	+++	++	+++	-	-	++	+++	+	-	+

The corneal epithelial cell markers CK3 and E-cadherin were not expressed in the epithelium of the total LSCD model. However, the expression of CK3 and E-cadherin was observed in corneal and limbal epithelium of the hAT-MSCs transplanted group. The expression of limbal stem cell markers CK15 and p63 was lost in the limbus of the total LSCD model, but it was partially recovered in the transplanted eyes. No differences were found in the CK7 expression among the different study groups.

DISCUSSION

In vitro studies

In the present study we tried to recreate some of the molecular signals and cues present in both the corneal and limbal microenvironments to analyze the *in vitro* potential of hAT-MSCs for acquiring a corneal epithelial-like cell phenotype. To that end, we cultured hAT-MSCs on plastic and collagen IV with hAT-MSCs BM conditioned with supernatants collected from either corneal epithelial cells or LF culture medium. Collagen IV is the main component of the limbal basement membrane, but it is much less predominant in the central portion of the cornea.^{7,25-27} We used the combination of HCE supernatants together with the absence of collagen IV on the substratum to try to provide signals similar to those contained in the *in vivo* corneal epithelium microenvironment. We also attempted to recreate certain characteristic signals of the *in vivo* limbal niche microenvironment by using the combination of collagen IV as the substratum together with the presence of soluble factors secreted by LF in the culture medium.^{161,174,175}

None of the study conditions affected hAT-MSCs viability. However, the hAT-MSCs cell cycle was affected in cells subjected to the differentiation conditions. There was an increase of quiescent cells and a consequent decrease in the number of cells in division. This is consistent with the well-known observation that the differentiation process is accompanied by a decrease in cell proliferation.¹⁷⁶

hAT-MSCs cultured with HCEcBM acquired epithelial-like growth in monolayers composed of cells with a more polygonal morphology. These cells also had higher complexity and an increase in the content of cytoplasmic granules. This is consistent with previous reports that described a high content of glycogen granules in corneal epithelial cells.¹⁷⁷ Thus, hAT-MSCs could acquire an epithelial-like cell phenotype when they are subjected to a microenvironment containing signals similar to those present in the corneal epithelium microenvironment.

DISCUSSION

In the present work we observed that HCE cells expressed the typical MSCs markers CD73 and CD105. CD73 corresponds to ecto-5'-nucleotidase, which is present in different types of epithelial cells.¹⁷⁸⁻¹⁸⁰ In contrast, for the first time, we identified the expression of CD105, (endoglin, component of the type III receptor for transforming growth factor (TGF)- β)⁹⁷ in an epithelial cell lineage, suggesting that this molecule could mediate a different action of TGF- β in corneal epithelial cells.

The MFI of CD105 increased in cells incubated with HCEcBM while the corresponding CD73 and CD90 did not change significantly. These results agree with a previous work in which hAT-MSCs exposed to conditioned medium underwent differentiation, forming retinal pigment epithelial cells that maintained expression of CD90 protein.¹⁸¹ On the other hand, hAT-MSCs cultured with conditioned medium from renal tubular epithelial cells showed a decrease in the expression of CD90 while CD73 and CD105 levels were maintained.¹⁸² In contrast with our findings, Ho *et al.*¹⁸³ reported that MSCs derived from orbital fat and induced to differentiate into corneal epithelial cells decreased the expression of CD105. These differences could be explained by the different sources of adipose tissue. The CD105 expression found in HCE cells, together with the increased MFI of CD105 in hAT-MSCs incubated with HCEcBM, suggest that in fact this protein could be a good marker for corneal epithelial cell differentiation. In addition, the TGF- β secreted by fibroblasts and corneal epithelial cells has a paracrine or autocrine action, and it is implicated in the natural corneal wound healing process.¹⁸⁴ Altogether these data suggest that the morphological changes and the changes in expression of corneal epithelial markers observed in these cells could be mediated by factors such as TGF- β . This is consistent with the known involvement of TGF- β in the immunomodulatory properties of MSCs as well as in differentiation processes such as mesenchymal-epithelial transition.^{147,185,186}

We analyzed the expression of the well established corneal epithelial markers CK3 and CK12 by RT-PCR, western-blotting, and immunofluorescence microscopy.^{4,5} Both markers were expressed in low levels in hAT-MSCs and LF grown under standard conditions. These data agree with previous studies in which CK3 and CK12 were

expressed in rabbit BM-MSCs and in hAT-MSCs,^{87,150} and some other cytokeratins such as CK18 were expressed in hAT-MSCs.^{108,181,185}

Although the molecular weight of the protein CK12 is 54 KDa, we detected this protein by western-blotting in a band of 108 KDa. This indicates that the CK12 was in a homodimer conformation as reported for keratins that form intermediate filaments.¹⁸⁷

The CK12 protein in hAT-MSCs cultured under standard conditions and grown with BM was expressed throughout the cytoplasm. However, in hAT-MSCs incubated with HCEcBM and LFcBM, the expression of CK12 was located in the perinuclear area. This change could be due to an increase in the synthesis of this protein in the endoplasmic reticulum,¹⁸⁸ as suggested by the greater amounts of CK12 seen in the western-blottings.

Our results showed that CK12 expression increased in hAT-MSCs grown with HCEcBM on plastic; however, the expression of CK3 did not significantly change. Ahmad *et al.*¹⁶¹ obtained an increase of CK12 and CK3 mRNA expression when embryonic stem cells were cultured with epithelial medium conditioned by LF. In those experiments, the expression of CK12 occurred earlier than the peak expression of CK3. Perhaps if our incubation times had been longer we would have observed an incremental increase of CK3 mRNA levels as well. In addition, other research groups observed an increase in the expression of corneal epithelial markers and the acquisition of an epithelial-like phenotype in stem cells incubated with medium conditioned by LF.^{161,175} In our experiments, we found that the expression of corneal epithelial markers in hAT-MSCs grown with HCEcBM was higher than in cells incubated with LFcBM. Ahmad *et al.*¹⁶¹ used embryonic stem cells and Blazejewska *et al.*¹⁷⁵ used hair follicle SCs. These types of stem cells seem, therefore, to behave differently than hAT-MSCs under limbal niche simulated conditions. According to our results, Notara *et al.*¹⁶⁵ observed an increase of the CK2 expression in embryonic stem cells cultivated with culture medium supplemented with EGF on collagen IV. This increase of expression was not noted when cells were cultivated in medium conditioned with LF.

DISCUSSION

Jiang *et al.*⁸¹ induced the differentiation of BM-MSCs into corneal epithelial cells by co-culturing them with corneal stromal cells. The BM-MSCs expressed CK12 protein after 7 days and acquired a corneal epithelial-like phenotype under these conditions. In this way, their results agree with ours. Other research groups have demonstrated that MSCs from bone marrow or limbal stroma cultured with limbal stem cell medium can acquire a corneal epithelial-like phenotype.^{141,142} Furthermore, it has been described that rat AT-MSCs transfected with Pax-6 developed a morphology similar to the epithelial one and expressed CK12.¹⁴³ Related to that, other groups observed that MSCs acquired a corneal epithelial-like phenotype when they were cultured in a decellularized cornea¹⁴⁰ or after their transplantation to injured corneas.^{75,83} However, studies carried out by Ho *et al.*¹⁸³ showed that MSCs derived from subcutaneous adipose tissue had a lower capacity to differentiate into the corneal epithelial phenotype than those obtained from orbital fat. Although their results are not consistent with ours, the differences could be explained by the fact that we cultured the cells for more days and at higher level of confluence, which is a well-known important factor that modulates MSCs differentiation.¹⁶⁰ The increase of CD105 and CK12 expression, together with the acquisition of a more epithelial-like morphology in hAT-MSCs grown with HCEcBM on plastic, indicate that hAT-MSCs subjected to signals similar to those contained in the corneal epithelium can acquire a corneal epithelial-like phenotype. Furthermore, Vossmerbaeumer *et al.*¹⁸¹ differentiated hAT-MSCs into retinal pigment epithelial cells with medium conditioned by those cells.

These results have provided preliminary evidence for the capacity of extraocular hAT-MSCs to acquire certain features of corneal epithelial-like cells by subjecting them to an *in vitro* microenvironment containing signals provided by differentiated corneal epithelial cells.

Ex vivo studies

To study the capacity of the hAT-MSCs to regenerate the epithelial ocular surface it is necessary to establish a cell dose. The MSCs doses published to treat the ocular surface vary significantly, from 100,000 to 10,000,000 cells, depending on the route of administration. The lowest doses are applied topically^{75,76} or seeded on a substrate, mainly AM,^{80,145} whereas the highest doses are administered by intravenous or intraperitoneal injection.^{79,146,190} In our study, the transplantation of the cells was performed on AM because one of the most used treatments consists of the transplantation of limbal cells seeded on AM. Furthermore, this option allows for the application of the cells at the site of injury. Moreover, it has been reported that the intravenous administration of MSCs causes the loss of cells during the migration, due to their accumulation in some organs, such as the lungs.¹⁹¹

The *ex vivo* corneal wound model used to study cell doses had been previously developed by Prof. Julie T. Daniels group.^{73,74} In an initial study, after 2 weeks of transplantation of 250,000, 1,000,000 or 10,000,000 hAT-MSCs, the AM was lifted from the corneoscleral buttons. Unfortunately, cells (hAT-MSCs and cells from the button) remained attached to the AM during its lifting. Thus, cell layers could have been lost during this process and the results would have been affected. For this reason, the same study was performed without lifting the AM from the eyes after 2 weeks in culture. This study was carried out transplanting AM without cells or with 250,000 hAT-MSCs, based on the cell dose used in the clinical trial performed in IOBA with BM-MSCs to treat patients with LSCD (EudraCT: 2010-203535-42; ClinicalTrials.gov: NCT01562002).

Differences were not found between the buttons transplanted with 250,000 hAT-MSCs or without cells. hAT-MSCs together with other cells (non hAT-MSCs) were located in the corneal epithelium of the buttons where the AM was not lifted. Therefore, a very low or absent cell migration was found in the *ex vivo* corneal wound model.

Deshpande *et al.*⁷³ observed that the limbal stem cells, seeded on contact lenses and transplanted in an *ex vivo* corneal wound model in rabbit, migrated to the ocular

DISCUSSION

surface in 3 days. Low cell migration has been recorded in substrates that are very stable for cell adhesion or in those maintained for more than 1 day in culture before transplantation. However, in this study the presence of cells on the contact lenses after lifting them was not studied. Although in our study cells were cultured for 1 day on the AM before transplantation, the AM could represent a very stable substrate for the hAT-MSCs due to the presence of adhesion proteins, such as fibronectin, collagen IV and laminin.¹⁹⁴ This, together with the lack of signals in the tissues to attract hAT-MSCs to the site of injury could explain the low cell migration.

On the other hand, Notara *et al.*^{74,165} transplanted a cell monolayer to the *ex vivo* corneal wound model without a substrate; lifting the cells from the plates and using non-adherent Tegapore™ film. Our study might have shown better results if a similar system had been used.

Other work carried out by the same group demonstrated that the limbal stem cells seeded on poly-lactic-co-glycolic acid membranes and transplanted to the *ex vivo* corneal wound model were found in the ocular surface after 4 weeks.¹⁹⁵ In this case, the membranes were not lifted from the ocular surface, similarly to the second approach of our study.

The absence of conclusive results could be due to the fact that the model used was not adequate to test different cell doses. MSCs need to be attracted to the site of injury by chemokines.^{129,135} The model may have not generated chemokines after the induced damage because it was an *ex vivo* tissue and, therefore, the cells could not migrate. Additionally, the AM could have been a very stable substrate that did not allow the hAT-MSCs to migrate.

***In vivo* studies**

To study the tolerance and efficacy of the hAT-MSCs transplanted onto the ocular surface, it was necessary to develop an *in vivo* LSCD model. Firstly, a LSCD porcine

model was developed. The porcine eye is similar to the human eye, and it has an adequate size to perform surgeries. In addition, porcine corneas have a similar structure to the human cornea, with Bowman membrane. Furthermore, structures similar to palisades of Vogt have been described in the porcine limbus.⁷⁴

A total LSCD porcine model that clinically and pathologically resembles human LSCD was successfully developed by cryogenic injury. This is the first time that a LSCD porcine model has been described. Unfortunately, a significant inflammatory reaction was observed after the transplantation of AM (without cells) to the ocular surface of the LSCD porcine model. This reaction could have been caused by the high resistance of porcine tissues to the passage of the needle during the suturing process. For this reason, the LSCD porcine model was ruled out for the study of new therapies that need to be sutured on the ocular surface. On the other hand, this model could be used to study the pathophysiological and molecular basis of disease and those therapies that could be applied without any surgical sutures, such as those topically, subconjunctivally or systemically administered.^{75,190,196,197}

Secondly, two different LSCD models were developed in rabbits by surgical limbectomy after n-heptanol-based denudation of the corneal surface. As in pigs, the rabbit cornea also has an adequate size to perform surgeries and has structures similar to the human cornea.¹⁹⁸ Furthermore, the LSCD model has been largely developed in rabbits.^{86-88,167} In particular, the kind of injury we used to induce the LSCD models has been previously described in the literature.^{86,87,199}

A partial and mild LSCD model that clinically and pathologically resembles human LSCD was developed by surgical 180° limbectomy (superior and temporal limbus). Neovascularization and corneal opacity were observed during the first weeks after the generation of the injury. Moreover, epithelial defects were partially recovered during the first 2 weeks, as previously described.⁹¹ From the third week onwards these clinical signs became stabilized and they were maintained throughout the follow-up. Thus, and

DISCUSSION

based on the literature,¹⁷³ the third week was selected for the moment of the transplantation.

AM without cells were transplanted to the ocular surface of 3 rabbits with partial LSCD to make sure that an adverse reaction would not occur after surgical suture. Clinical signs did not change after the AM transplantation in comparison with the partial LSCD group without AM. According to our results, there are some other instances where differences were not found after the AM transplantation.^{80,87,167,202} However, other authors noted an improvement in the re-epithelialization process after the AM transplantation.^{81,86,203} These differences could be explained by the variety of models, assessment systems, and techniques used. Perhaps, if the number of animals had been increased, a recovery of the corneal epithelium would have been noted, as has been published.⁴⁹

A total LSCD model that clinically and pathologically resembles human LSCD was generated by surgical 360° limbectomy. Neovascularization and corneal opacity were more severe than in the partial LSCD. These clinical signs were observed from the first weeks after the creation of the injury, as other authors had noted.^{77,88,146,147,207-210} Moreover, epithelial defects were partially recovered during the first 2 weeks and maintained along the follow-up, as has been previously reported.^{167,203,204} In 2 of the 6 rabbits a thick conjunctiva invasion was produced on the cornea surface, indicating that the total LSCD model was more severe than the partial LSCD model. In addition, these results seem to confirm that the limbus acts as a physical barrier between the conjunctiva and the cornea.

After the hAT-MSCs transplantation in the partial LSCD model, clinical signs did not improve. The mildness of the model could explain the lack of improvement in clinical signs. On the other hand, clinical signs did not increase after the hAT-MSCs transplantation. These results indicate that hAT-MSCs were well tolerated in the ocular surface. The cells transplanted to the ocular surface of the rabbits came from human donors. The low immunogenicity allowed for the cells to be well tolerated despite the

fact that a xenotransplant was performed. There are some works where human MSCs were transplanted to the ocular surface of mice,⁷⁵ rats,^{76,80,82} and rabbits^{78,151} without rejection.

Regarding the total LSCD model, the neovascularization and corneal opacity progression was prevented after the hAT-MSCs transplantation. Although a proangiogenic role has been described for MSCs, these cells have anti-angiogenic properties in the ocular surface. A decrease of neovascularization and corneal opacity has been previously demonstrated after the hAT-MSCs administration.^{151,209,211} In addition, there are several authors who have described the improvement of these clinical signs after limbal stroma MSCs or BM-MSCs administration.^{77,79-82,144-148,190,197,211-213} Although epithelial defects were larger in the non-transplanted group, differences were not observed between the non-transplanted and the transplanted group. However, other authors have noted that MSCs contribute to the recovery of corneal epithelium.^{77,81,145,197,211,213} In particular, the capacity of hAT-MSCs to regenerate the corneal epithelium has been published, even in humans.^{75,76,78,151,152,209,214,215} Perhaps if the number of animals had been higher, differences in epithelial defects would have been found.

The presence of inflammatory cells was more important in the limbal stroma of the total LSCD model than in the partial LSCD model. In addition, the stroma was more disorganized in the total LSCD model than in the partial model. This data indicates that the total model was more severe than the partial model, as the clinical evaluation has shown. Histological differences were not found among the study groups of the partial LSCD model. However, in the total LSCD model, a decrease of inflammatory cells and an improvement of the stroma organization were observed in the hAT-MSCs transplanted group. The anti-inflammatory role of hAT-MSCs in the ocular surface has been described by several authors in different chemical burn or LSCD animal models and by diverse administration routes.^{75,76,151,211,214} Moreover, MSCs from limbal stroma or BM-MSCs can reduce the inflammation in the ocular surface, as it has been previously published.^{77,80,81,147,148,190,197,211,216,217} Some of the molecules that could be implicated in

DISCUSSION

this process could be IL-10, TGF- β , and TSG-6. For instance, TSG-6 reduces neutrophils infiltration and cytokines and chemokines secretion in the cornea.^{190,216,218}

Goblet cells were observed in the limbal epithelium of both partial and total LSCD models. These cells were present solely in the central cornea of 3 rabbits from the total LSCD model, corresponding with the thick conjunctiva invasion on the cornea surface. In general, few goblet cells were noted in the corneal epithelium. According to these results, a decrease of goblet cells has been described in chemical burn cases⁴⁰ or in rabbits some weeks after the creation of the injury.^{87,214,219,220}

In the present work, hAT-MSCs migrated to the inflamed areas (limbal stroma) in both, partial and the total LSCD models. In agreement with our results, the migration of topically applied hAT-MSCs to burned cornea and limbus has been described by other authors.^{75,76} Additionally, there are several groups that have demonstrated the migration of limbal stromal MSCs or BM-MSCs to damaged cornea and limbus when they were applied by different routes.^{80,83,146,147,197,213,214,217} On the other hand, in some works, AT-MSCs or BM-MSCs administered by subconjunctival injection have been located only at the injection site, which indicated that cells did not migrate.^{75,77,214} In addition, systemically or intraperitoneally administered MSCs produced therapeutic action in a LSCD model from a distance, without migration.¹⁹⁰ One of the well-known signaling pathways that regulate cell homing is mediated by CXCL12 or SDF-1 and its receptor CXCR4, which is expressed by MSCs.^{191,215} Under inflammation, tissues secrete CXCL12/SDF-1 that attract MSCs.²²¹ Furthermore, in normal conditions CXCL12/SDF-1 is more expressed by the limbal epithelium than by the corneal epithelium, and CXCR4 is located in the limbal stroma rather than in the corneal stroma.^{222,223} Although there is a lack of data about the expression of these molecules in inflamed tissues of the ocular surface, these factors could be implicated in MSCs migration to the cornea and limbus.

Molecular changes were studied by immunofluorescence in the LSCD models developed in rabbits. The expression of the corneal epithelial marker CK3 increased in the limbus of the partial LSCD model, whereas it decreased in the cornea of the total LSCD model.

In the partial LSCD model, the CK3 expression in the limbus could be the result of the limbal stem cell differentiation to recover the corneal epithelium, migrating from the limbus to the central cornea. As in the total LSCD model, a decrease in the expression of the corneal epithelial markers has been demonstrated by other authors using different LSCD models.^{82,167,204,224-228}

Although there were no clinical or histological differences between the partial LSCD group without treatment and the hAT-MSCs transplanted group, molecular changes were noted. After hAT-MSCs transplantation, the CK3 expression was observed not only in the corneal epithelium, but also in the limbal epithelium. These data could be indicating that hAT-MSCs contribute to recover the corneal epithelium by secreting factors that promote the limbal stem cells proliferation and differentiation. An increase of the CK3 and/or CK12 expression in the corneal epithelium has been published after BM-MSCs administration in corneal burn and LSCD models.^{81,82,87,144,215} Lin *et al.*⁷⁵ found that some of the MSCs from orbital fat applied topically were in the cornea and limbus and expressed CK3. Gu *et al.*⁸³ observed that the BM-MSCs transplanted to the ocular surface were located at the corneal epithelium and expressed CK3. However, in other studies, CK3 expression was not found, or it was very low, in the corneal epithelium after the transplantation of AT-MSCs or BM-MSCs.^{80,214}

The intercellular junction protein E-cadherin decreased in the total LSCD model. Therefore, the intercellular junctions of the corneal epithelium were affected in the total LSCD model. According to our results, a decrease in the E-cadherin expression has been described in a model with defects in the development of corneal epithelium.²²⁹

Regarding the total LSCD group transplanted with hAT-MSCs, the expression of E-cadherin was increased not only in the corneal epithelium, but also in the limbal epithelium. These data could be indicating that hAT-MSCs contribute to recover the corneal epithelium. In this way, an increase in the expression of connexin 43 (gap junction protein) has been reported after the BM-MSCs transplantation in a model of LSCD.⁸⁷

DISCUSSION

The expression of the limbal stem cell markers CK15 and p63 was lost in the superior limbus of the partial LSCD model, and in the superior and inferior limbus of the total LSCD model. The loss of limbal stem cell markers has been shown in other LSCD models.^{82,89,225}

CK15 and p63 expression was recovered in the limbal epithelium of the hAT-MSCs transplanted groups. Moreover, other authors noted an increment of the p63 expression after BM-MSCs transplantation in LSCD models.^{82,146,215} However, Reinshagen *et al.* did not find differences in the p63 expression after the BM-MSCs transplantation.⁸⁷

Although some authors advocate the transdifferentiation of MSCs,^{75,81-83,87} only two of them have demonstrated that MSCs expressed CK3 in the corneal epithelium when they were transplanted *in vivo*.^{75,83} Otherwise, our *in vitro* results and other works have shown that MSCs express CK3 in normal conditions, thus the CK3 expression could not be indicating a real transdifferentiation.^{87,150} The transdifferentiation has not been demonstrated in this work, but our results together with those obtained by other authors seem to indicate that MSCs contribute to the recovery of the corneal epithelium by secreting factors that act at a paracrine level. These factors reduce neovascularization, inflammation^{77,80,147} and provide an enabling environment to promote the proliferation and differentiation of the resident stem cells in the tissues.^{230,231} Although the anti-angiogenic, anti-inflammatory capacity of the hAT-MSCs had been previously reported,^{76,151,214} this is the first time that the capability of these cells to recover the corneal and limbal phenotype has been demonstrated in animal models.

Our results suggest that hAT-MSCs transplantation could be a novel therapy to treat patients suffering from ocular surface failure due to LSCD. These cells represent an efficient source of stem cells, whose availability does not present limitations. Furthermore, the immunomodulatory and regenerative properties of these cells may provide therapeutic benefits and reduce health care costs.

CONCLUSIONS

1. Corneal epithelial-like cells can be induced from extraocular hAT-MSCs by subjecting them to an *in vitro* microenvironment containing conditioning signals derived from differentiated human corneal epithelial cells.
2. The *ex vivo* corneal wound model is not a useful model to study the adequate cell dose to transplant to the ocular surface. To carry out this kind of study it would be necessary to perform dose-response assessment in *in vivo* models.
3. The LSCD porcine model is a suitable model to study the pathophysiological and molecular basis of the disease and those therapies that could be applied without surgical suture. However, this model is ruled out for the study of new therapies that need to be sutured on the ocular surface.
4. The partial and total LSCD models closely resemble this human pathology and are thus suitable to test the efficacy of novel therapies in the treatment of inflammation due to epithelial corneal stem cell pathology before being considered for translation into clinical trials.
5. The hAT-MSCs transplanted to the ocular surface are well tolerated, migrate to inflamed tissues, retain the evolution of neovascularization and corneal opacity, and partially restore limbal and corneal epithelial phenotype.
6. Finally, the results of this thesis support hAT-MSCs transplantation as a novel therapy in the treatment of patients suffering from ocular surface failure due to LSCD. These cells represent an efficient source of stem cells, whose availability does not present limitations. Additionally, the immunomodulatory and regenerative properties of these cells will provide therapeutic benefits and reduce health care costs.

REFERENCIAS / REFERENCES

1. Marfurt CF, Cox J, Deek S, Dvorscak L. Anatomy of the human corneal innervation. *Exp. Eye Res.* 2010; 90:478-92.
2. Augusteyn RC, Nankivil D, Mohamed A, Maceo B, Pierre F, Parel JM. Human ocular biometry. *Exp. Eye Res.* 2012; 102:70-5.
3. Ruberti JW, Zieske JD. Prelude to corneal tissue engineering - gaining control of collagen organization. *Prog. Retin. Eye Res.* 2008; 27:549-77.
4. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982; 31:11-24.
5. Kasper M, Moll R, Stosiek P, Karsten U. Patterns of cytokeratin and vimentin expression in the human eye. *Histochemistry* 1988; 89:369-77.
6. Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: Biology and pathology. *Histochem. Cell Biol.* 2008; 129:705-33.
7. Schlotzer-Schrehardt U, Dietrich T, Saito K, Sorokin L, Sasaki T, Paulsson M, Kruse FE. Characterization of extracellular matrix components in the limbal epithelial stem cell compartment. *Exp. Eye Res.* 2007; 85:845-60.
8. Wilson SE, Mohan RR, Mohan RR, Ambrosio R, Jr, Hong J, Lee J. The corneal wound healing response: Cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog. Retin. Eye Res.* 2001; 20:625-37.
9. Bonanno JA. Identity and regulation of ion transport mechanisms in the corneal endothelium. *Prog. Retin. Eye Res.* 2003; 22:69-94.
10. Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J. Cell Biol.* 1986; 103:49-62.
11. Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, Sun TT, Lavker RM. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: Implications on epithelial stem cells. *Cell* 1989; 57:201-9.
12. Li W, Hayashida Y, Chen YT, Tseng SC. Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell Res.* 2007; 17:26-3.
13. Stepp MA, Zieske JD. The corneal epithelial stem cell niche. *Ocul. Surf.* 2005; 3:15-26.
14. Li DQ, Tseng SC. Three patterns of cytokine expression potentially involved in epithelial-fibroblast interactions of human ocular surface. *J. Cell. Physiol.* 1995; 163:61-79.
15. Schlotzer-Schrehardt U, Kruse FE. Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp. Eye Res.* 2005; 81:247-64.
16. Mayer WJ, Irschick UM, Moser P, Wurm M, Huemer HP, Romani N, Irschick EU. Characterization of antigen-presenting cells in fresh and cultured human corneas using novel dendritic cell markers. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007; 48:4459-67.
17. Baum JL. Melanocyte and langerhans cell population of the cornea and limbus in the albino animal. *Am. J. Ophthalmol.* 1970; 69:669-76.
18. Vantrappen L, Geboes K, Missotten L, Maudgal PC, Desmet V. Lymphocytes and langerhans cells in the normal human cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1985; 26:220-5.
19. Davanger M, Evensen A. Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature* 1971; 229:560-1.

REFERENCIAS / REFERENCES

20. Thoft RA, Friend J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 1983; 24:1442-3.
21. Watanabe K, Nishida K, Yamato M, Umemoto T, Sumide T, Yamamoto K, Maeda N, Watanabe H, Okano T, Tano Y. Human limbal epithelium contains side population cells expressing the ATP-binding cassette transporter ABCG2. *FEBS Lett.* 2004; 565:6-10.
22. Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, Fantozzi I, Bondanza S, Ponzin D, McKeon F, De Luca M. P63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2001; 98:3156-61.
23. Yoshida S, Shimmura S, Kawakita T, Miyashita H, Den S, Shimazaki J, Tsubota K. Cytokeratin 15 can be used to identify the limbal phenotype in normal and diseased ocular surfaces. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 2006; 47:4780-6.
24. Figueira EC, Di Girolamo N, Coroneo MT, Wakefield D. The phenotype of limbal epithelial stem cells. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 2007; 48:144-56.
25. Cleutjens JP, Havenith MG, Kasper M, Vallinga M, Bosman FT. Absence of type IV collagen in the centre of the corneal epithelial basement membrane. *Histochem.J.* 1990; 22:688-94.
26. Ishizaki M, Westerhausen-Larson A, Kino J, Hayashi T, Kao WW. Distribution of collagen IV in human ocular tissues. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 1993; 34:2680-9.
27. Kolega J, Manabe M, Sun TT. Basement membrane heterogeneity and variation in corneal epithelial differentiation. *Differentiation* 1989; 42:54-63.
28. Du Y, Funderburgh ML, Mann MM, SundarRaj N, Funderburgh JL. Multipotent stem cells in human corneal stroma. *Stem Cells* 2005; 23:1266-75.
29. Polisetty N, Fatima A, Madhira SL, Sangwan VS, Vemuganti GK. Mesenchymal cells from limbal stroma of human eye. *Mol.Vis.* 2008; 14:431-42.
30. Branch MJ, Hashmani K, Dhillon P, Jones DR, Dua HS, Hopkinson A. Mesenchymal stem cells in the human corneal limbal stroma. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 2012; 53:5109-16.
31. Li GG, Zhu YT, Xie HT, Chen SY, Tseng SC. Mesenchymal stem cells derived from human limbal niche cells. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 2012; 53:5686-97.
32. Espana EM, Kawakita T, Romano A, Di Pascuale M, Smiddy R, Liu CY, Tseng SC. Stromal niche controls the plasticity of limbal and corneal epithelial differentiation in a rabbit model of recombined tissue. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 2003; 44:5130-5.
33. Nakatsu MN, Gonzalez S, Mei H, Deng SX. Human limbal mesenchymal cells support the growth of human corneal epithelial stem/progenitor cells. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 2014; 55:6953-9.
34. Harvey TM, Alzaga Fernandez AG, Patel R, Goldman D, Ciralsky J (2013). *Conjunctival anatomy and physiology.* Holland EJ, Mannis MJ, Lee WB. *Ocular surface disease: Cornea, conjunctiva and tear film* (pp. 23-28). China: Saunders Elsevier.
35. Krenzer KL, Freddo TF. Cytokeratin expression in normal human bulbar conjunctiva obtained by impression cytology. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 1997; 38:142-5.
36. Dua HS, Saini JS, Azuara-Blanco A, Gupta P. Limbal stem cell deficiency: Concept, aetiology, clinical presentation, diagnosis and management. *Indian J.Ophthalmol.* 2000; 48:83-92.
37. Sejpal K, Bakhtiari P, Deng SX. Presentation, diagnosis and management of limbal stem cell deficiency. *Middle East.Afr.J.Ophthalmol.* 2013; 20:5-10.

38. Dua HS, Gomes JA, Singh A. Corneal epithelial wound healing. *Br.J.Ophthalmol.* 1994; 78:401-8.
39. Puangsricharern V, Tseng SC. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 1995; 102:1476-85.
40. Fatima A, Iftexhar G, Sangwan VS, Vemuganti GK. Ocular surface changes in limbal stem cell deficiency caused by chemical injury: A histologic study of excised pannus from recipients of cultured corneal epithelium. *Eye (Lond)* 2008; 22:1161-7.
41. Barbaro V, Ferrari S, Fasolo A, Pedrotti E, Marchini G, Sbabo A, Nettis N, Ponzin D, Di Iorio E. Evaluation of ocular surface disorders: A new diagnostic tool based on impression cytology and confocal laser scanning microscopy. *Br.J.Ophthalmol.* 2010; 94:926-32.
42. Shortt AJ, Secker GA, Munro PM, Khaw PT, Tuft SJ, Daniels JT. Characterization of the limbal epithelial stem cell niche: Novel imaging techniques permit in vivo observation and targeted biopsy of limbal epithelial stem cells. *Stem Cells* 2007; 25:1402-9.
43. Araujo AL, Ricardo JR, Sakai VN, Barros JN, Gomes JA. Impression cytology and in vivo confocal microscopy in corneas with total limbal stem cell deficiency. *Arq.Bras.Oftalmol.* 2013; 76:305-8.
44. Ramirez BE, Victoria DA, Murillo GM, Herreras JM, Calonge M. In vivo confocal microscopy assessment of the corneoscleral limbal stem cell niche before and after biopsy for cultivated limbal epithelial transplantation to restore corneal epithelium. *Histol.Histopathol.* 2015; 30:183-92.
45. Deng SX, Sejjal KD, Tang Q, Aldave AJ, Lee OL, Yu F. Characterization of limbal stem cell deficiency by in vivo laser scanning confocal microscopy: A microstructural approach. *Arch.Ophthalmol.* 2012; 130:440-5.
46. Anderson DF, Ellies P, Pires RT, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for partial limbal stem cell deficiency. *Br.J.Ophthalmol.* 2001; 85:567-75.
47. Dua HS, Gomes JA, King AJ, Maharajan VS. The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv.Ophthalmol.* 2004; 49:51-77.
48. Akle CA, Adinolfi M, Welsh KI, Leibowitz S, McColl I. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet* 1981; 2:1003-5.
49. Lee SH, Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am.J.Ophthalmol.* 1997; 123:303-12.
50. Choi TH, Tseng SC. In vivo and in vitro demonstration of epithelial cell-induced myofibroblast differentiation of keratocytes and an inhibitory effect by amniotic membrane. *Cornea* 2001; 20:197-204.
51. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. *Cornea* 2000; 19:348-52.
52. Talmi YP, Sigler L, Inge E, Finkelstein Y, Zohar Y. Antibacterial properties of human amniotic membranes. *Placenta* 1991; 12:285-8.
53. Kenyon KR, Tseng SC. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* 1989; 96:709,22; discussion 722-3.
54. Tsubota K, Satake Y, Kaido M, Shinozaki N, Shimmura S, Bissen-Miyajima H, Shimazaki J. Treatment of severe ocular-surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation. *N.Engl.J.Med.* 1999; 340:1697-703.
55. Torres J, Fernandez I, Quadrado MJ, Murta J, Herreras J, Rodriguez-Ares MT, itez-del-Castillo JM, Alio J, Munoz MF, Calonge M. [Limbal transplantation: Multicenter

REFERENCIAS / REFERENCES

- retrospective case series analysis]. *Arch.Soc.Esp.Oftalmol.* 2008; 83:417-22.
56. Daya SM, Bell RW, Habib NE, Powell-Richards A, Dua HS. Clinical and pathologic findings in human keratolimbal allograft rejection. *Cornea* 2000; 19:443-50.
57. Vazirani J, Lal I, Sangwan V. Customised simple limbal epithelial transplantation for recurrent limbal stem cell deficiency. *BMJ Case Rep.* 2015; 2015:10.1136/bcr.2015-209429.
58. Oh JY, Ko JH, Lee HJ, Kim MK, Lee JH, Wee WR. The antigenicity of ex vivo cultivated human corneal limbal epithelial and stromal cells: Temporal changes in vitro. *Cornea* 2010; 29:1302-7.
59. Shortt AJ, Secker GA, Notara MD, Limb GA, Khaw PT, Tuft SJ, Daniels JT. Transplantation of ex vivo cultured limbal epithelial stem cells: A review of techniques and clinical results. *Surv.Ophthalmol.* 2007; 52:483-502.
60. Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 1997; 349:990-3.
61. Menzel-Severing J, Kruse FE, Schlotzer-Schrehardt U. Stem cell-based therapy for corneal epithelial reconstruction: Present and future. *Can.J.Ophthalmol.* 2013; 48:13-21.
62. Hsu CC, Peng CH, Hung KH, Lee YY, Lin TC, Jang SF, Liu JH, Chen YT, Woung LC, Wang CY, Tsa CY, Chiou SH, Chen SJ, Chang YL. Stem cell therapy for corneal regeneration medicine and contemporary nanomedicine for corneal disorders. *Cell Transplant.* 2014. Epub ahead of print.
63. Feng Y, Borrelli M, Reichl S, Schrader S, Geerling G. Review of alternative carrier materials for ocular surface reconstruction. *Curr.Eye Res.* 2014; 39:541-52.
64. Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E, Nagai S, Kikuchi A, Maeda N, Watanabe H, Okano T, Tano Y. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N.Engl.J.Med.* 2004; 351:1187-96.
65. Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Amemiya T, Kanamura N, Kinoshita S. Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *Br.J.Ophthalmol.* 2004; 88:1280-4.
66. Madhira SL, Vemuganti G, Bhaduri A, Gaddipati S, Sangwan VS, Ghanekar Y. Culture and characterization of oral mucosal epithelial cells on human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Mol.Vis.* 2008; 14:189-96.
67. Shortt AJ, Secker GA, Rajan MS, Meligonis G, Dart JK, Tuft SJ, Daniels JT. Ex vivo expansion and transplantation of limbal epithelial stem cells. *Ophthalmology* 2008; 115:1989-97.
68. Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, De LM, Pellegrini G. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N.Engl.J.Med.* 2010; 363:147-55.
69. Kolli S, Ahmad S, Lako M, Figueiredo F. Successful clinical implementation of corneal epithelial stem cell therapy for treatment of unilateral limbal stem cell deficiency. *Stem Cells* 2010; 28:597-610.
70. Baylis O, Figueiredo F, Henein C, Lako M, Ahmad S. 13 years of cultured limbal epithelial cell therapy: A review of the outcomes. *J.Cell.Biochem.* 2011; 112:993-1002.
71. Ramírez B, Sánchez A, Herreras J, Fernández I, García-Sancho J, Nieto-Miguel T, Calonge M. Stem cell therapy for corneal epithelium regeneration following good manufacturing and clinical procedures. 2015; 2015: Article ID 408495, 19 pages.

72. O'Callaghan AR, Daniels JT. Concise review: Limbal epithelial stem cell therapy: Controversies and challenges. *Stem Cells* 2011; 29:1923-32.
73. Deshpande P, Notara M, Bullett N, Daniels JT, Haddow DB, MacNeil S. Development of a surface-modified contact lens for the transfer of cultured limbal epithelial cells to the cornea for ocular surface diseases. *Tissue Eng. Part A*. 2009; 15:2889-902.
74. Notara M, Schrader S, Daniels JT. The porcine limbal epithelial stem cell niche as a new model for the study of transplanted tissue-engineered human limbal epithelial cells. *Tissue Eng Part A* 2011; 17:741-50.
75. Lin KJ, Loi MX, Lien GS, Cheng CF, Pao HY, Chang YC, Ji AT, Ho JH. Topical administration of orbital fat-derived stem cells promotes corneal tissue regeneration. *Stem Cell. Res. Ther.* 2013; 4:72.
76. Zeppieri M, Salvatat ML, Beltrami AP, Cesselli D, Bergamin N, Russo R, Cavaliere F, Varano GP, Alcalde I, Merayo J, Brusini P, Beltrami CA, Parodi PC. Human adipose-derived stem cells for the treatment of chemically burned rat cornea: Preliminary results. *Curr. Eye Res.* 2013; 38:451-63.
77. Yao L, Li ZR, Su WR, Li YP, Lin ML, Zhang WX, Liu Y, Wan Q, Liang D. Role of mesenchymal stem cells on cornea wound healing induced by acute alkali burn. *PLoS One* 2012; 7:e30842.
78. Lin HF, Lai YC, Tai CF, Tsai JL, Hsu HC, Hsu RF, Lu SN, Feng NH, Chai CY, Lee CH. Effects of cultured human adipose-derived stem cells transplantation on rabbit cornea regeneration after alkaline chemical burn. *Kaohsiung J. Med. Sci.* 2013; 29:14-8.
79. Lee RH, Yu JM, Foscett AM, Peltier G, Reneau JC, Bazhanov N, Oh JY, Prockop DJ. TSG-6 as a biomarker to predict efficacy of human mesenchymal stem/progenitor cells (hMSCs) in modulating sterile inflammation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014; 111:16766-71.
80. Ma Y, Xu Y, Xiao Z, Yang W, Zhang C, Song E, Du Y, Li L. Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24:315-21.
81. Jiang TS, Cai L, Ji WY, Hui YN, Wang YS, Hu D, Zhu J. Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats. *Mol. Vis.* 2010; 16:1304-16.
82. Rohaina CM, Then KY, Ng AM, Wan Abdul Halim WH, Zahidin AZ, Saim A, Idrus RB. Reconstruction of limbal stem cell deficient corneal surface with induced human bone marrow mesenchymal stem cells on amniotic membrane. *Transl. Res.* 2014; 163:200-1.
83. Gu S, Xing C, Han J, Tso MO, Hong J. Differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells into corneal epithelial cells in vivo and ex vivo. *Mol. Vis.* 2009; 15:99-107.
84. Ho TC, Chen SL, Wu JY, Ho MY, Chen LJ, Hsieh JW, Cheng HC, Tsao YP. PEDF promotes self-renewal of limbal stem cell and accelerates corneal epithelial wound healing. *Stem Cells* 2013; 31:1775-84.
85. Talbot M, Carrier P, Giasson CJ, Deschambeault A, Guerin SL, Auger FA, Bazin R, Germain L. Autologous transplantation of rabbit limbal epithelia cultured on fibrin gels for ocular surface reconstruction. *Mol. Vis.* 2006; 12:65-7.
86. Higa K, Shimmura S, Kato N, Kawakita T, Miyashita H, Itabashi Y, Fukuda K, Shimazaki J, Tsubota K. Proliferation and differentiation of transplantable rabbit epithelial sheets engineered with or without an amniotic membrane carrier. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007; 48:597-604.
87. Reinshagen H, uw-Haedrich C, Sorg RV, Boehringer D, Eberwein P, Schwartzkopff J,

REFERENCIAS / REFERENCES

- Sundmacher R, Reinhard T. Corneal surface reconstruction using adult mesenchymal stem cells in experimental limbal stem cell deficiency in rabbits. *Acta Ophthalmol.* 2009; 89:741-8.
88. Xu B, Fan TJ, Zhao J, Sun A, Wang RX, Hu XZ, Yu HZ, Fan XY, Xu XH. Transplantation of tissue-engineered human corneal epithelium in limbal stem cell deficiency rabbit models. *Int.J.Ophthalmol.* 2012; 5:424-9.
89. Lin Z, He H, Zhou T, Liu X, Wang Y, He H, Wu H, Liu Z. A mouse model of limbal stem cell deficiency induced by topical medication with the preservative benzalkonium chloride. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 2013; 54:6314-25.
90. Das P, Pereira JA, Chaklader M, Law A, Bagchi K, Bhaduri G, Chaudhuri S, Law S. Phenotypic alteration of limbal niche-associated limbal epithelial stem cell deficiency by ultraviolet-B exposure-induced phototoxicity in mice. *Biochem.Cell Biol.* 2013; 91:165-7.
91. Chen JJ, Tseng SC. Corneal epithelial wound healing in partial limbal deficiency. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 1990; 31:1301-14.
92. Yeh SI, Ho TC, Chen SL, Chen CP, Cheng HC, Lan YW, Hsieh JW, Wang CT, Tsao YP. Pigment epithelial-derived factor peptide facilitates the regeneration of a functional limbus in rabbit partial limbal deficiency. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 2015; 56:2126-34.
93. Jackson L, Jones DR, Scotting P, Sottile V. Adult mesenchymal stem cells: Differentiation potential and therapeutic applications. *J.Postgrad.Med.* 2007; 53:121-7.
94. Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J.Cell.Biochem.* 2009; 106:984-91.
95. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968; 6:230-47.
96. Dominici M, Le BK, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. the international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8:315-7.
97. Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, Letarte M. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J.Biol.Chem.* 1992; 267:19027-30.
98. Valluru M, Staton CA, Reed MW, Brown NJ. Transforming growth factor-beta and endoglin signaling orchestrate wound healing. *Front.Physiol.* 2011; 2:89.
99. Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal.* 2006; 2:351-60.
100. Kisselbach L, Merges M, Bossie A, Boyd A. CD90 expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures. *Cytotechnology* 2009; 59:31-44.
101. Caignard G, Leiva-Torres GA, Leney-Greene M, Charbonneau B, Dumaine A, Fodil-Cornu N, Pyzik M, Cingolani P, Schwartzentruber J, Dupaul-Chicoine J, Guo H, Saleh M, Veillette A, Lathrop M, Blanchette M, Majewski J, Pearson A, Vidal SM. Genome-wide mouse mutagenesis reveals CD45-mediated T cell function as critical in protective immunity to HSV-1. *PLoS Pathog.* 2013; 9:e1003637.
102. Nielsen JS, McNagny KM. Novel functions of the CD34 family. *J.Cell.Sci.* 2008; 121:3683-92.
103. Ranoa DR, Kelley SL, Tapping RI. Human lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and CD14 independently deliver triacylated lipoproteins to toll-like receptor 1 (TLR1) and TLR2 and enhance formation of the ternary

- signaling complex. *J.Biol.Chem.* 2013; 288:9729-41.
104. Hawley KL, Olson CM,Jr, Iglesias-Pedraz JM, Navasa N, Cervantes JL, Caimano MJ, Izadi H, Ingalls RR, Pal U, Salazar JC, Radolf JD, Anguita J. CD14 cooperates with complement receptor 3 to mediate MyD88-independent phagocytosis of borrelia burgdorferi. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2012; 109:1228-32.
105. Horvath G, Serru V, Clay D, Billard M, Boucheix C, Rubinstein E. CD19 is linked to the integrin-associated tetraspans CD9, CD81, and CD82. *J.Biol.Chem.* 1998; 273:30537-43.
106. Chu PG, Arber DA. CD79: A review. *Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.* 2001; 9:97-106.
107. Newman RE, Yoo D, LeRoux MA, Danilkovitch-Miagkova A. Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells. *Inflamm.Allergy Drug Targets* 2009; 8:110-23.
108. Brzoska M, Geiger H, Gauer S, Baer P. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2005; 330:142-50.
109. Chun-mao H, Su-yi W, Ping-ping L, Hang-hui C. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiate into epidermal-like cells in vitro. *Differentiation* 2007; 75:292-8.
110. Baer PC. Adipose-derived stem cells and their potential to differentiate into the epithelial lineage. *Stem Cells Dev.* 2011; 20:1805-16.
111. Baer PC, Doring C, Hansmann ML, Schubert R, Geiger H. New insights into epithelial differentiation of human adipose-derived stem cells. *J.Tissue Eng.Regen.Med.* 2011; 7:271-8.
112. Paunescu V, Deak E, Herman D, Siska IR, Tanasie G, Bunu C, Anghel S, Tatu CA, Oprea TI, Henschler R, Ruster B, Bistran R, Seifried E. In vitro differentiation of human mesenchymal stem cells to epithelial lineage. *J.Cell.Mol.Med.* 2007; 11:502-8.
113. Ma N, Gai H, Mei J, Ding FB, Bao CR, Nguyen DM, Zhong H. Bone marrow mesenchymal stem cells can differentiate into type II alveolar epithelial cells in vitro. *Cell Biol.Int.* 2011; 35:1261-6.
114. Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, Sanderson EA, Summer RS, Williams MC, Fine A. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development* 2001; 128:5181-8.
115. Wan JX, Zou ZH, You DY, Cui J, Pan YB. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiation into tubular epithelial-like cells in vitro. *Cell Biochem.Funct.* 2011; 30:129-38.
116. Morigi M, Benigni A, Remuzzi G, Imberti B. The regenerative potential of stem cells in acute renal failure. *Cell Transplant.* 2006; 15 Suppl 1:S111-7.
117. Okamoto R, Yajima T, Yamazaki M, Kanai T, Mukai M, Okamoto S, Ikeda Y, Hibi T, Inazawa J, Watanabe M. Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat.Med.* 2002; 8:1011-7.
118. Huang C, Zhang J, Ao M, Li Y, Zhang C, Xu Y, Li X, Wang W. Combination of retinal pigment epithelium cell-conditioned medium and photoreceptor outer segments stimulate mesenchymal stem cell differentiation toward a functional retinal pigment epithelium cell phenotype. *J.Cell.Biochem.* 2012; 113:590-8.
119. Gong L, Wu Q, Song B, Lu B, Zhang Y. Differentiation of rat mesenchymal stem cells transplanted into the subretinal space of sodium iodate-injected rats. *Clin.Experiment.Ophthalmol.* 2008; 36:666-71.

REFERENCIAS / REFERENCES

120. Hou GH, Ye N, Wu J, Xu JT, Shi WJ, Chen Y, Liu XH, Zhang ZH. [Preliminary study on human bone marrow mesenchymal stem cells differentiation into epithelial-like cells.]. *Zhonghua Yan.Ke.Za Zhi*. 2010; 46:719-24.
121. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: Implications in transplantation. *Transplantation* 2003; 75:389-97.
122. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu.Rev.Immunol.* 2001; 19:197-223.
123. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E, Rachmilewitz J. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 2005; 105:2214-9.
124. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105:1815-22.
125. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, Mao N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2005; 105:4120-6.
126. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 2006; 107:367-72.
127. Plumas J, Chaperot L, Richard MJ, Molens JP, Bensa JC, Favrot MC. Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells. *Leukemia* 2005; 19:1597-604.
128. Joe AW, Gregory-Evans K. Mesenchymal stem cells and potential applications in treating ocular disease. *Curr.Eye Res.* 2010; 35:941-52.
129. Ren G, Chen X, Dong F, Li W, Ren X, Zhang Y, Shi Y. Concise review: Mesenchymal stem cells and translational medicine: Emerging issues. *Stem Cells Transl.Med.* 2012; 1:51-8.
130. Soleymaninejadian E, Pramanik K, Samadian E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: Cytokines and factors. *Am.J.Reprod.Immunol.* 2012; 67:1-8.
131. Holan V, Javorkova E. Mesenchymal stem cells, nanofiber scaffolds and ocular surface reconstruction. *Stem Cell.Rev.* 2013; 9:609-1.
132. Usunier B, Benderitter M, Tamarat R, Chapel A. Management of fibrosis: The mesenchymal stromal cells breakthrough. *Stem Cells Int.* 2014; 2014:340257.
133. Oh JY, Kim MK, Shin MS, Wee WR, Lee JH. Cytokine secretion by human mesenchymal stem cells cocultured with damaged corneal epithelial cells. *Cytokine* 2009; 46:100-3.
134. Zak S, Treven J, Nash N, Gutierrez LS. Lack of thrombospondin-1 increases angiogenesis in a model of chronic inflammatory bowel disease. *Int.J.Colorectal Dis.* 2008; 23:297-304.
135. 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; 25:2739-4.
136. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001; 7:211-28.
137. Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, Slaby O, Michalek J. Same or not the same? comparison of adipose tissue-derived versus

- bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev.* 2012; 21:2724-52.
138. Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Dimitrov R, Bukarev D, Kyurkchiev S, Tivchev P, Altunkova I, Kyurkchiev DS. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunol.Lett.* 2009; 126:37-42.
139. Harkin DG, Foyn L, Bray LJ, Sutherland AJ, Li FJ, Cronin BG. Concise reviews: Can mesenchymal stromal cells differentiate into corneal cells? A systematic review of published data. *Stem Cells* 2015; 33:785-91.
140. Zhang J, Huang C, Feng Y, Li Y, Wang W. Comparison of beneficial factors for corneal wound-healing of rat mesenchymal stem cells and corneal limbal stem cells on the xenogeneic acellular corneal matrix in vitro. *Mol.Vis.* 2012; 18:161-73.
141. Katikireddy KR, Dana R, Jurkunas UV. Differentiation potential of limbal fibroblasts and bone marrow mesenchymal stem cells to corneal epithelial cells. *Stem Cells* 2014; 32:717-29.
142. Hashmani K, Branch MJ, Sidney LE, Dhillon PS, Verma M, McIntosh OD, Hopkinson A, Dua HS. Characterization of corneal stromal stem cells with the potential for epithelial transdifferentiation. *Stem Cell.Res.Ther.* 2013; 4:75.
143. Liu W, Liu Y, Liu H, Luo Y, Xu J. Differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells after transfection with Pax6 gene. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2014; 28:1004-8.
144. Guo T, Wang W, Zhang J, Chen X, Li BZ, Li LS. [Experimental study on repairing damage of corneal surface by mesenchymal stem cells transplantation]. *Zhonghua Yan.Ke.Za Zhi.* 2006; 42:246-50.
145. Pinarli FA, Okten G, Beden U, Fisgin T, Kefeli M, Kara N, Duru F, Tomak L. Keratinocyte growth factor-2 and autologous serum potentiate the regenerative effect of mesenchymal stem cells in cornea damage in rats. *Int.J.Ophthalmol.* 2014; 7:211-9.
146. Ye J, Yao K, Kim JC. Mesenchymal stem cell transplantation in a rabbit corneal alkali burn model: Engraftment and involvement in wound healing. *Eye (Lond)* 2006; 20:482-90.
147. Oh JY, Kim MK, Shin MS, Lee HJ, Ko JH, Wee WR, Lee JH. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. *Stem Cells* 2008; 26:1047-55.
148. Cejkova J, Trosan P, Cejka C, Lencova A, Zajicova A, Javorkova E, Kubinova S, Sykova E, Holan V. Suppression of alkali-induced oxidative injury in the cornea by mesenchymal stem cells growing on nanofiber scaffolds and transferred onto the damaged corneal surface. *Exp.Eye Res.* 2013; 116:312-23.
149. Lee JY, Jeong HJ, Kim MK, Wee WR. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells affect immunologic profiling of interleukin-17-secreting cells in a chemical burn mouse model. *Korean J.Ophthalmol.* 2014; 28:246-5.
150. Martinez-Conesa EM, Espel E, Reina M, Casaroli-Marano RP. Characterization of ocular surface epithelial and progenitor cell markers in human adipose stromal cells derived from lipoaspirates. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 2011; 53:513-20.
151. Espandar L, Caldwell D, Watson R, Blanco-Mezquita T, Zhang S, Bunnell B. Application of adipose-derived stem cells on scleral contact lens carrier in an animal model of severe acute alkaline burn. *Eye Contact Lens* 2014; 40:243-7.
152. Agorogiannis GI, Alexaki VI, Castana O, Kymionis GD. Topical application of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells (MSCs) for persistent sterile corneal

REFERENCIAS / REFERENCES

- epithelial defect. Graefes Arch.Clin.Exp.Ophthalmol. 2011; 250:455-7.
153. Du Y, Roh DS, Funderburgh ML, Mann MM, Marra KG, Rubin JP, Li X, Funderburgh JL. Adipose-derived stem cells differentiate to keratocytes in vitro. Mol.Vis. 2010; 16:2680-9.
154. Zhang S, Espandar L, Imhof KM, Bunnell BA. Differentiation of human adipose-derived stem cells along the keratocyte lineage. J.Clin.Exp.Ophthalmol. 2013; 4:11435.
155. Arnalich-Montiel F, Pastor S, Blazquez-Martinez A, Fernandez-Delgado J, Nistal M, Alio JL, De Miguel MP. Adipose-derived stem cells are a source for cell therapy of the corneal stroma. Stem Cells 2008; 26:570-9.
156. Alio Del Barrio JL, Chiesa M, Garagorri N, Garcia-Urquia N, Fernandez-Delgado J, Bataille L, Rodriguez A, Arnalich-Montiel F, Zarnowski T, Alvarez de Toledo JP, Alio JL, De Miguel MP. Acellular human corneal matrix sheets seeded with human adipose-derived mesenchymal stem cells integrate functionally in an experimental animal model. Exp.Eye Res. 2015; 132C:91-100.
157. Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Corneal blindness: A global perspective. Bull.World Health Organ. 2001; 79:214-21.
158. Araki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T, Hayashi K, Watanabe H, Tano Y, Handa H. An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. Invest.Ophthalmol.Vis.Sci. 1995; 36:614-21.
159. Greco D, Vellonen KS, Turner HC, Hakli M, Tervo T, Auvinen P, Wolosin JM, Urtti A. Gene expression analysis in SV-40 immortalized human corneal epithelial cells cultured with an air-liquid interface. Mol.Vis. 2010; 16:2109-20.
160. Gregory CA, Singh H, Perry AS, Prockop DJ. The wnt signaling inhibitor dickkopf-1 is required for reentry into the cell cycle of human adult stem cells from bone marrow. J.Biol.Chem. 2003; 278:28067-78.
161. Ahmad S, Stewart R, Yung S, Kolli S, Armstrong L, Stojkovic M, Figueiredo F, Lako M. Differentiation of human embryonic stem cells into corneal epithelial-like cells by in vitro replication of the corneal epithelial stem cell niche. Stem Cells 2007; 25:1145-5.
162. Ahmad S, Stewart R, Yung S, Kolli S, Armstrong L, Stojkovic M, Figueiredo F, Lako M. Differentiation of human embryonic stem cells into corneal epithelial-like cells by in vitro replication of the corneal epithelial stem cell niche. Stem Cells 2007; 25:1145-5.
163. Versura P, Maltarello MC, Cellini M, Marinelli F, Caramazza R, Laschi R. Detection of mucus glycoconjugates in human conjunctiva by using the lectin-colloidal gold technique in TEM. III. A quantitative study in asymptomatic contact lens wearers. Acta Ophthalmol.(Copenh) 1987; 65:661-7.
164. Tseng SC. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. Biosci.Rep. 2001; 21:481-9.
165. Notara M, Hernandez D, Mason C, Daniels JT. Characterization of the phenotype and functionality of corneal epithelial cells derived from mouse embryonic stem cells. Regen.Med. 2012; 7:167-78.
166. Cintron C, Hassingel L, Kublin CL, Friend J. A simple method for the removal of rabbit corneal epithelium utilizing n-heptanol. 1979; 11:90-6.
167. Wan P, Wang X, Ma P, Gao N, Ge J, Mou Y, Wang Z. Cell delivery with fixed amniotic membrane reconstructs corneal epithelium in rabbits with limbal stem cell deficiency. Invest.Ophthalmol.Vis.Sci. 2011; 52:724-30.
168. Efron N. Grading scales for contact lens complications. Ophthalmic Physiol.Opt. 1998; 18:182-6.
169. Tseng SC. Staging of conjunctival squamous metaplasia by impression cytology. Ophthalmology 1985; 92:728-33.

170. Franke WW, Grund C, Kuhn C, Jackson BW, Illmensee K. Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. III. primary mesenchymal cells and the first appearance of vimentin filaments. *Differentiation* 1982; 23:43-59.
171. Henniker AJ. CD90. *J.Biol.Regul.Homeost.Agents* 2001; 15:392-3.
172. Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, Neilson EG. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J.Cell Biol.* 1995; 130:393-405.
173. Hayashida Y, Nishida K, Yamato M, Watanabe K, Maeda N, Watanabe H, Kikuchi A, Okano T, Tano Y. Ocular surface reconstruction using autologous rabbit oral mucosal epithelial sheets fabricated ex vivo on a temperature-responsive culture surface. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 2005; 46:1632-9.
174. Homma R, Yoshikawa H, Takeno M, Kurokawa MS, Masuda C, Takada E, Tsubota K, Ueno S, Suzuki N. Induction of epithelial progenitors in vitro from mouse embryonic stem cells and application for reconstruction of damaged cornea in mice. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 2004; 45:4320-6.
175. Blazejewska EA, Schlotzer-Schrehardt U, Zenkel M, Bachmann B, Chankiewicz E, Jacobi C, Kruse FE. Corneal limbal microenvironment can induce transdifferentiation of hair follicle stem cells into corneal epithelial-like cells. *Stem Cells* 2009; 27:642-5.
176. Jetten AM, Shirley JE, Stoner G. Regulation of proliferation and differentiation of respiratory tract epithelial cells by TGF beta. *Exp.Cell Res.* 1986; 167:539-4.
177. McTigue JW. The human cornea: A light and electron microscopic study of the normal cornea and its alterations in various dystrophies. *Trans.Am.Ophthalmol.Soc.* 1967; 65:591-660.
178. Eldred JA, Sanderson J, Wormstone M, Reddan JR, Duncan G. Stress-induced ATP release from and growth modulation of human lens and retinal pigment epithelial cells. *Biochem.Soc.Trans.* 2003; 31:1213-5.
179. Mohlin C, Save S, Nilsson M, Persson K. Studies of the extracellular ATP-adenosine pathway in human urinary tract epithelial cells. *Pharmacology* 2009; 84:196-202.
180. Weissmuller T, Campbell EL, Rosenberger P, Scully M, Beck PL, Furuta GT, Colgan SP. PMNs facilitate translocation of platelets across human and mouse epithelium and together alter fluid homeostasis via epithelial cell-expressed ecto-NTPDases. *J.Clin.Invest.* 2008; 118:3682-9.
181. Vossmerbaeumer U, Ohnesorge S, Kuehl S, Haapalahti M, Kluter H, Jonas JB, Thierse HJ, Bieback K. Retinal pigment epithelial phenotype induced in human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2009; 11:177-88.
182. Baer PC, Bereiter-Hahn J, Missler C, Brzoska M, Schubert R, Gauer S, Geiger H. Conditioned medium from renal tubular epithelial cells initiates differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cell Prolif.* 2009; 42:29-37.
183. Ho JH, Ma WH, Tseng TC, Chen YF, Chen MH, Lee OK. Isolation and characterization of multi-potent stem cells from human orbital fat tissues. *Tissue Eng Part A* 2010; 17:255-66.
184. Secker GA, Shortt AJ, Sampson E, Schwarz QP, Schultz GS, Daniels JT. TGFbeta stimulated re-epithelialisation is regulated by CTGF and ras/MEK/ERK signalling. *Exp.Cell Res.* 2008; 314:131-42.
185. Saulnier N, Piscaglia AC, Puglisi MA, Barba M, Arena V, Pani G, Alfieri S, Gasbarrini A. Molecular mechanisms underlying human adipose tissue-derived stromal cells differentiation into a hepatocyte-like phenotype. *Dig.Liver Dis.* 2010; 42:895-901.

REFERENCIAS / REFERENCES

186. Roelen BA, Dijke P. Controlling mesenchymal stem cell differentiation by TGF β family members. *J.Orthop.Sci.* 2003; 8:740-8.
187. Downing DT. Molecular modeling indicates that homodimers form the basis for intermediate filament assembly from human and mouse epidermal keratins. *Proteins* 1995; 23:204-17.
188. Hovland R, Hesketh JE, Pryme IF. The compartmentalization of protein synthesis: Importance of cytoskeleton and role in mRNA targeting. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 1996; 28:1089-105.
189. Ye J, Yao K, Kim JC. Mesenchymal stem cell transplantation in a rabbit corneal alkali burn model: Engraftment and involvement in wound healing. *Eye (Lond)* 2006; 20:482-90.
190. Roddy GW, Oh JY, Lee RH, Bartosh TJ, Ylostalo J, Coble K, Rosa RH, Jr, Prockop DJ. Action at a distance: Systemically administered adult stem/progenitor cells (MSCs) reduce inflammatory damage to the cornea without engraftment and primarily by secretion of TNF- α stimulated gene/protein 6. *Stem Cells* 2011; 29:1572-9.
191. Sohni A, Verfaillie CM. Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. *Stem Cells Int.* 2013; 2013:130763.
192. Minami Y, Sugihara H, Oono S. Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen gel matrix culture. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 1993; 34:2316-24.
193. Deshpande P, Ortega I, Sefat F, Sangwan VS, Green N, Claeysens F, MacNeil S. Rocking media over ex vivo corneas improves this model and allows the study of the effect of proinflammatory cytokines on wound healing. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 2015; 56:1553-61.
194. Lim LS, Riau A, Poh R, Tan DT, Beuerman RW, Mehta JS. Effect of dispase denudation on amniotic membrane. *Mol.Vis.* 2009; 15:1962-70.
195. Deshpande P, Ramachandran C, Sefat F, Mariappan I, Johnson C, McKean R, Hannah M, Sangwan VS, Claeysens F, Ryan AJ, MacNeil S. Simplifying corneal surface regeneration using a biodegradable synthetic membrane and limbal tissue explants. *Biomaterials* 2013; 34:5088-106.
196. Dal Pizzol MM, Roggia MF, Kwitko S, Marinho DR, Rymer S. Use of fibrin glue in ocular surgery. *Arq.Bras.Oftalmol.* 2009; 72:308-12.
197. Acar U, Pinarli FA, Acar DE, Beyazyildiz E, Sobaci G, Ozgermen BB, Sonmez AA, Delibas T. Effect of allogeneic limbal mesenchymal stem cell therapy in corneal healing: Role of administration route. *Ophthalmic Res.* 2015; 53:82-9.
198. Hayashi S, Osawa T, Tohyama K. Comparative observations on corneas, with special reference to bowman's layer and descemet's membrane in mammals and amphibians. *J.Morphol.* 2002; 254:247-58.
199. Omoto M, Miyashita H, Shimmura S, Higa K, Kawakita T, Yoshida S, McGrogan M, Shimazaki J, Tsubota K. The use of human mesenchymal stem cell-derived feeder cells for the cultivation of transplantable epithelial sheets. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 2009; 50:2109-15.
200. Goldberg MF, Bron AJ. Limbal palisades of vogt. *Trans.Am.Ophthalmol.Soc.* 1982; 80:155-71.
201. Townsend WM. The limbal palisades of vogt. *Trans.Am.Ophthalmol.Soc.* 1991; 89:721-56.
202. Du Y, Chen J, Funderburgh JL, Zhu X, Li L. Functional reconstruction of rabbit corneal epithelium by human limbal cells cultured on amniotic membrane. *Mol.Vis.* 2003; 9:635-43.
203. Guo Q, Hao J, Yang Q, Guan L, Ouyang S, Wang J. A comparison of the effectiveness between amniotic membrane homogenate and transplanted amniotic membrane in

- healing corneal damage in a rabbit model. *Acta Ophthalmol.* 2011; 89:e315-9.
204. Zhang W, Yang W, Liu X, Zhang L, Huang W, Zhang Y. Rapidly constructed scaffold-free embryonic stem cell sheets for ocular surface reconstruction. *Scanning* 2014; 36:286-92.
205. Gris O, Guell JL, Lopez-Navidad A, Caballero F, Del Campo Z. Application of the amniotic membrane in ocular surface pathology. *Ann.Transplant.* 1999; 4:82-4.
206. Ti SE, Anderson D, Touhami A, Kim C, Tseng SC. Factors affecting outcome following transplantation of ex vivo expanded limbal epithelium on amniotic membrane for total limbal deficiency in rabbits. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 2002; 43:2584-92.
207. Liu BQ, Wang ZC, Liu LM, Liu JB, Li NY, Wang LN, Ma P, Jiang RZ, Ge J. Sutureless fixation of amniotic membrane patch as a therapeutic contact lens by using a polymethyl methacrylate ring and fibrin sealant in a rabbit model. *Cornea* 2008; 27:74-9.
208. Figueroa-Ortiz LC, Martin Rodriguez O, Garcia-Ben A, Garcia-Campos J. Neovascular growth in an experimental alkali corneal burn model. *Arch.Soc.Esp.Oftalmol.* 2014; 89:303-7.
209. Almaliotis D, Koliakos G, Papakonstantinou E, Komnenou A, Thomas A, Petrakis S, Nakos I, Gounari E, Karampatakis V. Mesenchymal stem cells improve healing of the cornea after alkali injury. *Graefes Arch.Clin.Exp.Ophthalmol.* 2015; 253:1121-35.
210. Ono K, Yokoo S, Mimura T, Usui T, Miyata K, Araie M, Yamagami S, Amano S. Autologous transplantation of conjunctival epithelial cells cultured on amniotic membrane in a rabbit model. *Mol.Vis.* 2007; 13:1138-43.
211. Holan V, Trosan P, Cejka C, Javorkova E, Zajicova A, Hermankova B, Chudickova M, Cejkova J. A comparative study of the therapeutic potential of mesenchymal stem cells and limbal epithelial stem cells for ocular surface reconstruction. *Stem Cells Transl.Med.* 2015; 4:1052-63.
212. Ke Y, Wu Y, Cui X, Liu X, Yu M, Yang C, Li X. Polysaccharide hydrogel combined with mesenchymal stem cells promotes the healing of corneal alkali burn in rats. *PLoS One* 2015; 10:e0119725.
213. Ye J, Lee SY, Kook KH, Yao K. Bone marrow-derived progenitor cells promote corneal wound healing following alkali injury. *Graefes Arch.Clin.Exp.Ophthalmol.* 2008; 246:217-22.
214. del Hierro A (2012). Reconstrucción de la superficie ocular mediante expansión "ex vivo" de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Madrid.
215. Lan Y, Kodati S, Lee HS, Omoto M, Jin Y, Chauhan SK. Kinetics and function of mesenchymal stem cells in corneal injury. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 2012; 53:3638-44.
216. Li F, Zhao SZ. Mesenchymal stem cells: Potential role in corneal wound repair and transplantation. *World J.Stem Cells* 2014; 6:296-304.
217. Ahmed SK, Soliman AA, Omar SM, Mohammed WR. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in a rabbit corneal alkali burn model (A histological and immune histo-chemical study). *Int.J.Stem Cells* 2015; 8:69-78.
218. Oh JY, Roddy GW, Choi H, Lee RH, Ylostalo JH, Rosa RH,Jr, Prockop DJ. Anti-inflammatory protein TSG-6 reduces inflammatory damage to the cornea following chemical and mechanical injury. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2010; 107:16875-80.
219. Wei ZG, Wu RL, Lavker RM, Sun TT. In vitro growth and differentiation of rabbit bulbar, fornix, and palpebral conjunctival epithelia. implications on conjunctival

REFERENCIAS / REFERENCES

- epithelial transdifferentiation and stem cells. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 1993; 34:1814-28.
220. Auw-Haedrich C, Agrawal M, Gabbert HE, Meyer P, Arnold N, Reinhard T. Immunohistochemical expression of epithelial cell markers in corneas with congenital aniridia and ocular cicatrizing pemphigoid. *Acta Ophthalmol.* 2011; 89:47-53.
221. Dotan I, Werner L, Vigodman S, Weiss S, Brazowski E, Maharshak N, Chen O, Tulchinsky H, Halpern Z, Guzner-Gur H. CXCL12 is a constitutive and inflammatory chemokine in the intestinal immune system. *Inflamm.Bowel Dis.* 2010; 16:583-92.
222. Nieto-Miguel T, Calonge M, de la Mata A, Lopez-Paniagua M, Galindo S, de la Paz MF, Corrales RM. A comparison of stem cell-related gene expression in the progenitor-rich limbal epithelium and the differentiating central corneal epithelium. *Mol.Vis.* 2011; 17:2102-17.
223. Xie HT, Chen SY, Li GG, Tseng SC. Limbal epithelial stem/progenitor cells attract stromal niche cells by SDF-1/CXCR4 signaling to prevent differentiation. *Stem Cells* 2011; 29:1874-85.
224. Luengo GF, Lavigne V, Gatto S, Croxatto JO, Correa L, Gallo JE. One-year follow-up of epithelial corneal cell sheet allografts mounted on platelet poor plasma in rabbits. *Mol.Vis.* 2009; 15:2771-9.
225. Mi S, Yang X, Zhao Q, Qu L, Chen S, M Meek K, Dou Z. Reconstruction of corneal epithelium with cryopreserved corneal limbal stem cells in a goat model. *Mol.Reprod.Dev.* 2008; 75:1607-16.
226. Yang X, Moldovan NI, Zhao Q, Mi S, Zhou Z, Chen D, Gao Z, Tong D, Dou Z. Reconstruction of damaged cornea by autologous transplantation of epidermal adult stem cells. *Mol.Vis.* 2008; 14:1064-70.
227. Elder MJ, Hiscott P, Dart JK. Intermediate filament expression by normal and diseased human corneal epithelium. *Hum.Pathol.* 1997; 28:1348-54.
228. Kameishi S, Sugiyama H, Yamato M, Sado Y, Namiki H, Kato T, Okano T. Remodeling of epithelial cells and basement membranes in a corneal deficiency model with long-term follow-up. *Lab.Invest.* 2015; 95:168-79.
229. Ng GY, Yeh LK, Zhang Y, Liu H, Feng GS, Kao WW, Liu CY. Role of SH2-containing tyrosine phosphatase Shp2 in mouse corneal epithelial stratification. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 2013; 54:7933-42.
230. Oh JY, Ko JH, Kim MK, Wee WR. Effects of mesenchymal stem/stromal cells on cultures of corneal epithelial progenitor cells with ethanol injury. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 2014; 55:7628-35.
231. Hu N, Zhang YY, Gu HW, Guan HJ. Effects of bone marrow mesenchymal stem cells on cell proliferation and growth factor expression of limbal epithelial cells in vitro. *Ophthalmic Res.* 2012; 48:82-8.
232. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: The state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* 2007; 25:2896-902.
233. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods* 2001; 25:402-8.

ANEXO - MATERIALES / ANNEX - MATERIALS

APARATOS UTILIZADOS / EQUIPMENT USED

Aparato / Device	Nombre / Name	Casa comercial / Source
Campana de flujo laminar / Laminar flow hood	Faster BH-EN2004	Cultek (Madrid, Spain)
Centrífuga / centrifuge	Allegra X-22R Centrifuge	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)
Documentador de geles y membranas / Gel and blot imaging system	ChemiDoc™	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
Citómetro de flujo / Flow cytometer	Cytomics FC 500 Cytometer	Beckman Coulter
Criostato / Cryostat	Leica CM1900	Leica (Wetzlar, Germany)
Escaner histológico / Histology scanner	ChromaVision Systems ACIS III	Dako (Carpinteria, CA; USA)
Espectrofotómetro / Spectrophotometer	SpectraMax M5	Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA)
Fluorómetro / Fluorometer	Qubit-fluorometer	Life Technologies
Incubador de CO ₂ / CO ₂ incubator	Galaxi R	RS Biotech (Enfield, CT, USA)
Lámpara de hendidura portátil / Portable slit lamp	Kowa SL-15	Kowa Medicals (Tokio, Japan)
Microscopio de fluorescencia / Fluorescence microscope	DM4000B	Leica
Microscopio láser confocal / Laser confocal microscope	HRT-III Rostock Cornea Module	Heidelberg Engineering (Carlsbad, CA, USA)
Microscopio óptico / Optical microscope	Elipse S100	Nikon (Tokio, Japan)
Microtomo / Microtome	HM340E	Leica
Procesador automático de tejidos / Automatic tissue processor	Leica ASP300	Leica
Sonicador / Sonicator	Ultrasonic 08849-02	Cole Parmer (Vernon Hills, IL, USA))
Termociclador / Thermocycler	Mastercycler personal	Eppendorf (Hamburgo, Germany)
Termociclador PCR a tiempo real / Thermocycler real time PCR	7500 Real Time PCR System	Life Technologies (Inchinnan, UK)

CITOMETRÍA DE FLUJO / FLOW CYTOMETRY

Materiales / Materials	Casa comercial / Source	Referencia / Reference
Annexin V-FITC Kit	Beckman Coulter	IM3546
Coulter® DNA Prep™ Reagents Kit	Beckman Coulter	6607055
Inmunoglobulina G / Immunoglobulin G	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)	56834
CD14-FITC	Beckman Coulter	IM0645U
CD19-FITC	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)	340409
CD34-PC7	Beckman Coulter	A21691
CD45-FITC	Beckman Coulter	A07782
CD73-PE	BD Biosciences	550257
CD90-PE	Beckman Coulter	IM1840U
CD105-APC	Biolegend (San Diego, CA, USA)	120413
Controles de isotipo / Isotype controls	Beckman Coulter	
HLA-DR-FITC	Beckman Coulter	IM1638U

CULTIVO CELULAR / CELL CULTURE

Materiales / Materials	Casa comercial / Source	Referencia / Reference
PLÁSTICOS Y VIDRIOS / PLASTIC AND GLASS		
Frascos de cultivo de / Flask of 75 cm ²	BD Falcon (Frankling Lakes, NJ, USA)	353134
Frascos de cultivo de / Flask of 175 cm ²	Thermo Scientific (Scotts Valley, CA, USA)	159910
Filtros de / Filters of 0.22 µm	Corning Life Sciences (Tewksbury, MA, USA)	431219
Filtros de nailon / Nylon filters 100 µm	BD Falcon	352360
Filtros de nailon / Nylon filters 40 µm	BD Falcon	352340
Portas de Permanox® de 2 pocillos / 2 well Permanox® multi-chamber slides	Thermo Scientific	177429
Portas de Permanox® de 8 pocillos / 8 well Permanox® multi-chamber slides	Thermo Scientific	177445
Placas petri de / Petri dishes of 63 cm ²	Corning Life Sciences	430166
Placas poliestireno de 6 pocillos / 6 well polystyrene plates	Corning Life Sciences	3516
Tubos de centrífuga / Centrifuge tubes 15 ml	Life Technologies	05-539-12
Tubos de centrífuga / Centrifuge tubes 50 ml	Life Technologies	05-539-7

SOLUCIONES Y REACTIVOS / SOLUTIONS AND REAGENTS		
Agar	BioMérieux (Durham, NC, USA)	51075
Antibiótico-antifúngico / Antibiotic-antifungal	Life Technologies	15240
Azul tripán / Trypan blue	Sigma-Aldrich	T8154
BrdU	BD Biosciences	550891
Colagenasa I / Collagenase I	Life Technologies	17100-017
Colageno IV / Collagen IV	Sigma-Aldrich	C5533
Dispasa II / Dispase II	Life Technologies	17105
Glicerol / Glycerol	Sigma-Aldrich	G7893
Mitomicina C / Mitomycin C	Sigma-Aldrich	M4287
NH ₄ Cl	Sigma-Aldrich	A0171
Povidona iodada / Povidone iodine	Meda (Solna, Sweden)	7167204
HBSS	Life Technologies	14025
PBS	Life Technologies	14190
Tripsina-EDTA / Trypsin-EDTA 0.05% (1X)	Life Technologies	25300
Tripsina-EDTA / Trypsin-EDTA 0.25% (1X)	Life Technologies	25200
MATERIAL QUIRÚRGICO / SURGICAL MATERIALS		
Bisturís / Scalpels	Romed (Wilnis, Holland)	
Cuchilletes / Knives	AJL Ophthalmic	
Escarificador / Scarifiers	John Weiss (Milton Keynes, UK)	
Pinzas / Tweezers	John Weiss	
Tijeras / Scissors	John Weiss	
Trepano de 7,5 mm / 7.5mm punch	Katena (Denville, NJ, USA)	
COMPUESTOS PARA MEDIOS DE CULTIVO / COMPONENTS FOR CULTURE MEDIA		
DMEM-GlutaMAX™ (bajo en glucosa / low-glucose (1 g/L), piruvato sódico / piruvate 1 mM)	Life Technologies	21885
DMEM-F12-GlutaMAX™ (3.1 g/L glucosa / glucose y piruvato sódico / piruvate 1mM)	Life Technologies	31331028
DMSO	Sigma-Aldrich	D2650
EGF	Sigma-Aldrich	E9644
FBS	Life Technologies	10106-169
Insulina humana / Human insulin	Life Technologies	12585-014
MEM NEAA 100x	Life Technologies	11140-035
Penicilina-estreptomycin / Penicillin-streptomycin	Life Technologies	15070-063

ANEXO – MATERIALES / ANNEX - MATERIALS

StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit	Life Technologies	A10070-01
StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit	Life Technologies	A10486
StemXVivo™ Chondrogenic Base Media	RD Systems (Minneapolis, MN, USA)	CCM005
StemXVivo™ Chondrogenic Supplement	RD Systems	CCM006
Toxina colérica / Cholera toxin	Gentaur (Kanpenhoot, Belgium)	Gentaur 100

RT-PCR A TIEMPO REAL / REAL TIME RT-PCR

Materiales / Materials	Casa comercial / Source	Referencia / Reference
Agua libre de nucleasas / Nuclease free water	Sigma-Aldrich	W-4502
β-mercaptoetanol / β-mercaptoethanol	Merck (Darmstadt, Germany)	56263340
Columna / Column Qiasredder	Qiagen (Hilden, Germany)	79656
Etanol / Ethanol	Panreac (Barcelona, Spain)	141086.1211
Placas de 96 pocillos / 96 well plates	Life Technologies	MicroAmp 4306737
Quant iT RNA	Life Technologies	Q32855
RNase-Free DNase Set	Qiagen	79254
RNeasy® Minikit	Qiagen	74106
SuperScrip® Vilo™	Life Technologies	11754-250
Tampón / Buffer RLT	Qiagen	79216
Tampón / Buffer RPE	Qiagen	1018013
Tampón / Buffer RW1	Qiagen	1053394
TaqMan Universal PCR Master Mix	Life Technologies	4304437
Sondas Taqman® / Taqman® Probes	Casa comercial / Source	Referencia / Reference
<i>GAPDH</i>	Life Technologies	4352934E
<i>CK12</i>	Life Technologies	Hs00165015_m1
<i>CK3</i>	Life Technologies	Hs00365080_m1

WESTERN-BLOTTING

Materiales / Materials	Casa comercial / Source	Referencia / Reference
Ácido deoxicólico / Deoxycholic acid	Sigma-Aldrich	D-6750
Aprotinina / Aprotinin	Sigma-Aldrich	A-6279
BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Scientific	23225
Cloruro de sodio / Sodium chloride	Merk	1.06404.100
Dodecil sulfato de sodio / Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Bio-Rad Laboratories	161-0418
EDTA	Sigma-Aldrich	E-5513
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo / Phenylmethylsulfonyl fluoride	Sigma-Aldrich	P-7626
Inmun-Star HRP Kit	Bio-Rad Laboratories	170-5040
Laemmli	Sigma-Aldrich	S-3401
Leche entera en polvo / Powdered whole milk	Nestle (Barcelona, Spain)	
Marcador de peso molecular / Molecular weight marker Dual Color	Bio-Rad Laboratories	161-0374
Membranas de nitrocelulosa / Nitrocellulose membranes	Bio-Rad Laboratories	162-0112
Ortovanadato sódico / Sodium orthovanadate	Sigma-Aldrich	S-6508
Persulfato de amonio / Ammonium persulfate	Bio-Rad Laboratories	161-0700
Poliacrilamida-Bisacrilamida / Polyacrylamide-Bisacrylamide	Bio-Rad Laboratories	161-0156
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific	21059
FBS	Life Technologies	10106-169
TBS	Bio-Rad Laboratories	170-6435
Tetrametiletilendiamina / Tetramethylethylenediamine	Bio-Rad Laboratories	161-0800
Tris/Glycine/SDS buffer	Bio-Rad Laboratories	161-0772
Tris-HCl	Sigma-Aldrich	T-6666
Tris-HCl pH 6.8	Bio-Rad Laboratories	161-0799
Tris HCl pH 8.8	Bio-Rad Laboratories	161-0798
Tritón / Triton	Sigma-Aldrich	028K0011
Tween®20	Sigma-Aldrich	P-7949

INMUNOFLUORESCENCIA / IMMUNOFLUORESCENCE

Materiales / Materials	Casa comercial / Source	Referencia / Reference
Ácido clorhídrico / Hydrochloric acid	Panreac	131019
Ácido trioxobórico / Trioxoboric acid	Sigma-Aldrich	B0252
Cubreobjetos / Coverslips	Thermo Scientifics	65.300.15
Hidróxido de sodio / Sodium hydroxide	Panreac	141687.1211
Hoechst	Sigma-Aldrich	B2261
Ioduro de propidio / Propidium iodide	Life Technologies	P-3566
Lectina de / Lectin from Helix Pomatia	Sigma-Aldrich	L1034-1ML
Medio de montaje de fluorescencia / Fluorescence mounting medium	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)	H-1000
Portas de Permanox® de 8 pocillos / 8 well Permanox® multi-chamber slides	Thermo Scientific	177445
Poli-L-lisina / Poly-L- lysine	Sigma-Aldrich	P8920
Portaobjetos de vidrio / Glass slides	Menzel glaser (Braunschweig, Germany)	AA00000112E
Suero de burro / Donkey serum	Sigma-Aldrich	D9663
Suero de cabra / Goat serum	Sigma-Aldrich	G9023
PBS	Life Technologies	14190
Tripsina / Trysin	Sigma-Aldrich	T7409
Tritón / Triton	Sigma-Aldrich	028K0011

ANTICUERPOS / ANTIBODIES

Anticuerpos / Antibodies	Casa comercial / Source	Referencia / Reference
Anti-Ab-1 (CD90)	Merck	CP28
Anti-AE5 (CK3)	Mp Biomedical (Illkirch, France)	69143
Anti-BrdU	Sigma-Aldrich	B8434
Anti-BrdU (DyLight 650)	Novus Biologicals (Littleton, CO, USA)	NB500-235C
Anti-CK7	Vector Laboratories	VP-C403
Anti-CK12	Santa Cruz Biotechnology	25722
Anti-CK15	Merck	CBL272
Anti-E-cadherina / E-cadherin	BD-Biosciences	610181
Anti-GAPDH	Santa Cruz Biotechnology	SC-59540

ANEXO – MATERIALES / ANNEX - MATERIALS

Anti-mouse HRP	Jackson ImmunoResearch (Newmarket, UK)	715-035-015
Anti-mouse IgG (Alexafluor 488)	Life Technologies	A21202
Anti-mouse IgG (PECy5)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany)	SC-3799
Anti-Pan-CK	Abcam (Cambridge, UK)	AB8068
Anti-p63	Santa Cruz Biotechnology	SC-8431
Anti-rabbit HRP	Jackson ImmunoResearch	715-005-152
Anti-rabbit IgG (Alexafluor 488)	Life Technologies	A21206
Anti-S100A4 (FSP1)	Abcam	AB11333
Anti-Vimentina / Vimentin	Santa Cruz Biotechnology	SC-6260

ESTUDIOS EX VIVO E IN VIVO / EX VIVO AND IN VIVO STUDIES

Materiales / Materials	Casa comercial / Source
Atropina / Atropine	Atropina Braun®, Braun (Barcelona, Spain)
Blefarostato / Speculum	AJL Ophthalmic (Álava, Spain)
Buprenorfina / Buprenorphine	Buprex®, Schering Plough, S.A (Madrid, Spain)
Combinado anestésico doble / Combined double anesthetic	Colircusí, Anestésico Doble®, Alcon (Barcelona, Spain)
Cuchillete / Knife	AJL Ophthalmic
Enrofloxacin / Enrofloxacin	Alsir®, Esteve (Barcelona, Spain)
Fluoresceína sódica / Sodium fluorescein	Colircusí Fluotest®, Alcon
Isoflurano / Isoflurane	Isoflo®, Abbott (Illinois, IL, USA)
Ketamina / Ketamine	Imalgene 1000®, Merial (Lyon, France)
Maxitrol®	Alcon
Midazolam	Dormicum®, Roche Farma (Madrid, Spain)
N-heptanol	Sigma-Aldrich
Papel de acetato de celulosa / Paper cellulose acetate	Pall Corporation (Port Washington, NY, USA)
Pinzas / Tweezers	AJL Ophthalmic
Portagujas / Needle holder	AJL Ophthalmic
Propofol	Propovet®, Esteve
Suero fisiológico / Saline serum	Braun
Sutura de polipropileno / Polypropylene Suture 7.0	Surgipro II (Dublin, Ireland)
Sutura de seda / Silk suture 5.0	AJL Ophthalmics

ANEXO – MATERIALES / ANNEX - MATERIALS

Sutura de nailon / Nylon suture 9.0	Ethilon, Ethicon (Sumerville, NJ, USA)
Tijeras / Scissors	AJL Ophthalmics
Tobramicina / Tobramycin	Tobrex [®] , Alcon
Triamcinolona / Triamcinolone	Trigón Depot [®] , Bristol-Myers Squibb (Madrid, Spain)
Xilacina / Xylazine	Rompun [®] , Bayer (Leverkusen, Germany)
Pentobarbital sódico / Pentobarbital sodium	Dolethal [®] , Vetoquinol (Lure, France)

HISTOLOGÍA Y TINCIONES

Materiales / Materials	Casa comercial / Source	Referencia / Reference
Ácido acético / Acetic acid	Panreac (Barcelona, Spain)	131008
Ácido peryódico / Periodic acid	Sigma-Aldrich	P5463
Azul alcian / Alcian blue	Sigma-Aldrich	A3157
Bicarbonato sódico / Sodium bicarbonate	Panreac	141648
Entellan	Merck	1.07961.0500
Etanol / Ethanol	Panreac	121086.1214
Formaldehído / Formaldehyde	Panreac	252931
Glicerol-gelatina / Glycerol-gelatin	Merck	1.09242
Hematoxilina II de Gill / Gill's Hematoxylin	Merck	1.05174.1000
Isopropanol	Panreac	141090.1211
Metanol / Methanol	Panreac	141091.1214
Nitrato de plata / Silver nitrate	Panreac	101458.1608
Oil Red O	Sigma-Aldrich	00625
Reactivo de Shiff / Shiff's reagent	Merck	1.09033.0500
Sacarosa / Sucrose	Panreac	131621.1211
Sulfato de magnesio / Magnesium sulfate	Panreac	131404
Tiosulfato de sodio / Sodium thiosulfate	Panreac	131721
Tiras de fluoresceína sódica / Sodium fluorescein strips	HUB Pharmaceuticals (Rancho-Cucamonga, CA, USA)	9001
Tissue-Tek-OCT [®]	Sakura (Alphen, Holland)	583
Xileno / Xylene	Panreac	131769.2711