
ESTUDIO HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO DEL EFECTO DE LA INYECCIÓN SUBCONJUNTIVAL DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EN UN MODELO DE DEFICIENCIA DE CÉLULAS MADRE LIMBO-CORNEALES

Autora: Beatriz Marceñido Gil.

Directoras: Teresa Nieto Miguel y M^a Carmen Martínez García.

Departamento de Biología Celular, Histología y Farmacología de la Universidad de Valladolid.

Curso 2020/2021

ÍNDICE

RESUMEN	2
1.-INTRODUCCIÓN	3
1.1.-SUPERFICIE OCULAR	3
1.1.1.-CÓRNEA	3
EPITELIO CORNEAL	4
MEMBRANA DE BOWMAN	4
ESTROMA CORNEAL	4
MEMBRANA DE DESCEMET.....	4
ENDOTELIO CORNEAL	5
1.1.2.-LIMBO	5
EPITELIO LIMBAR.....	5
ESTROMA LIMBAR.....	6
1.1.3.-CONJUNTIVA	6
EPITELIO CONJUNTIVAL.....	7
ESTROMA CONJUNTIVAL.....	7
1.2.-DEFICIENCIA DE CÉLULAS MADRE LIMBO-CORNEALES	7
1.2.1.-CAUSAS, SIGNOS, SINTOMAS Y ACTUAL TRATAMIENTO	7
1.2.2.-TRATAMIENTO CON CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES	8
VÍAS DE ADMINISTRACIÓN	9
2.-HIPÓTESIS	10
3.-OBJETIVOS	10
4.-MATERIALES Y MÉTODOS	10
4.1.-ESTUDIO HISTOLÓGICO	10
4.2.-INMUNOFLOURESCENCIA	11
4.3. ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES DE INMUNOFLOURESCENCIA	12
4.4.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO	14
5.-RESULTADOS	14
5.1.- ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LOS DISTINTOS TEJIDOS	14
5.2.- LOCALIZACIÓN DE LAS hAT-MSCs	16
5.3.- DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES DE EPITELIO CORNEAL Y LIMBAR EN LOS DISTINTOS TEJIDOS.....	17
6.-DISCUSIÓN	23
7.-CONCLUSIONES	26
8.-LIMITACIONES	27
9.-BIBLIOGRAFÍA	27
ANEXOS	31

RESUMEN

Antecedentes: La deficiencia de células madre limbo-corneales (LSCD) es una enfermedad de la superficie ocular que provoca su inflamación crónica, fallo en la integridad de epitelio corneal, invasión de la conjuntiva en la córnea y pérdida de la visión. El objetivo principal de este trabajo fue estudiar el efecto de la inyección subconjuntival de células madre mesenquimales de tejido adiposo humano (hAT-MSCs) en la estructura histológica y en el fenotipo epitelial corneal y limbar de un modelo de LSCD desarrollado en conejo.

Materiales y métodos: Se realizó un estudio histológico mediante tinción de PAS (Periodic Acid-Schiff) en muestras oculares procedentes de 8 conejos New Zealand White con LSCD a los que se les habían inyectado subconjuntivalmente 2×10^6 hAT-MSCs marcadas con 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) (n=4), o solución vehículo sin células (n=4). Mediante inmunofluorescencia indirecta se estudió la localización de las hAT-MSCs (BrdU+) en los tejidos y la expresión de distintos marcadores de epitelio corneal (citoqueratina-3 (CK3) y E-cadherina) y limbar (citoqueratina 15 (CK15) y p63).

Resultados: El estudio histológico reveló que los conejos con LSCD tratados con hAT-MSCs presentaban en el epitelio limbar y corneal menor cantidad de células caliciformes (propias de la conjuntiva) que los conejos no tratados. Las hAT-MSCs BrdU+ migraron hacia los tejidos dañados y se localizaron mayoritariamente en las zonas del estroma limbar con elevada presencia de infiltrados inflamatorios. Los niveles de expresión de los marcadores de epitelio corneal (CK3 y E-cadherina) y limbar (p63) fueron mayores en los conejos tratados con hAT-MSC que en los conejos tratados con solución vehículo sin células. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de CK15 en los tejidos de la superficie ocular de los dos grupos experimentales estudiados.

Conclusión: Las hAT-MSCs inyectadas subconjuntivalmente en un modelo de LSCD desarrollado en conejo migran hacia los tejidos dañados de la superficie ocular con mayor presencia de células inflamatorias, ejercen un efecto protector frente a la conjuntivalización de la córnea y contribuyen al mantenimiento del fenotipo de las células del epitelio corneal y limbar.

Palabras clave: deficiencia de células madre limbo-corneales; células madre mesenquimales; inyección subconjuntival; superficie ocular; córnea; limbo.

1.-INTRODUCCIÓN

1.1.-SUPERFICIE OCULAR

La superficie ocular se define como una unidad anatómica, histológica y fisiológica que comprende todas las estructuras y anejos oculares que se encuentran en contacto con el exterior y que separa el medio intraocular del entorno. Está constituida por la película lagrimal, los epitelios que tapizan las superficies palpebrales, la córnea, el limbo esclerocorneal y la conjuntiva, así como los tejidos conjuntivos subyacentes (Figura 1). Todos estos componentes forman un sistema de estructuras integradas con interdependencia entre ellas cuya función principal es permitir la visión y proporcionar protección anatómica, fisiológica e inmunológica (1,2).

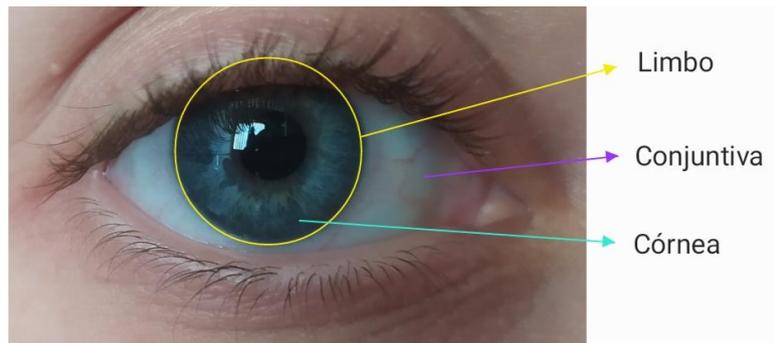


FIGURA 1: Localización anatómica de la córnea, el limbo esclero-corneal y la conjuntiva en la superficie ocular.

1.1.1.-CÓRNEA

La córnea es un tejido avascular, altamente inervado y transparente que permite la refracción y la transmisión de la luz a su través. Consiste en una lente convexo-cóncava con su cara anterior en contacto íntimo con la película lagrimal y su cara posterior bañada por el humor acuoso. Su espesor es de alrededor de 500 μm en la zona central y 670-700 μm en la zona de la periferia. Al ser un tejido avascular, la córnea obtiene el oxígeno y los nutrientes de la película lagrimal, el humor acuoso y la vasculatura peri-limbar (3).

Histológicamente, la córnea se compone de 5 capas. De la más externa a la más interna: el epitelio, la membrana de Bowman, el estroma, la membrana de Descemet y el endotelio (Figura 2). La transparencia corneal es esencial para su función y es resultado de su uniformidad estructural y de la disposición espacial de las láminas de colágeno en el estroma.

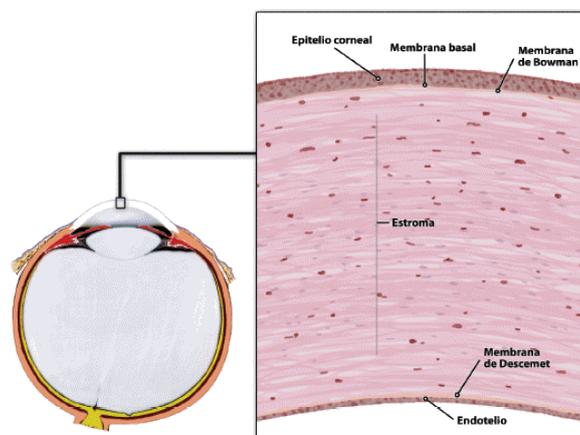


FIGURA 2. Esquema de un corte histológico transversal en el que se representan las capas histológicas que componen la córnea. Imagen tomada de la revisión de Fernández, A., et al. (4).

EPITELIO CORNEAL

El epitelio corneal humano es un epitelio escamoso estratificado no queratinizado de aproximadamente 50 μm de espesor, que está formado por 4-6 capas de células en la zona central y por 8-10 capas en la zona periférica (5). Dentro del epitelio, se distinguen tres tipos de células. Las células de la capa basal son cilíndricas y se encuentran unidas entre sí mediante desmosomas, uniones estrechas y uniones comunicantes, y unidas a la membrana basal mediante hemidesmosomas, la cual es rica en fibras de colágeno tipo IV, laminina, heparina y, en menor medida, en fibronectina y fibrina. Las células basales son las células del epitelio metabólicamente más activas y son las que tienen capacidad de división mitótica (6,7). A medida que las células migran hacia la superficie, los orgánulos citoplasmáticos desaparecen de manera gradual, lo que indica la disminución progresiva de la actividad metabólica. Las dos o tres capas de células intermedias del epitelio tienen finas extensiones y se unen entre sí mediante desmosomas y uniones estrechas. Estas células, son las encargadas de reponer las capas de células más superficiales cuando éstas se descaman. Las dos o tres capas de células más superficiales no tienen capacidad de división, son planas, con morfología poligonal, y se encuentran unidas entre sí por uniones estrechas (7).

Cada una de las capas de la córnea tiene una expresión génica específica. Estudios realizados sobre dicha expresión en el epitelio corneal dan un perfil en el que, entre otros, se encuentran expresados los genes de la citoqueratina 3 (CK3) (8), la E-cadherina (9), la citoqueratina 12 y la aldehído deshidrogenasa 3 (ALDH3). Este perfil génico da lugar a que las proteínas codificadas por estos genes se consideren marcadores de diferenciación corneal (8,10).

MEMBRANA DE BOWMAN

En humanos adultos, la membrana de Bowman es una capa acelular de un grosor de 8-12 μm , que se encuentra debajo de la membrana basal del epitelio corneal y que termina abruptamente en el limbo esclerocorneal (11). Está compuesta por fibras de colágeno de tipo I, principalmente, y de tipo III y V, entre otras, las cuales se unen formando fibrillas y éstas se disponen al azar formando un entramado rodeadas por proteoglicanos (5,11). La membrana de Bowman se encuentra en humanos y en casi todos los primates no humanos, excepto el lémur. También se ha observado en pollos, codornices, peces cebrá, ciervos, jirafas, antílopes, leones marinos de California, conejillos de indias y varias otras especies, pero no se encuentra en perros, lobos, gatos, tigres, leones, conejos, cerdos, vacas, cabras o caballos (12). Sus principales funciones son actuar como una barrera frente a microorganismos y mantener la forma del epitelio corneal.

ESTROMA CORNEAL

El estroma corneal constituye el 80-90 % del espesor de la córnea, siendo su espesor de aproximadamente de 500 μm . Está compuesto principalmente por fibras de colágeno de tipo I y V, cuya disposición y orientación en forma de láminas paralelas distribuidas de manera ortogonal es responsable de la transparencia de la córnea (3,5). Las fibras de colágeno se organizan en laminillas y éstas se extienden de limbo a limbo (3). Junto con las fibras de colágeno se pueden encontrar glucosaminoglicanos, sobre todo el queratán sulfato y proteoglicanos como el lumicano (5). El principal componente celular del estroma corneal son los queratocitos, los cuales son células de origen mesodérmico (fibroblastos modificados) encargadas de sintetizar y recambiar la matriz extracelular, además de participar en los procesos de cicatrización de heridas. Aparte de este tipo celular, en el estroma corneal se pueden encontrar, entre otros, linfocitos, células plasmáticas y neutrófilos (3).

MEMBRANA DE DESCOMET

La membrana de Descemet es la membrana basal de las células endoteliales corneales. Es una capa acelular y avascular de 8-12 μm de grosor (5). Está compuesta por colágeno de tipo IV, principalmente, y de tipo VIII, fibronectina, laminina, nidógeno, vitronectina, perlecan, así como queratán sulfato, heparina, dermatán sulfato y proteoglicanos de sulfato de condroitina

(13,14). Es una membrana que aumenta de grosor a lo largo de la vida y ese grosor, junto con su elasticidad, la hacen resistente a traumatismos (3).

ENDOTELIO CORNEAL

El endotelio corneal es una estructura de 5 μm formada por una sola capa de células hexagonales y metabólicamente activas, pero sin capacidad de renovación (5). Esta capa celular forma un límite entre el estroma y la cámara anterior. Lo más destacable de estas células son las interdigitaciones laterales, que se encuentran uniendo a las células entre sí, y las interdigitaciones basales, las cuales ayudan y facilitan la adhesión de las células del endotelio a la membrana de Descemet. En las membranas de estas células se pueden encontrar proteínas como la ocludina y ZO-1, proteínas asociadas a las uniones estrechas y proteínas que participan en su adhesión al sustrato como la vinculina, la talina y distintos tipos de integrinas (13). Las principales funciones de esta capa de células son mantener la transparencia de la córnea, regulando su hidratación, y ser una barrera “permeable”, permitiendo el paso de nutrientes del humor acuoso a la córnea avascular (13).

1.1.2.-LIMBO

El limbo o unión corneoescleral es la zona de transición entre la córnea (transparente) y la esclero-conjuntiva (opaca) (3). Mide entre 1,5 y 2,0 mm de ancho y forma un anillo que rodea por completo la córnea (Figura 1). El limbo actúa como una barrera física que impide que la conjuntiva (translúcida y vascularizada) invada la córnea y produzca una disminución de la visión (3,15). En el limbo existen unas estructuras fibrovasculares en forma de crestas y valles denominados empalizadas de Vogt que se disponen de manera radial a la córnea y se caracterizan por la presencia de diferentes poblaciones celulares en distintos niveles de diferenciación. En la capa de células más basal se encuentran las células madre epiteliales limbares responsables del mantenimiento y la renovación del epitelio corneal (3,6,10) (Figura 3).

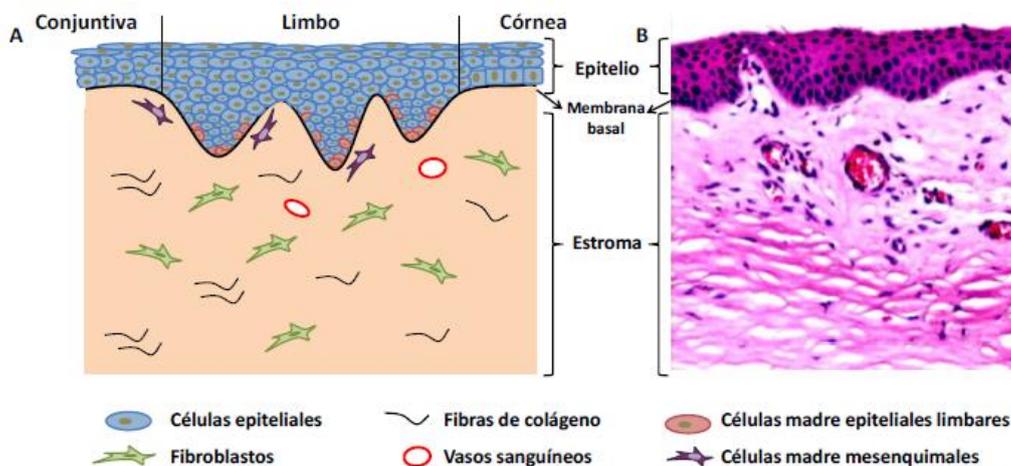


FIGURA 3: **Estructura histológica del limbo.** A) Imagen esquemática de las principales capas histológicas del limbo y los principales linajes celulares que se encuentran en este tejido. B) Imagen a 20X de un corte histológico transversal del limbo humano teñido con hematoxilina-eosina. Imagen histológica cedida por el laboratorio de Patología Ocular del IOBA. Figura tomada de la tesis doctoral de Galindo S. (16).

EPITELIO LIMBAR

El epitelio limbar humano tiene un grosor de 10-12 capas celulares y, a diferencia de la conjuntiva, no contiene células calciformes (6), pero posee células de Langerhans y melanocitos (4,10). Las empalizadas de Vogt son el nicho de las células madre epiteliales limbares responsables de la constante renovación del epitelio corneal. Las células madre limbares son células indiferenciadas, de 5-10 μm de diámetro, con un ciclo celular corto, que

residen en los valles de las empalizadas ancladas a la membrana basal mediante hemidesmosomas (4,10).

En 1983, antes de que se conociera la existencia de las células madre en el limbo, Richard Thoft y colaboradores propusieron una hipótesis, que posteriormente fue confirmada, para explicar la renovación del epitelio corneal en función de 3 ejes: un eje X, consistente en la proliferación de las células basales, un eje Y, consistente en la proliferación y migración centripeta de las células epiteliales desde el limbo hacia el centro de la córnea, y un eje Z, en el cual se produce la descamación y pérdida celular de la superficie corneal. Estos autores propusieron una ecuación para explicar la renovación y el mantenimiento del epitelio corneal: $X+Y=Z$ (17) (Figura 4).

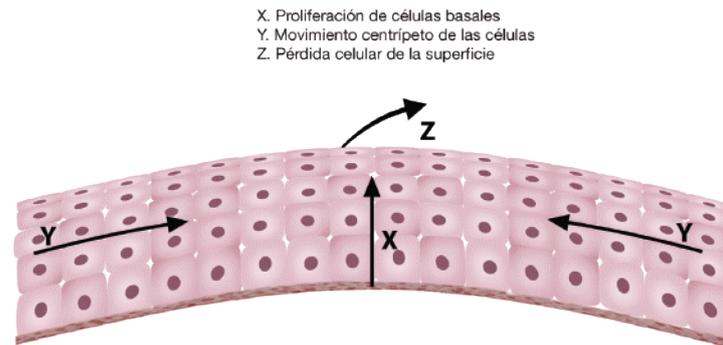


FIGURA 4: **Hipótesis de la renovación del epitelio corneal, propuesta por Thoft y colaboradores.** Imagen tomada de la revisión de Fernández, A. et al. (4).

Para identificar las células madre epiteliales limbares no existe un marcador único (18), por lo que se suele analizar la expresión de distintas proteínas que se conoce que se expresan de manera mayoritaria. Entre las proteínas que se suelen utilizar más habitualmente como marcadores de células madre epiteliales limbares se encuentran el factor de transcripción p63 (4,19,20), el cual está implicado en la morfogénesis y en el mantenimiento de la población de células madre (18,21); la proteína transmembrana transportadora de ATP ABCG2 y la citoqueratina 15 (CK15) (22).

ESTROMA LIMBAR

El estroma limbar es un tejido conectivo formado principalmente por fibras de colágeno de tipo IV y tipo VII. Es un tejido altamente innervado y vascularizado cuyo principal componente celular son los fibroblastos. Además, se ha demostrado que en la zona del estroma limbar más cercana a la membrana basal del epitelio limbar existen células madre mesenquimales (MSCs) capaces de generar estos fibroblastos estromales, de reemplazar los queratocitos corneales, y de participar en el mantenimiento del estado indiferenciado de las células madre epiteliales limbares (23).

1.1.3.-CONJUNTIVA

La conjuntiva es una membrana mucosa, translúcida y delgada que tapiza la superficie ocular desde el limbo (conjuntiva bulbar) y que cubre la superficie interna de los párpados (conjuntiva palpebral). Histológicamente, la conjuntiva está formada por un epitelio estratificado cilíndrico no queratinizado que contiene numerosas células caliciformes y por un tejido conectivo laxo subyacente al epitelio (3,24) (Figura 5). Las principales funciones de la conjuntiva son: actuar como una barrera física e inmunológica para limitar la entrada de cuerpos extraños y patógenos a los tejidos oculares más profundos, y secretar el componente mucínico de la película del lagrimal (3).

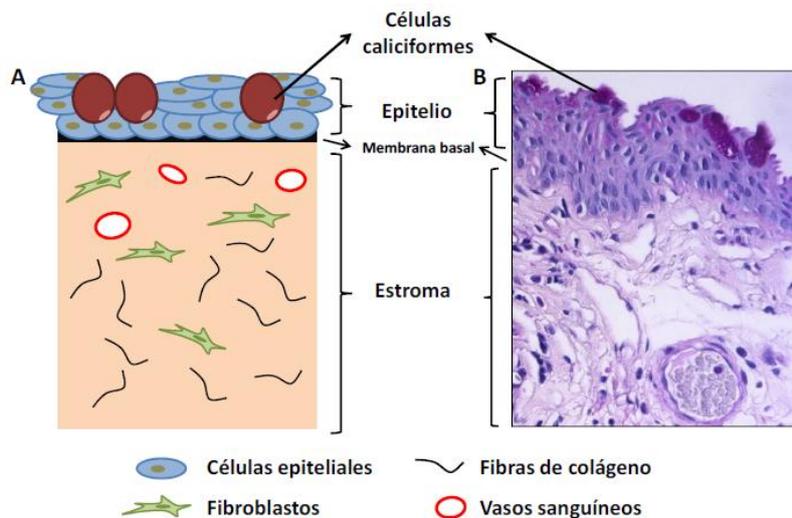


FIGURA 5: **Estructura histológica de la conjuntiva.** A) Esquema de las principales capas histológicas de la conjuntiva mostrando también los principales tipos celulares. B) Imagen a 20X de un corte histológico transversal de la conjuntiva humana teñida con hematoxilina-eosina Imagen histológica cedida por el laboratorio de Patología Ocular del IOBA. Figura tomada de la tesis doctoral de Galindo S. (16).

EPITELIO CONJUNTIVAL

El epitelio conjuntival es un epitelio estratificado no queratinizado formado por 2-5 capas celulares (4,10), que se organizan en células basales, intermedias y superficiales. Las células epiteliales conjuntivales están unidas por desmosomas e interconectadas por uniones intercelulares. Entre las células epiteliales se intercalan las células caliciformes, las cuales son células especializadas en proporcionar la capa de mucina a la película lagrimal y representan el 7% de la población celular del epitelio conjuntival (6,10). La función de las células caliciformes es la de formar una barrera para evitar la adhesión de patógenos, desechos y otras células al epitelio y favorecer la interacción entre el epitelio y la película lagrimal (3). En el epitelio conjuntival también hay otros tipos celulares como melanocitos y células inmunes residentes (3), tales como linfocitos y células de Langerhans (6).

El epitelio conjuntival tiene un perfil génico característico que le diferencia del epitelio de la córnea. En este perfil se pueden destacar la expresión de las mucinas MUC4 y MUC5AC (10), y de las citoqueratinas características de un epitelio no queratinizado como son CK4, CK8, CK13 y CK19 (4).

ESTROMA CONJUNTIVAL

Es una capa de tejido conectivo laxo con gran cantidad de vasos sanguíneos y diferentes poblaciones celulares, de las cuales, la principal son los fibroblastos, aunque también hay presencia de linfocitos, mastocitos, células plasmáticas y neutrófilos (6). Tiene dos capas principales, la capa adenoide que contiene linfocitos, sobre todo los de tipo B, y una capa fibrosa interna. En la capa adenoide los linfocitos B mencionados se agrupan formando un componente esencial para el tejido linfoide de la mucosa, denominado tejido linfoide asociado a la conjuntiva. Este tejido juega un papel importante en la regulación de las respuestas inmunitarias de la superficie ocular. La capa fibrosa más profunda es en la que se encuentran principalmente los vasos sanguíneos y los nervios (3).

1.2.-DEFICIENCIA DE CÉLULAS MADRE LIMBO-CORNEALES

1.2.1.-CAUSAS, SIGNOS, SINTOMAS Y ACTUAL TRATAMIENTO

El mantenimiento de la integridad del epitelio corneal es esencial para preservar la transparencia corneal y la función visual. Como se ha explicado anteriormente, de este

cometido son responsables las células madre epiteliales limbares, localizadas en la base del epitelio del limbo esclero-corneal, las cuales se encargan de renovar de manera constante todas las capas del epitelio corneal (8,25–27). La destrucción o disfunción de estas células madre, o de su nicho, desencadena un cuadro clínico conocido como deficiencia de células madre limbares (LSCD, siglas provenientes del inglés *Limbal Stem Cell Deficiency*), el cual puede ser causado por una amplia variedad de lesiones y trastornos de la superficie ocular tales como quemaduras químicas (causticaciones) o térmicas, cirugías oculares múltiples, patologías cicatriciales autoinmunes (síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide de las membranas mucosas...), síndrome de ojo seco severo (por ej. enfermedad de injerto contra huésped ocular, Síndrome de Sjögren...), infecciones, trastornos congénitos como la aniridia congénita, etc. El paciente que llega a esta situación se enfrenta a una disminución seria de la visión, acompañada de fotofobia, blefarospasmo y episodios recurrentes de dolor intenso. Ello se debe a una inflamación crónica de la superficie ocular, pues el epitelio corneal ya no puede regenerarse al ritmo rápido necesario en condiciones normales (5-7 días). Esto genera un epitelio corneal inestable que se ulcera con frecuencia. La conjuntiva es entonces el único tejido capaz de prestar apoyo a la córnea, penetrando en su superficie y llevando consigo un tejido que ya no es transparente y que aporta neovasos que, aunque necesarios para la cicatrización, conllevan también la pérdida irreversible de la transparencia corneal y, por ello, de la visión (28,29).

Los pacientes con LSCD 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 (29). Actualmente, el tratamiento de elección en humanos para tratar esta patología es el trasplante de epitelio limbar cultivado (CLET, del inglés *Cultivated Limbal Epithelial Transplantation*) (19). En casos unilaterales (cuando sólo uno de los ojos está afectado), es posible realizar un CLET autólogo a partir de una pequeña biopsia obtenida del ojo contralateral sano. Sin embargo, en casos bilaterales, que de hecho son más frecuentes, es necesario recurrir a tejido limbar alogénico de donantes cadáver debido a la escasez de tejido sano en los ojos del paciente, transformando un trasplante autólogo en uno alogénico (19,30).

Pese a que el CLET representa uno de los primeros y más claros éxitos de la medicina regenerativa, este tratamiento no está exento de limitaciones, tales como la baja disponibilidad de tejido limbar donante y la insuficiente tasa de éxito en los casos más severos. Por estas razones, numerosos grupos de investigación de todo el mundo llevan años trabajando en la búsqueda de nuevas y mejores soluciones terapéuticas para esta patología. Entre las alternativas más prometedoras que se están estudiando actualmente se encuentra el uso de MSCs (31,32).

1.2.2.-TRATAMIENTO CON CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Las MSCs son un tipo de células madre adultas multipotentes, autorrenovables y con capacidad de diferenciarse en múltiples linajes (33). Este tipo de células madre se han aislado con éxito de distintos tejidos como médula ósea, membrana amniótica, tejido adiposo, pulpa dental o sangre del cordón umbilical (34), aunque también se pueden encontrar en placenta, membrana sinovial, endometrio, gelatina de Wharton y tejidos oculares (33).

Las MSCs son una población celular heterogénea, debido a lo cual, la Sociedad Internacional de Terapia Celular estableció los criterios mínimos que debía cumplir una población celular para poder definirla como una población de MSCs (35): 1) adherencia al plástico en condiciones de cultivo estándar; 2) capacidad de diferenciación in vitro a tejido óseo, adiposo y cartilaginoso; y 3) no expresar los marcadores hematopoyéticos CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 α o CD19, ni el antígeno leucocitario humano (HLA)-DR, pero sí expresar los marcadores CD105, CD73 y CD90 (35). Las MSCs humanas tampoco expresan las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40, pero pueden expresar niveles variables de otros marcadores como el CD44, el CD29, el CD71 y el CD271 (33,36). La variación en la expresión

de estos marcadores puede deberse a los diferentes tejidos de las cuales se obtienen las células o a las distintas condiciones de los cultivos in vitro (33,36).

Las MSCs, aparte de crear los nichos de células madre hematopoyéticas en la médula ósea, tienen una función inmunorreguladora, tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa. Las MSCs al interactuar con las células inmunológicas pueden modular varias funciones del sistema inmune. Se ha visto que la administración de estas células in vivo es bien tolerada, que las células migran a los tejidos lesionados y que en éstos pueden regular la respuesta inmune (36). Además, las MSCs tienen la capacidad de modular el microentorno local del tejido mediante la secreción de factores solubles que no sólo son capaces de reducir la inflamación, la apoptosis y la fibrosis, sino también de estimular la regeneración celular de los tejidos activando, entre otras cosas, a las células progenitoras endógenas (37).

En la actualidad, existen publicados numerosos estudios preclínicos en modelos animales que han mostrado resultados muy prometedores sobre el potencial terapéutico de las MSCs para la reconstrucción de la superficie ocular. Las MSCs se ha demostrado que tienen la capacidad de favorecer la regeneración del epitelio corneal, mejorar la transparencia de la córnea y acelerar en el proceso de curación de heridas corneales (31,32,38). Además, un ensayo clínico randomizado doble enmascarado ha demostrado que el trasplante alogénico de MSCs es tan seguro y eficaz como el CLET en la restauración del epitelio corneal dañado por deficiencia de células madre limbares (39).

Hasta el momento, los estudios realizados para dilucidar los mecanismos que subyacen a los efectos beneficiosos de las MSCs sobre la superficie ocular dañada han demostrado que múltiples mecanismos podrían contribuir simultáneamente a su acción terapéutica. Aunque sigue siendo incierto si las MSCs pueden transdiferenciarse en células epiteliales corneales (40), se ha demostrado que estas células secretan factores tróficos y de crecimiento capaces de estimular a las células madre residentes y de este modo reducir la lesión tisular. Además, se ha comprobado que las MSCs ejercen efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores, y que tienen la capacidad de migrar hacia los tejidos lesionados de la superficie ocular (15,41–44).

VÍAS DE ADMINISTRACIÓN

Establecer qué vía de administración de las MSCs es la más adecuada para el tratamiento de la superficie ocular es uno de los principales retos por resolver para lograr que los beneficios terapéuticos de estas células sean los óptimos. Mientras que algunos autores apuestan por la administración tópica o por la administración sistémica, ya sea intravenosa o intraperitoneal, el uso de sustratos portadores de células, como membrana amniótica, fibrina, lentes de contacto, ácido poli-L-láctico o poliamida es a día de hoy la vía de administración que, con diferencia, es más frecuentemente utilizada (45). Sin embargo, el número de MSCs que pueden ser trasplantados mediante el uso de sustratos es limitado. Además, la mayoría de los sustratos requieren ser suturados a la superficie ocular, lo que hace que sea necesaria una cirugía adicional de seguimiento para quitar los puntos de sutura, haciendo que todo el proceso sea más tedioso, arriesgado y costoso (45,46).

En la actualidad, la inyección subconjuntival está emergiendo con fuerza como vía de administración alternativa de MSCs, ya que ha demostrado varias ventajas frente a los otros métodos de administración (45). La principal ventaja a destacar es que es una técnica poco invasiva, que proporciona la posibilidad de inyectar dosis altas de células en volúmenes pequeños sin necesidad de una instalación quirúrgica, un quirófano. Es una vía de administración rápida y barata utilizada habitualmente por los oftalmólogos para administrar diferentes tratamientos médicos como, por ejemplo, para inyectar antimicrobianos en el tratamiento de la queratitis infecciosa o mitomicina C en cirugías de pterigion. Los cultivos de MSCs para este método de administración son relativamente cómodos en comparación con los pasos de cultivo celular que hay que llevar a cabo para realizar un trasplante usando un sustrato portador. Además, este método garantiza una mayor absorción en comparación con la administración por vía tópica, ya que con ella se evita la barrera epitelial (45).

Pese a que los estudios hasta hora publicados muestran que la inyección subconjuntival de MSCs es segura y proporciona múltiples ventajas y beneficios, la disparidad de resultados mostrada por los distintos trabajos publicados pone de manifiesto que aún quedan múltiples cuestiones por resolver y que, por tanto, es necesario seguir investigando en este campo. Mientras que algunos trabajos han documentado que las MSCs migran desde el lugar de la inyección hasta el limbo o la córnea dañados, otros han demostrado que las MSCs inyectadas no migran hacia los tejidos dañados sino que permanecen en el entorno próximo al lugar de la inyección (45). Por otra parte, el análisis de marcadores de células epiteliales de la córnea y el limbo en las superficies oculares tratadas es una forma de estudiar el efecto de la administración de MSCs en la recuperación de los fenotipos celulares específicos (45). Sin embargo, hasta la fecha, el papel de las MSCs administradas por vía subconjuntival en la recuperación del fenotipo corneal y limbal aún no ha sido clarificado, por lo que es un campo que necesita ser investigado (45).

2.-HIPÓTESIS

La inyección subconjuntival de MSCs de tejido adiposo humano (hAT-MSCs) favorece la recuperación del epitelio corneal y limbar dañado de un modelo de LSCD desarrollado en conejo.

3.-OBJETIVOS

El **objetivo general** de este trabajo fue estudiar el efecto de la inyección subconjuntival de hAT-MSCs en la estructura histológica y en el fenotipo epitelial corneal y limbar de un modelo experimental de LSCD desarrollado en conejo. Para ello, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1. Realizar un estudio histológico de los tejidos de la superficie ocular de un modelo de LSCD desarrollado en conejo al que le habían sido inyectadas subconjuntivalmente hAT-MSCs.
2. Estudiar la localización de las hAT-MSCs inyectadas subconjuntivalmente en la córnea, el limbo y la conjuntiva enfermos del modelo de LSCD desarrollado en conejo.
3. Analizar mediante inmunofluorescencia el efecto de la inyección subconjuntival de hAT-MSCs en el fenotipo epitelial corneal y limbar del modelo de LSCD desarrollado en conejo.

4.-MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras histológicas utilizadas para realizar este trabajo procedían de 8 conejos adultos New Zealand White a los que en el globo ocular derecho se les había inducido una deficiencia de células madre limbo-corneales mediante desepitelización completa de la córnea con n-heptanol, seguida de una limbectomía quirúrgica de los 360° del limbo (15). Transcurrida 1 semana desde la realización del daño, a 4 de los conejos (n=4) se les inyectó subconjuntivalmente 2×10^6 hAT-MSCs marcadas con 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) (15,47) y a los 4 conejos del grupo control (n=4) solución vehículo (BSS, solución salina tamponada) sin células. Los ojos contralaterales fueron utilizados como ojos control sanos. Transcurrida 1 semana desde la administración subconjuntival, los animales fueron sacrificados y se obtuvieron los botones esclerolimbo-corneales para realizar el estudio histológico mediante tinción de PAS (Periodic Acid-Schiff), el análisis de localización de las hAT-MSCs mediante inmunofluorescencia frente a BrdU y el estudio fenotípico del epitelio corneal y limbar mediante inmunofluorescencia.

4.1.-ESTUDIO HISTOLÓGICO

Una vez extraídos, los botones esclerolimbo-corneales fueron fijados con paraformaldehído al 4% durante 4 h a 4°C y posteriormente procesados e incluidos en parafina. Para realizar el estudio histológico mediante tinción de PAS, en primer lugar, se tallaron los bloques de

parafina y se realizaron cortes de un espesor de 4 μm con un microtomo. Una vez obtenidas las muestras en los portaobjetos, se dejaron en la estufa a 60°C durante toda la noche y, transcurrido este tiempo, para acabar de desparafinar, se realizaron 3 incubaciones de 5 min en Xileno al 100%. Seguidamente, las muestras se incubaron en concentraciones decrecientes de alcoholes (100%, 96% y 80%) durante 4 min cada uno para ser rehidratadas. Para comenzar con la tinción, los cortes se lavaron con agua destilada y se incubaron con ácido peryódico al 0,5% durante 5 min. Posteriormente, se lavaron con agua destilada y se incubaron en oscuridad con reactivo de Schiff durante 15 min. A continuación, se lavaron los tejidos con agua corriente durante 10 min y con agua destilada otros 5 min, seguido de una incubación de 5 min con hematoxilina de Mayer previamente filtrada. Por último, las muestras se lavaron con agua corriente, se deshidrataron, incubando con alcoholes en concentraciones crecientes (80%, 96% y 100%), durante 5 min en cada uno y se incubaron en Xileno al 100%, antes de pasar al montaje de las mismas. El montaje se realizó con medio de montaje Entellan, (Merck; Darmstadt, Germany) a base de Xileno. Las muestras fueron visualizadas en un microscopio Leica DM4000B (Leica; Wetzlar, Alemania) y se obtuvieron fotografías representativas de todos los tejidos.

En cada muestra, se cuantificó el número de capas celulares existentes en el epitelio corneal y limbar y se evaluó la presencia de células calciformes en el epitelio limbar y corneal, como signo de conjuntivalización. Además, se realizó una semi-cuantificación de la presencia de células inflamatorias (linfocitos) en la córnea, el limbo y la conjuntiva, siguiendo la siguiente escala de valoración: (•): ausencia; (*): cantidad muy baja; (**): cantidad baja; (***): cantidad moderada; (****): cantidad elevada; (*****): cantidad muy elevada. Todos estos análisis se realizaron en al menos 2 cortes tisulares procedentes de cada botón esclerolimbocorneal.

4.2.-INMUNOFLUORESCENCIA

Los tejidos que fueron utilizados estaban incluidos en parafina y cortados a 4 μm con un microtomo. Antes de comenzar la inmunofluorescencia, los tejidos fueron desparafinados, manteniéndolos en la estufa a 60°C durante 30 min, e incubados 5 min en tres xilenos al 100%, y en alcoholes durante 4 min de concentraciones decrecientes (100%, 96% y 80%). Tras esto, se realizó un desenmascaramiento antigénico mediante incubación con tripsina (Sigma-Aldrich; St Louis, MO, USA) al 0,1% en tampón fosfato salino (Phosphate Buffered Saline, PBS) (Gibco™, Life Technologies; Inchinnan, UK) durante 20 min a 37°C. Este desenmascaramiento se realizó para que los epítomos de los antígenos que se querían estudiar quedaran expuestos y se pudieran unir a ellos los anticuerpos que iban a ser utilizados.

Todo el protocolo de la inmunofluorescencia se realizó en cámara húmeda. Se comenzó lavando los tejidos tres veces con PBS al 1X durante 5 min para eliminar los restos de tripsina. Tras ello, se realizó el bloqueo y la permeabilización del tejido con una solución de suero de burro al 5% (Sigma-Aldrich) y tritón (Sigma-Aldrich) al 0,3% en PBS al 1X durante 1 h. a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente en tampón de bloqueo (PBS 1X con suero de burro al 5%) a las diluciones recomendadas por la casa comercial (Tabla 1). Seguidamente, se realizaron tres lavados de 5 min con PBS y los tejidos fueron incubados durante 1 h. a temperatura ambiente y protegidos de la luz, con el anticuerpo secundario correspondiente (Alexa Fluor® 488 donkey anti-mouse 1/200 en PBS o Alexa Fluor® 594 donkey anti-sheep 1/100 en PBS (Thermo Fisher Scientific)). Posteriormente, tras lavar los tejidos con PBS, las muestras se incubaron con Vector® TrueVIEW® Autofluorescence Quenching Kit (Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA) durante 3 min a temperatura ambiente para eliminar la autofluorescencia. Los núcleos fueron contrateñidos mediante incubación de las muestras con el fluoróforo nuclear Hoechst (2'-[4'-etoxifenil]-5-[4-metilpiperazin-1-il]-2,5'-bis-1h-benzimidazol trihidrocloruro trihidrato) (Sigma-Aldrich) a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 5 min en PBS. Por último, tras un lavado con PBS y un último lavado con agua

corriente, se realizó el montaje de las muestras utilizando el medio de montaje Vectashield Vibrance, (Vector Laboratories).

TABLA 1: Anticuerpos primarios.

Nombre del anticuerpo	Especificidad	Especie de síntesis	Clon	Casa comercial	Dilución
Anti- BrdU	MSCs marcadas con BrdU	Oveja (policlonal)	-	Novus Biologicals (Littleton, CO, USA)	1/100
Anti- citoqueratina 3	Células epiteliales corneales	Ratón (monoclonal)	AE-5	Mp Biomedical (Illkirch, France)	1/50
Anti-citoqueratina 15	Células madre epiteliales limbares	Ratón (monoclonal)	LHK15	Merck (Darmstadt, Germany)	1/50
Anti-E-cadherina	Células epiteliales corneales	Ratón (monoclonal)	36	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)	1/100
Anti-p63	Células madre epiteliales limbares	Ratón (monoclonal)	4A4	Abcam (Cambridge, UK)	1/50

Todos los tejidos fueron observados y fotografiados en un microscopio invertido de fluorescencia (Leica DMI6000 B). De cada botón esclerolimboconal se analizaron, al menos, dos cortes por cada marcador (CK3, CK15, E-cadherina, p63 y BrdU), para tener las muestras por duplicado; y en cada uno de los cortes se realizaron 7 fotografías, para obtener imágenes de cada zona del tejido (conjuntiva superior, limbo superior, córnea superior, córnea central, córnea inferior, limbo inferior y conjuntiva inferior). En todos los experimentos se incluyeron controles negativos en los cuales el paso de la incubación con el anticuerpo primario se realizó únicamente con tampón de bloqueo y permeabilización sin el anticuerpo (PBS 1X con suero de burro al 5% y tritón al 0,3%).

La localización de las hAT-MSCs en los tejidos se realizó mediante inmunofluorescencia frente a BrdU, ya que las hAT-MSCs que habían sido inyectadas subconjuntivalmente habían sido marcadas previamente con BrdU (15). La BrdU es un análogo sintético de la timidina que, si se encuentra en el medio de cultivo, puede ser incorporado por las células a su cadena de ADN durante la fase S del ciclo celular. En este tipo de inmunofluorescencia, tras desparafinar los tejidos se realizó un paso previo de desnaturalización de ADN para permitir que el anticuerpo primario pudiera unirse a la BrdU incorporada en la cadena de ADN de las hAT-MSCs. Para ello, las muestras se lavaron con PBS y posteriormente se incubaron con ácido clorhídrico 2 N durante 30 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se neutralizó el ácido clorhídrico con una solución de borato sódico 0,1 M a pH 8,5, realizando 3 lavados de 10 min a temperatura ambiente. Por último, las muestras se lavaron con PBS y se procedió a desenmascarar con tripsina y a continuar con el protocolo de inmunofluorescencia descrito anteriormente.

Para analizar la cantidad de hAT-MSCs presentes en las muestras, se realizó una semicuantificación subjetiva de la cantidad de células positivas para BrdU que se encontraban en cada uno de los tejidos, utilizando la siguiente escala de valoración: (•): ausencia; (+): cantidad muy baja; (+-): cantidad baja; (++) : cantidad moderada; (+++): cantidad elevada.

4.3. ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES DE INMUNOFLOURESCENCIA

El análisis de las imágenes de inmunofluorescencia se realizó con el programa de análisis de imagen ImageJ. El software del microscopio de fluorescencia Leica utilizado para adquirir las imágenes guarda las mismas en un formato específico denominado LIF, “*Leica Image Format*”. Por ello, para poder abrir las imágenes en el programa ImageJ, se utilizó el “*plugin*” para abrir bio-formatos, “*bio-formats importer*”. Una vez abiertas las imágenes, se separaron en distintos

canales para poder aislar el canal en el cual se veía el marcador de la proteína analizada del canal en el que se veía el colorante nuclear. Una vez separados los canales, con la opción de "Polygon selection" de la barra de tareas principal de ImageJ, se seleccionó la zona en la cual se observaba expresión del marcador analizado (Figura 6).



FIGURA 6: **Análisis de una imagen de inmunofluorescencia utilizando el programa ImageJ.** Selección de la zona de tejido en la cual se puede observar la expresión del marcador (en verde) frente al cual se ha realizado la inmunofluorescencia.

Las imágenes fueron tomadas en escala de grises y guardadas por defecto en 12 bits, indicándonos que en cada imagen existían 4096 niveles de tonalidades de grises. Cuando se realizaron las medidas, lo que se quería conocer era el máximo y el mínimo de estos valores para poder establecer si nuestra imagen se encontraba dentro del rango de grises de una imagen a 12 bits, el área de la zona seleccionada y la media de los valores de grises dentro de esta área. Por ello, dentro de las opciones que se querían obtener en la ventana de los resultados del programa ImageJ se seleccionaron los siguientes parámetros: "Area", "Min & max gray value", "Integrated density", "Mean gray value" y "Display label". Finalmente, se procedió con el análisis del área seleccionada utilizando el comando "Analyze/Measure", apareciendo una nueva ventana "Results" con las opciones que habíamos seleccionado anteriormente junto con RawIntDen, que es la suma de los valores de píxeles en la selección y IntDen que es la suma de los valores de píxeles en la selección multiplicado por el área de un píxel. De toda esta información, la que se utilizó para realizar el análisis fue la media de los valores de grises ("Mean") y el área de la zona seleccionada ("Area"), lo demás eran datos útiles para saber si la imagen estaba bien tomada (Figura 7).

Todos estos análisis se realizaron en cada una de las imágenes obtenidas de, al menos, dos cortes histológicos de todas las muestras tisulares en estudio. De cada corte se realizaron y analizaron 7 imágenes, una por cada zona de tejido (conjuntiva, limbo y córnea superior, córnea central y córnea, limbo y conjuntiva inferior).

	Label	Area	Mean	Min	Max	IntDen	RawIntDen
1	C3-expk ck3 sup.tif - Image007	2742.695	324.737	19	1064	890654.483	34253901

FIGURA 7: **Recuadro de "Results" del programa de análisis de imagen ImageJ.** Recuadro en el cual aparecen los resultados de las medidas de fluorescencia realizadas para un determinado marcador en una imagen de inmunofluorescencia.

4.4.-ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de las medidas obtenidas en los análisis de las imágenes de inmunofluorescencia se efectuó con el programa GraphPad Prism 8 realizando un test ANOVA de una vía y representando la media de los datos normalizados al dato con el valor más pequeño \pm la desviación típica. Los valores de $p \leq 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$).

5.-RESULTADOS

5.1.- ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LOS DISTINTOS TEJIDOS

Mediante la tinción de PAS se estudió el efecto de la inyección subconjuntival de hAT-MSCs en la estructura histológica de los tejidos de la superficie ocular del modelo de LSCD desarrollado en conejo. El efecto de la administración celular se comparó con la inyección de solución vehículo sin células y con la estructura de tejidos control sanos. Transcurrida una semana desde la administración del tratamiento, se estudiaron los tejidos conjuntivales, limbares y corneales siendo diferenciados éstos en zona superior e inferior y, en el caso de la córnea, también en zona central.

La tinción de PAS permite observar en color rosa fucsia las células caliciformes, propias de la conjuntiva, ya que tiñe las mucinas que contienen en su interior. En color azul/morado se pueden observar los núcleos celulares, con lo que esta tinción permite identificar la presencia de células inflamatorias en los tejidos. Con la tinción de PAS también se pueden observar los cambios estructurales de los distintos tejidos, así como la aparición de neovasos o la presencia de defectos epiteliales.

En los tejidos control sanos se observaron 3-4 capas de células epiteliales en el tejido corneal, sin encontrarse diferencias entre el número de capas celulares observadas en el epitelio corneal superior, central e inferior (Figura 8). En cambio, en los tejidos procedentes de los conejos con LSCD se apreció un engrosamiento tanto en el epitelio corneal superior, como en epitelio corneal inferior, observándose alrededor de 5-6 capas de células epiteliales, pero sin observarse diferencias entre el grupo tratado con solución vehículo sin células (LSCD+BSS) y el grupo tratado con hAT-MSCs (LSCD+hAT-MSCs) (Figura 8). En el epitelio corneal central no se observaron cambios en el número de capas de células epiteliales en ninguno de los grupos experimentales en comparación con el número de capas observadas en los tejidos control sanos. Por otra parte, a diferencia de lo observado en los tejidos sanos, en los tejidos de los conejos con LSCD (LSCD+BSS y LSCD+hAT-MSCs) se observó presencia de vasos sanguíneos en el estroma corneal en las zonas más próximas al limbo superior e inferior (Figura 8).

Con respecto a los tejidos limbares, se observaron las empalizadas de Vogt solo en los tejidos sanos, mientras que en la mayoría de los tejidos procedentes de los conejos con LSCD, como era de esperar, no se observó la presencia de las mismas (Figura 8). No obstante, en aquellos tejidos en los cuales sí se apreciaban las empalizadas, se observó un aumento en el número de capas celulares en el epitelio limbar, siendo éste similar entre los conejos del grupo LSCD+BSS y del grupo LSCD+hAT-MSCs. Además, tanto en los conejos del grupo LSCD+BSS, como del grupo LSCD+hAT-MSCs, se observó que el estroma limbar se encontraba bastante desestructurado y que había presencia de células caliciformes (signo conjuntivalización) en el epitelio limbar, siendo mayor el número células caliciformes encontrado en aquellos conejos que fueron inyectados con solución vehículo sin células (Figura 8).

El grado de inflamación de los tejidos se estudió en base a la cantidad de células inflamatorias que se observaron en cada uno de los tejidos analizados. Las células inflamatorias (linfocitos) son células pequeñas cuyo núcleo se tiñe de color azul/morado con la tinción de PAS.

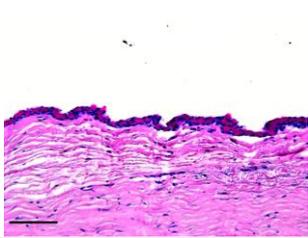
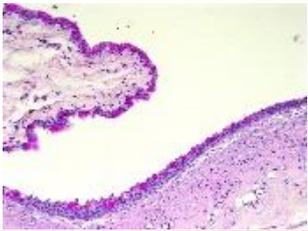
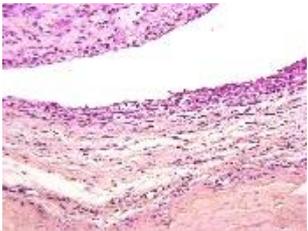
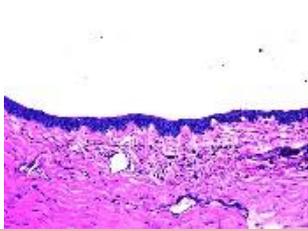
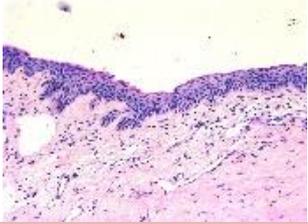
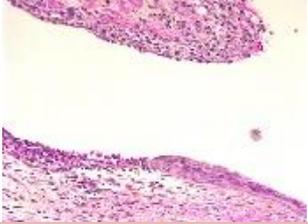
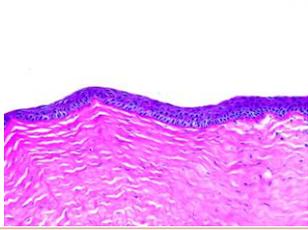
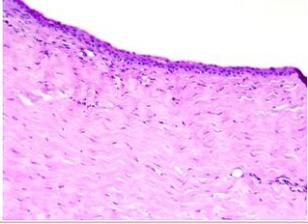
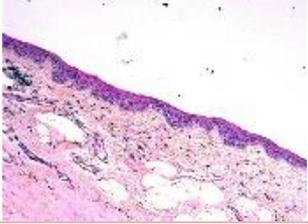
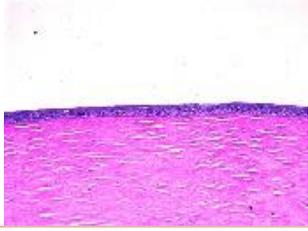
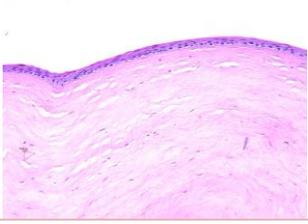
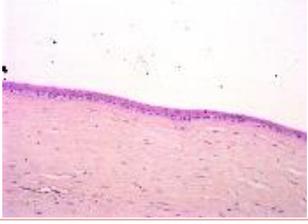
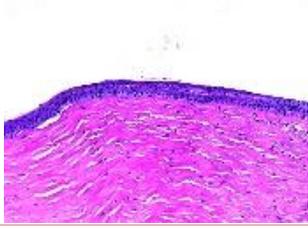
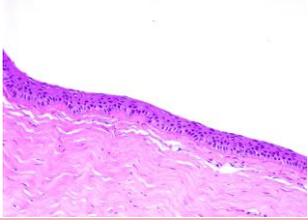
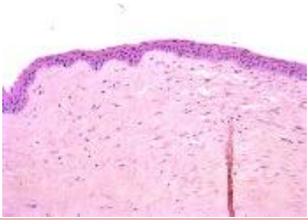
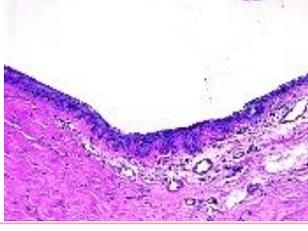
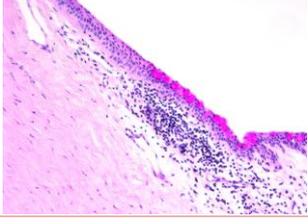
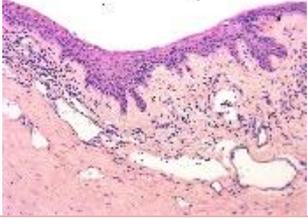
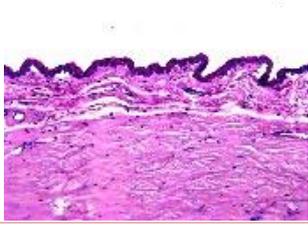
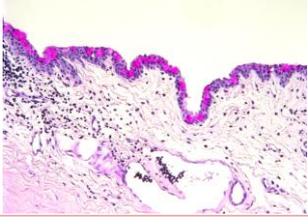
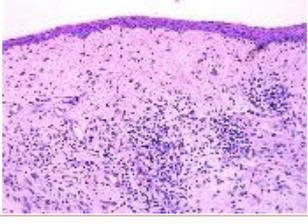
	SANO	LSCD + BSS	LSCD + hAT-MSCs
Conjuntiva superior			
Limbo superior			
Córnea superior			
Córnea central			
Córnea inferior			
Limbo inferior			
Conjuntiva inferior			

FIGURA 8: Estudio histológico. Fotografías representativas de cortes histológicos teñidos con PAS procedentes de ojos control sanos (n=4), ojos con deficiencia de células madre limbares (LSCD) de una semana de evolución inyectados subconjuntivalmente con solución vehículo sin células: LSCD+BSS (n=4), y ojos con LSCD de una semana de evolución inyectados subconjuntivalmente con células madre mesenquimales de tejido adiposo humano (hAT-MSCs): LSCD+hAT-MSCs (n=4). Los tejidos fueron obtenidos una semana tras la realización de la inyección subconjuntival. En color rosa fucsia se pueden observar las células caliciformes en el epitelio y en color azul/morado los núcleos celulares de las células inflamatorias (cúmulos de linfocitos) en el estroma. Imágenes realizadas a 20X. Barra de escala: 100 μ m.

En los tejidos sanos, este tipo de células se encontraron en muy baja cantidad en comparación con aquellos tejidos procedentes de conejos con LSCD (Figura 8). En el estroma limbar de los conejos con LSCD, la presencia de células inflamatorias observada fue moderada o baja, salvo en el limbo superior de los conejos tratados con hAT-MSCs donde la presencia de infiltrados inflamatorios fue elevada (Figura 8 y Tabla 2). En el estroma de la córnea central e inferior del grupo de conejos LSCD+BSS no se observó presencia de infiltrados inflamatorios. En cambio, en el grupo de conejos tratados con hAT-MSCs se pudo llegar a observar una pequeña presencia de células inflamatorias en el estroma de estos conejos (Tabla 2). En el estroma conjuntival se observó una presencia baja o moderada células inflamatorias, siendo mayor la cantidad en las zonas de la conjuntiva que habían comenzado a invadir el limbo y/o la córnea (Figura 8, Tabla 2).

En general, se observó mayor presencia de células inflamatorias en todos los tejidos procedentes de los animales con LSCD tratados con la inyección subconjuntival de hAT-MSCs que en aquellos que solo habían sido tratados con la solución vehículo, excepto en el limbo inferior donde la cantidad de células inflamatorias observada fue moderada en el caso de los conejos tratados con solución vehículo y baja en los tratados con hAT-MSCs (Tabla 2).

TABLA 2: Presencia de infiltrados inflamatorios en los distintos tejidos de la superficie ocular.

	Conjuntiva superior	Limbo superior	Córnea superior	Córnea central	Córnea inferior	Limbo inferior	Conjuntiva inferior
LSCD + BSS	**	**	***	•	•	***	**
LSCD + hAT-MSCs	***	****	**	*	*	**	***

Los datos de la presencia de infiltrados inflamatorios se representan con (•): ausencia; (*): cantidad muy baja; (**): cantidad baja; (***) : cantidad moderada; (****): cantidad elevada. LSCD: deficiencia de células madre de limbo; BSS: solución salina balanceada; hAT-MSCs: células madre mesenquimales de tejido adiposo humano.

5.2.- LOCALIZACIÓN DE LAS hAT-MSCs

La localización de las hAT-MSCs en los tejidos de la superficie ocular del modelo de LSCD se determinó gracias a que éstas, antes de ser inyectadas subconjuntivalmente, fueron cultivadas, y por tanto marcadas, con BrdU. Se observó una baja o muy baja cantidad de células positivas para BrdU en toda la superficie ocular, siendo la menor cantidad observada en la conjuntiva superior, tanto en el epitelio como en el estroma, y en el epitelio del limbo y la córnea superior. Esta cantidad fue ligeramente mayor en la zona inferior de la conjuntiva, el limbo y la córnea, tanto en epitelio como en el estroma. En el caso de la córnea central se observó mayor cantidad hAT-MSCs marcadas con BrdU en el epitelio que en el estroma, al contrario de lo observado en la córnea y limbo inferior, cuya mayor cantidad se encontró en el estroma (Figura 9, Tabla 3). No obstante, en varios de los conejos analizados se pudieron observar grandes acúmulos de células positivas para BrdU en el estroma del limbo tanto superior como inferior.

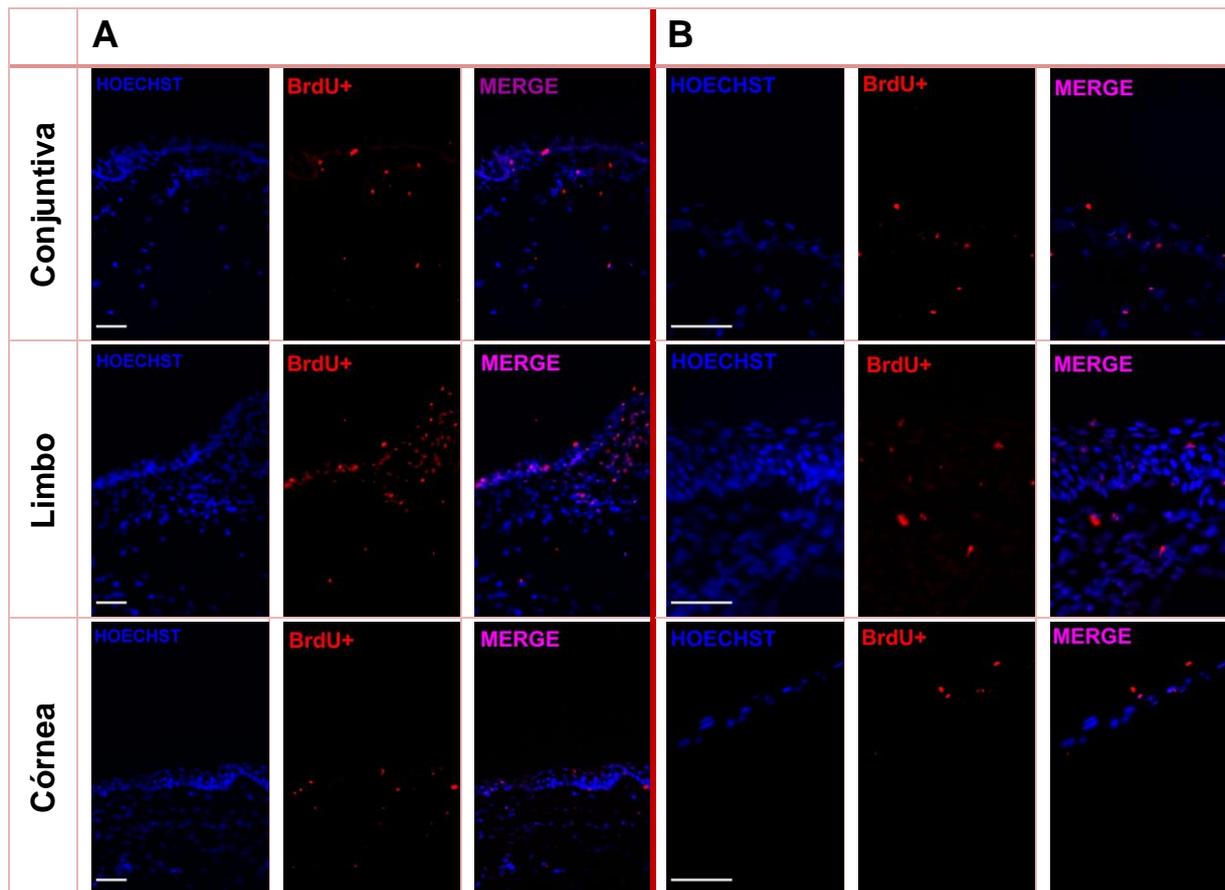


FIGURA 9: Localización de las hAT-MSCs marcadas con BrdU en los tejidos de la superficie ocular del modelo de deficiencia de células madre limbocorneales. Imágenes representativas de la localización de las hAT-MSCs BrdU+ en la córnea, el limbo y la conjuntiva de los conejos con deficiencia de células madre limbares inyectados subconjuntivalmente. Imágenes de microscopía de fluorescencia realizadas a 20X (A) y a 40X (B). En ellas se pueden observar en rojo las células madre mesenquimales BrdU+, en color azul los núcleos teñidos con el fluoróforo nuclear Hoechst y en la tercera imagen se puede ver la superposición de las imágenes anteriores. La barra de escala representa 50 μ m.

TABLA 3: Cantidad de células madre mesenquimales marcadas con BrdU.

	Conjuntiva superior	Limbo superior	Córnea superior	Córnea central	Córnea inferior	Limbo inferior	Conjuntiva inferior
Epitelio	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
Estroma	+	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-

Los datos de la presencia de células madre BrdU positivas se representan con (*): ausencia; (+): cantidad muy baja; (+/-): cantidad baja; (++) : cantidad moderada.

5.3.- DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES DE EPITELIO CORNEAL Y LIMBAR

Para determinar si existían cambios de expresión de los marcadores de epitelio corneal (CK3 y E-cadherina) y limbar (CK15 y p63) en los tejidos oculares de conejo procedentes de los distintos grupos experimentales, se realizaron inmunofluorescencias indirectas y se estudiaron los niveles de expresión de cada marcador mediante el análisis de las imágenes de microscopía de fluorescencia.

En primer lugar, se analizó la expresión del marcador de epitelio corneal diferenciado CK3. Observamos que la expresión de este marcador se veía fundamentalmente en el citoplasma de las capas celulares superiores del epitelio corneal y limbar de los ojos sanos. En los tejidos

procedentes de los conejos con LSCD tratados con solución vehículo sin células (LSCD+BSS) los niveles de expresión de este marcador fueron muy similares a los de los ojos sanos. No obstante, se observaron diferencias significativas en la expresión de este marcador entre el limbo y las distintas zonas corneales de este grupo experimental. En los tejidos procedentes de los conejos con LSCD tratados con hAT-MSCs se observó un aumento en la expresión de este marcador, en comparación con los tejidos del grupo control sano y el grupo tratado con solución vehículo (LSCD + BSS), aunque estas diferencias sólo fueron estadísticamente significativas en limbo superior, tanto en comparación con los controles sanos como con el grupo de conejos con LSCD tratados con BSS (Figuras 10, S1 y 11).

Los resultados obtenidos del análisis de la expresión del marcador de epitelio corneal E-cadherina indicaron que los tejidos de los conejos con LSCD inyectados con solución vehículo sin células mostraron una expresión uniforme y similar de este marcador a la mostrada por los tejidos del grupo control de sanos (Figuras 12, S2 y 13). En los tejidos de los conejos con LSCD tratados con las hAT-MSCs se observó un aumento significativo de la expresión de esta proteína en córnea superior y central en comparación con los niveles de expresión de los tejidos control sanos y de los tejidos de los conejos con LSCD tratados con BSS. Por otra parte, se observó que la expresión de este marcador en todos los tejidos de cada grupo experimental fue uniforme, sin verse diferencias entre las distintas capas de células epiteliales (Figuras 12, S2 y 13).

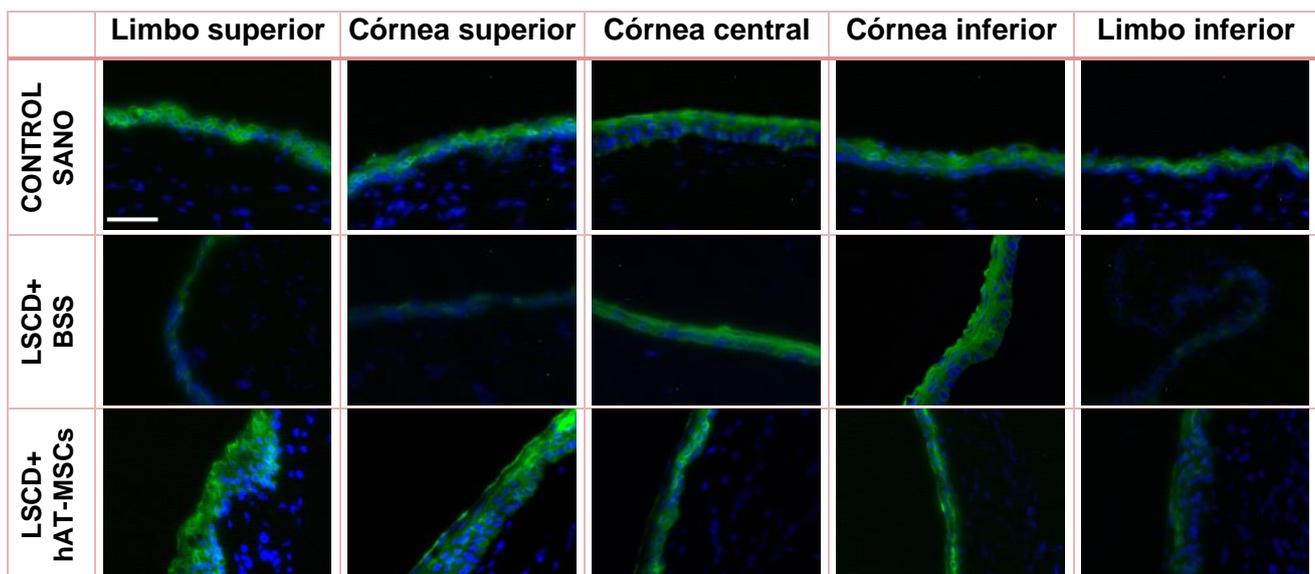


FIGURA 10: **Imágenes de inmunofluorescencia de la expresión del marcador de células de epitelio corneal citoqueratina-3 (CK3).** Imágenes representativas de los tejidos la superficie ocular de los tres grupos experimentales analizados: tejidos oculares sanos (control sano), tejidos procedentes de conejos con deficiencia de células madre limbares (LSCD) inyectados subconjuntivalmente con solución vehículo sin células (LSCD+BSS) y tejidos de conejos con LSCD inyectados subconjuntivalmente con hAT-MSCs (LSCD+hAT-MSCs). En las imágenes se pueden diferenciar en azul los núcleos teñidos con el colorante nuclear Hoechst y en verde la proteína CK3. Imágenes tomadas con microscopio invertido de fluorescencia a 40X aumentos. Barra de escala= 50 μ M.

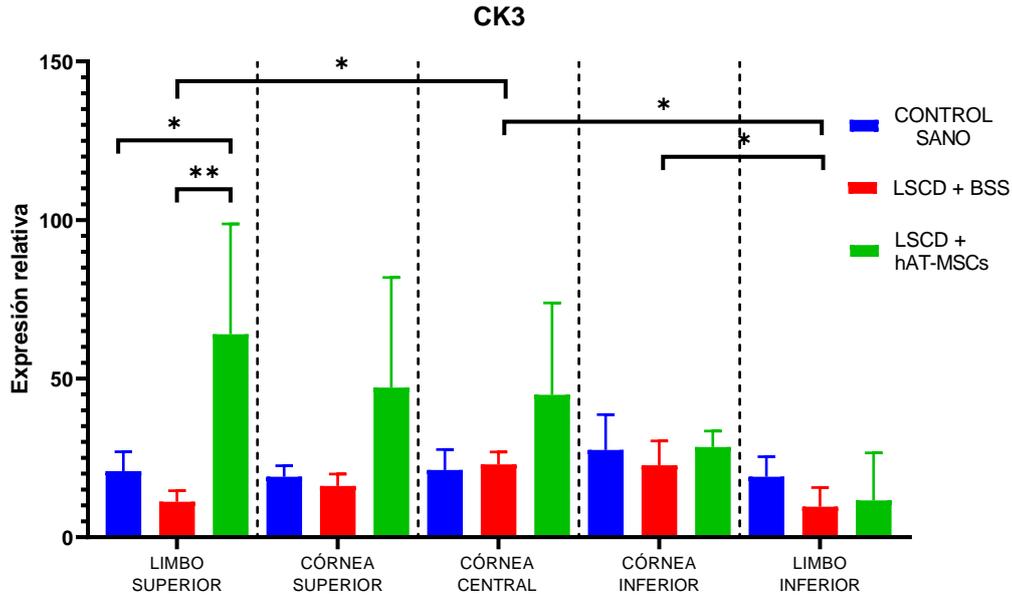


FIGURA 11 **Análisis de los niveles de expresión relativa del marcador de epitelio corneal citoqueratina 3 (CK3).** Representación de los niveles relativos de expresión (media \pm desviación típica) de la proteína CK3. El análisis se realizó a partir de las imágenes de inmunofluorescencia de los tejidos de la superficie ocular de los tres grupos experimentales analizados: tejidos oculares sanos (control sano), tejidos procedentes de conejos con deficiencia de células madre limbares (LSCD) inyectados subconjuntivalmente con solución vehículo sin células (LSCD+BSS) y tejidos de conejos con LSCD inyectados subconjuntivalmente con hAT-MSCs (LSCD+hAT-MSCs). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

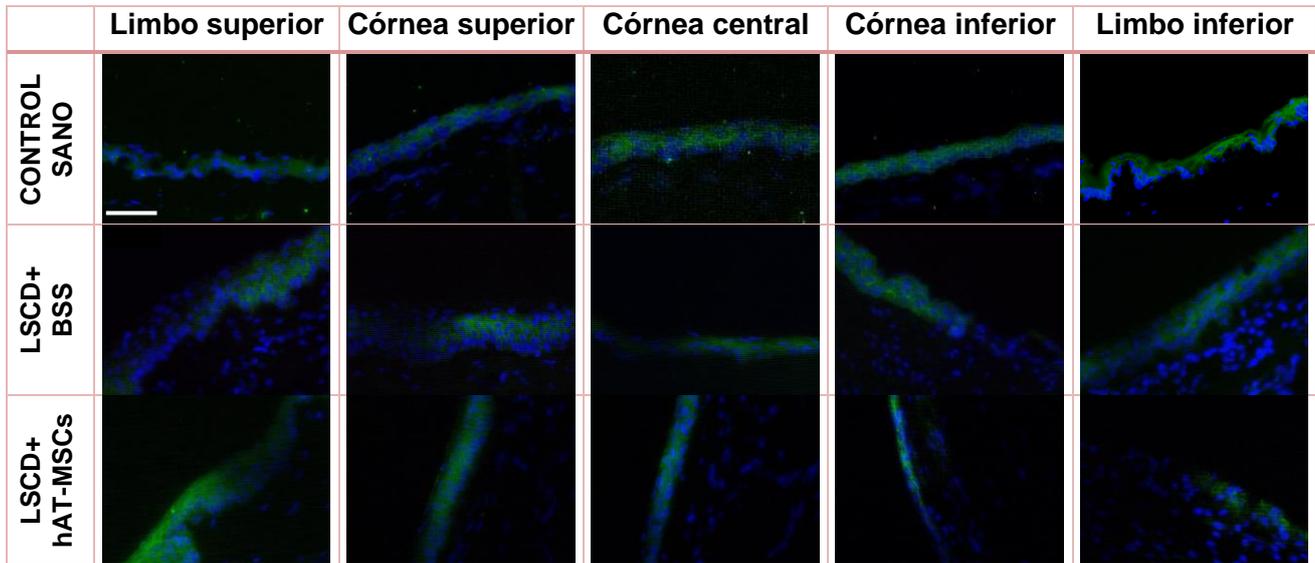


FIGURA 12: **Imágenes de inmunofluorescencia de la expresión del marcador de células de epitelio corneal E-cadherina.** Imágenes representativas de los tejidos de la superficie ocular de los tres grupos experimentales analizados: tejidos oculares sanos (control sano), tejidos procedentes de conejos con deficiencia de células madre limbares (LSCD) inyectados subconjuntivalmente con solución vehículo sin células (LSCD+BSS) y tejidos de conejos con LSCD inyectados subconjuntivalmente con hAT-MSCs (LSCD+hAT-MSCs). En las imágenes se pueden observar en azul los núcleos teñidos con el colorante nuclear Hoechst y en verde la proteína E-cadherina. Imágenes tomadas con microscopio invertido de fluorescencia a 40X aumentos. Barra de escala= 50 μ M.

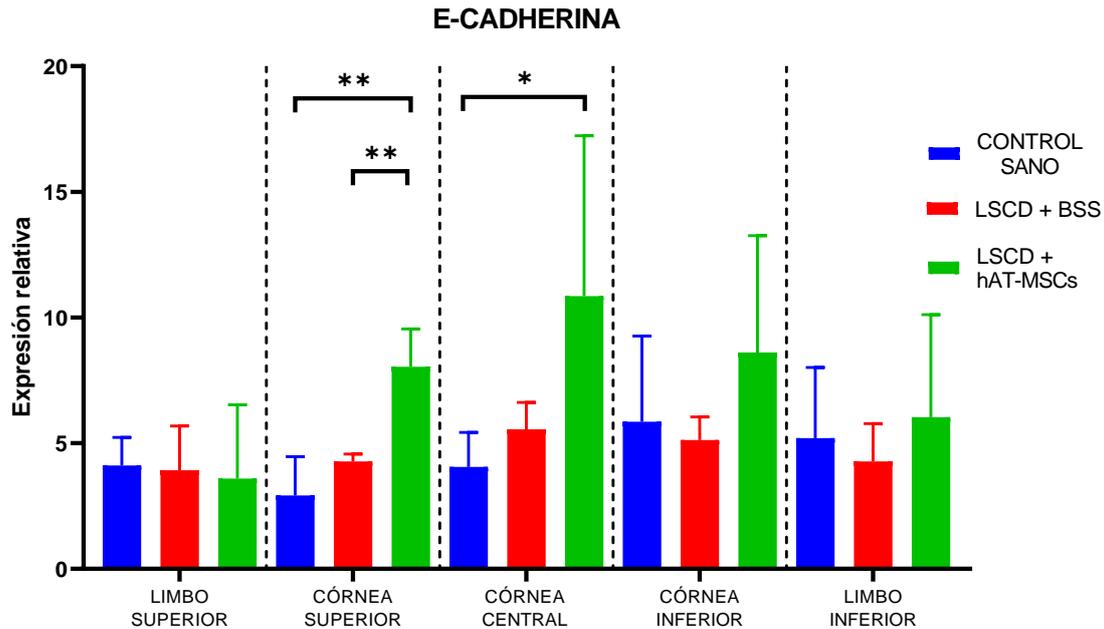


FIGURA 13: Análisis de los niveles de expresión relativa del marcador de epitelio corneal E-cadherina. Representación de los niveles relativos de expresión (media \pm la desviación típica) de la expresión de la proteína E-cadherina en cada tejido. El análisis se realizó a partir de las imágenes de inmunofluorescencia de los tejidos de la superficie ocular de los tres grupos experimentales analizados: tejidos oculares sanos (control sano), tejidos procedentes de conejos con deficiencia de células madre limbares (LSCD) inyectados subconjuntivalmente con solución vehículo sin células (LSCD+BSS) y tejidos de conejos con LSCD inyectados subconjuntivalmente con hAT-MSCs (LSCD+hAT-MSCs). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

El análisis de la expresión del marcador de células epiteliales limbares CK15, como era de esperar, mostró un mayor nivel de expresión en los tejidos limbares de los conejos sanos, tanto en el limbo superior como en el inferior (Figura 14 y S3), en comparación con los tejidos corneales sanos. También se pudo observar que la expresión de este marcador era más elevada en el tejido limbar sano que en los tejidos limbares de los otros grupos experimentales (LSCD+BSS y LSCD+hAT-MSCs), aunque sin observaron diferencias significativas (Figura 15). En los conejos con LSCD se observó que la expresión de CK15 era prácticamente uniforme por toda la superficie ocular, salvo en la córnea central y en la córnea inferior donde la expresión fue significativamente mayor en los conejos tratados con la solución vehículo sin células que en el grupo de tejidos control sanos (Figura 15). Por otra parte, también se pudo observar que la expresión de este marcador en tejidos sanos tenía lugar principalmente en las capas más basales del epitelio limbar y que, sin embargo, en los tejidos con LSCD se observó que la expresión de este marcador era más homogénea sin aparentes diferencias entre las células de las distintas capas epiteliales (Figura 14 y S3).

Como era de esperar, en tejidos oculares sanos, la mayor expresión del marcador de células madre limbares p63 se observó en los tejidos limbares, superior e inferior, existiendo una baja expresión en la córnea, destacando la córnea superior (Figuras 16, S4 y 17). En los tejidos de los conejos con LSCD tratados con solución vehículo sin células y tratados con hAT-MSCs se observó una expresión de p63 elevada en las células del epitelio corneal, observándose diferencias significativas entre los tejidos sanos y los del grupo LSCD+BSS en córnea central e inferior, y entre los tejidos corneales superior y central de los tejidos del grupo LSCD+hAT-MSCs y los controles sanos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de p63 entre ambos tipos de conejos con LSCD (LSCD+BSS y LSCD+hAT-MSCs), aunque se puede apreciar un aparente aumento de expresión en la córnea superior en los ojos tratados con hAT-MSCs (Figura 17). En las figuras 16 y S4 se puede observar que las células marcadas con p63 se encontraban fundamentalmente en las capas epiteliales más basales de los tejidos limbares y corneales.

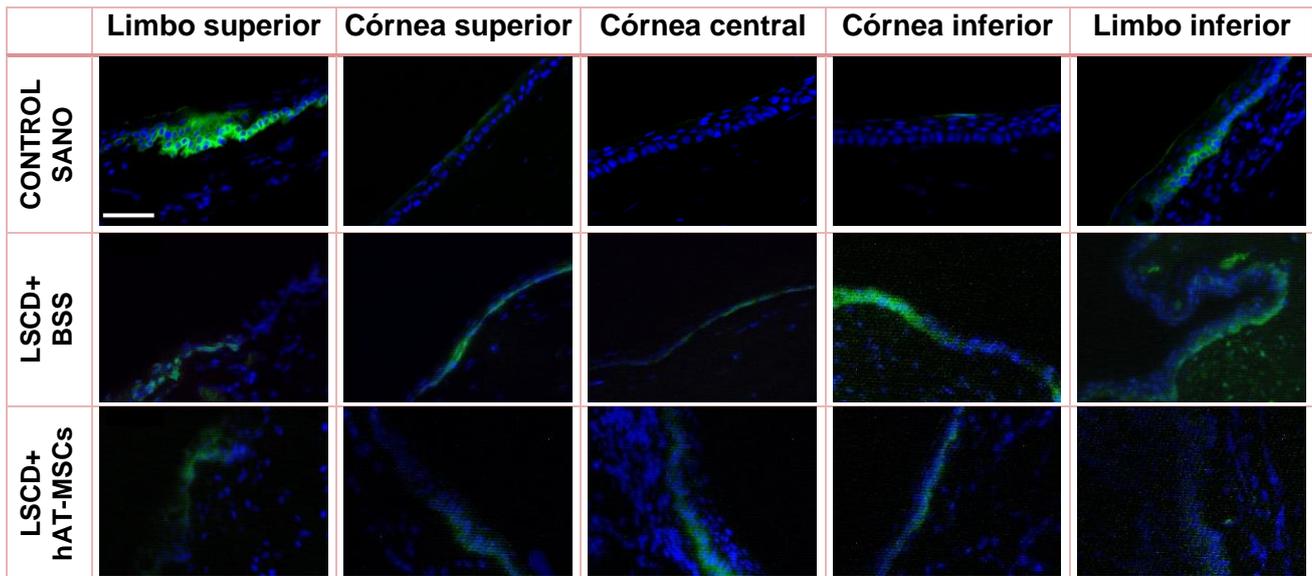


FIGURA 14: Imágenes de inmunofluorescencia de la expresión del marcador de células de epitelio limbar citoqueratina-15 (CK15). Imágenes representativas de los tejidos de la superficie ocular de los tres grupos experimentales analizados: tejidos oculares sanos (control sano), tejidos de conejos con deficiencia de células madre limbares (LSCD) inyectados subconjuntivalmente con solución vehículo sin células (LSCD+BSS) y tejidos de conejos con LSCD inyectados subconjuntivalmente con hAT-MSCs (LSCD+hAT-MSCs). En las imágenes se pueden observar en azul los núcleos teñidos con el colorante nuclear Hoechst y en verde la proteína CK15. Imágenes tomadas con microscopio invertido de fluorescencia a 40X aumentos. Barra de escala= 50 μ m.

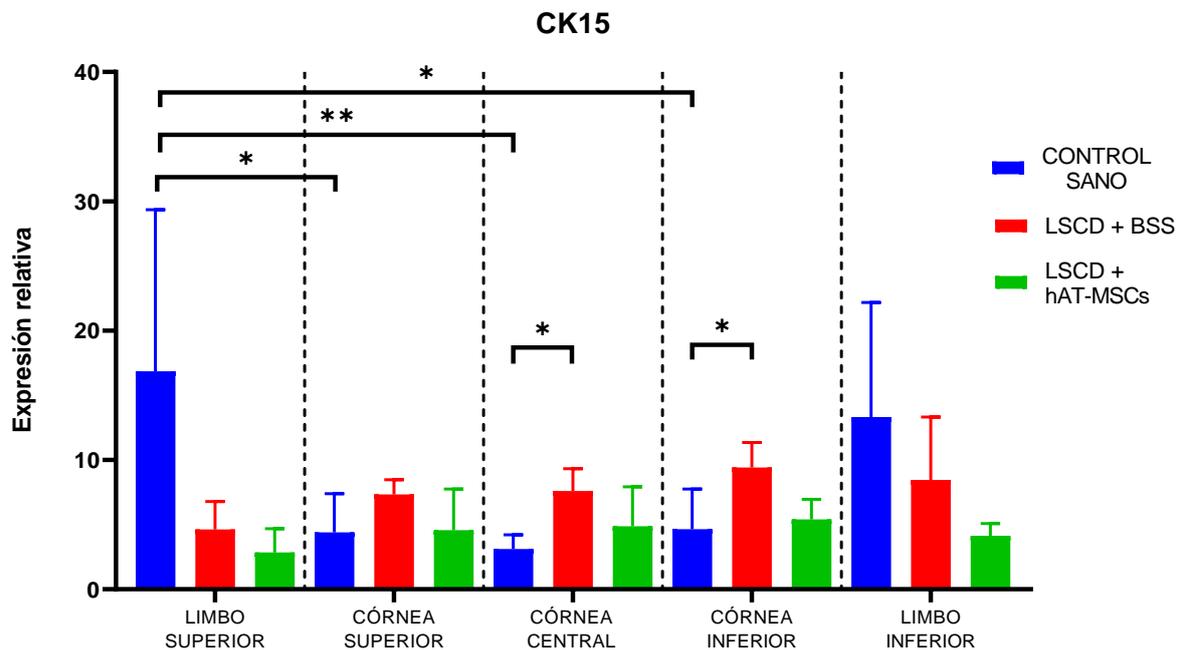


FIGURA 15: Análisis de los niveles de expresión relativa del marcador de epitelio limbar citoqueratina-15 (CK15). Representación de los niveles de expresión relativos (media \pm la desviación típica) de la proteína CK15. El análisis se realizó a partir de las imágenes de inmunofluorescencia de los tejidos de la superficie ocular de los tres grupos experimentales analizados: tejidos oculares sanos (control sano), tejidos procedentes de conejos con deficiencia de células madre limbares (LSCD) inyectados subconjuntivalmente con solución vehículo sin células (LSCD+BSS) y tejidos de conejos con LSCD inyectados subconjuntivalmente con hAT-MSCs (LSCD+hAT-MSCs). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

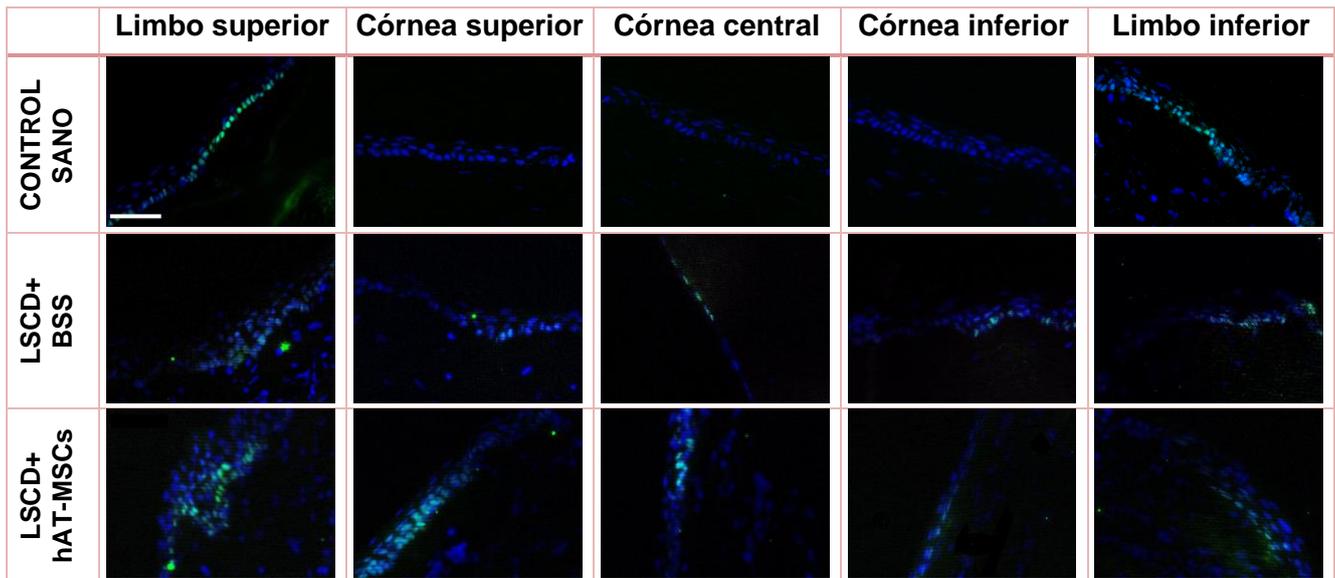


FIGURA 16: **Imágenes de inmunofluorescencia de la expresión del marcador de células madre epiteliales limbares p63.** Imágenes representativas de los tejidos de la superficie ocular de los tres grupos experimentales analizados: tejidos oculares sanos (control sano), tejidos procedentes de conejos con deficiencia de células madre limbares (LSCD) inyectados subconjuntivalmente con solución vehículo sin células (LSCD+BSS) y tejidos de conejos con LSCD inyectados subconjuntivalmente con hAT-MSCs (LSCD+hAT-MSCs). En las imágenes se pueden apreciar de azul los núcleos teñidos con el colorante nuclear Hoechst y en verde el factor de transcripción nuclear p63. Imágenes realizadas con un microscopio invertido de fluorescencia a 40X. Barra de escala=50 μ m.

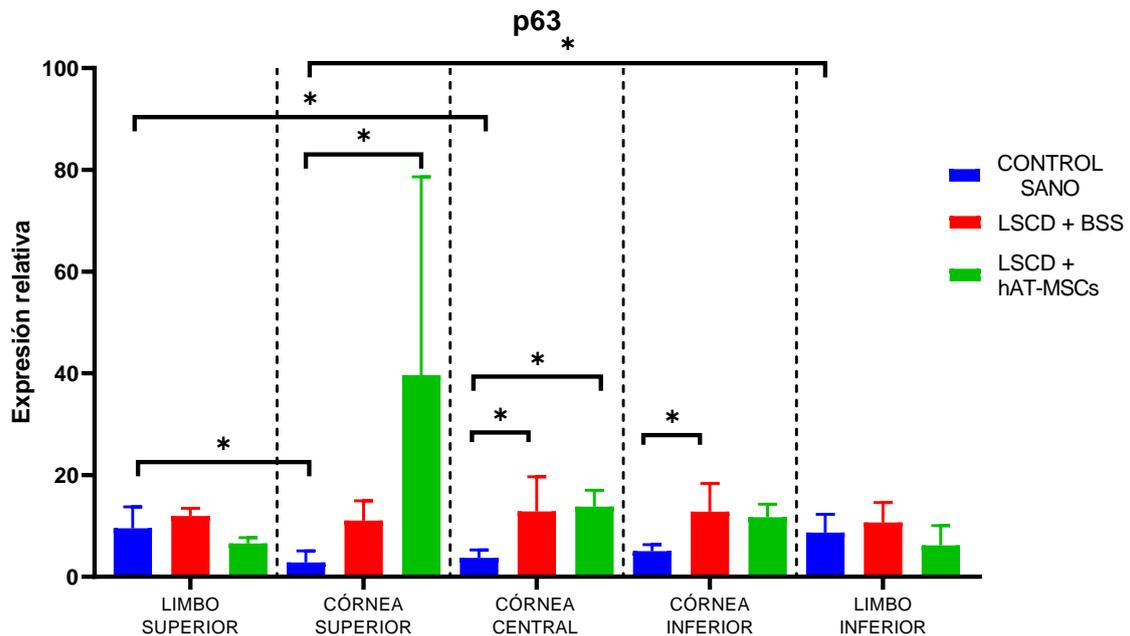


FIGURA 17: **Análisis de los niveles de expresión relativa del marcador de células madre epiteliales limbares p63.** Representación de los niveles relativos de expresión (media \pm desviación típica) del factor de transcripción p63 a partir de las imágenes de inmunofluorescencia de los tejidos la superficie ocular de los tres grupos experimentales analizados: tejidos oculares sanos (control sano), tejidos procedentes de conejos con deficiencia de células madre limbares (LSCD) inyectados subconjuntivalmente con solución vehículo sin células (LSCD+BSS) y tejidos de conejos con LSCD inyectados subconjuntivalmente con hAT-MSCs (LSCD+hAT-MSCs). * $p \leq 0,05$.

6.-DISCUSIÓN

Numerosos estudios preclínicos *in vitro* e *in vivo* realizados hasta la fecha han demostrado que las MSCs son una fuente de células madre muy prometedora para el tratamiento de enfermedades de la superficie ocular tales como la deficiencia de células madre limbo-corneales (31,32). Incluso un ensayo clínico recientemente publicado ha confirmado que este tipo de células madre es seguro y eficaz para el tratamiento de pacientes afectados por esta patología (39). No obstante, pese a que los efectos beneficiosos de las MSCs sobre la superficie ocular dañada ya han sido evidenciados, a día de hoy aún se desconoce cuál es la vía de administración más adecuada para que sus efectos terapéuticos sean los óptimos.

Actualmente, la inyección subconjuntival está emergiendo con fuerza como vía de administración de MSCs para el tratamiento del fracaso de la superficie ocular por LSCD, ya que ha demostrado múltiples ventajas y beneficios frente a otras vías de administración (45). A pesar de que los trabajos publicados hasta el momento han demostrado que la inyección subconjuntival de MSCs es segura (45), aún quedan numerosas incógnitas por resolver que ponen de manifiesto la necesidad de seguir investigando en este campo. Por ello, el objetivo principal de este trabajo fue estudiar el efecto de la inyección subconjuntival de hAT-MSCs en la estructura histológica y en el fenotipo epitelial corneal y limbar utilizando para ello un modelo de LSCD desarrollado en conejo.

Se eligió el conejo como modelo para este estudio porque su globo ocular tiene grandes similitudes con el globo ocular con el humano, razón por la cual es uno de los animales más utilizados para desarrollar modelos preclínicos en oftalmología. Además, es el modelo animal más empleado para el estudio de la LSCD (48,49). En la bibliografía se pueden encontrar diferentes formas de inducir la LSCD mediante la realización de un daño en la superficie ocular de los conejos (48,49). En nuestro trabajo, la lesión en la superficie ocular fue realizada mediante una desepitelización de la córnea con n-heptanol seguida de una limbectomía quirúrgica de los 360° del limbo de manera similar a la descrita previamente por Galindo et al. (15).

El estudio histológico de los tejidos oculares con LSCD mostró que, transcurridas dos semanas desde la inducción del daño, se producía un aumento en el número de capas del epitelio corneal en las zonas más próxima al limbo, pero sin observarse diferencias entre los tejidos de los animales tratados con hAT-MSCs y los tejidos de los animales tratados con solución vehículo sin células. Estos resultados indican que el engrosamiento observado en el epitelio corneal cercano al limbo fue consecuencia del efecto de la inducción de la lesión y no del tratamiento. Nuestros resultados concuerdan con los publicados por Ma et al. donde observaron que el limbo también sufría un engrosamiento del epitelio en un modelo de LSCD mediante quemadura química desarrollado en rata (50). Además, el estudio histológico también reveló que en la zona limbar de los tejidos oculares que habían sufrido el daño había presencia de células calciformes, evidenciando que la conjuntiva había comenzado a invadir la zona del limbo, siendo esto un signo propio y característico de la LSCD (51). Pese a que en nuestro modelo los tiempos de evolución desde la inducción del daño hasta la aplicación del tratamiento y desde la aplicación del tratamiento hasta el sacrificio de los animales fueron de tan solo una semana, nuestras observaciones confirman los resultados de estudios previos donde también se observó la presencia de células calciformes comenzando a invadir la córnea en conejos con LSCD tras cuatro semanas de evolución (52). Por otra parte, algo que cabe destacar de nuestros resultados es la presencia de una menor cantidad de células calciformes en la zona limbar de los tejidos con LSCD tratados con las hAT-MSCs, en comparación con la cantidad de estas células observada en los tejidos tratados con solución vehículo sin células. Nuestros resultados sugieren, por tanto, que la inyección subconjuntival de hAT-MSCs podría prevenir en cierta medida la conjuntivalización. Aunque para confirmar esta hipótesis sería necesario realizar estudios adicionales incrementando el tamaño muestral y efectuando una valoración semicuantitativa de la presencia de células calciformes, nuestros resultados concordarían con los previamente observados por García-Vázquez et al. (53), en donde

demonstraron que el trasplante de hAT-MSCs sobre membrana amniótica prevenía la conjuntivalización a las 6-8 semanas de evolución post-tratamiento (53). Además, la observación de las muestras histológicas a nivel del estroma evidenció la presencia de neovasos en las zonas de la córnea más cercanas al limbo dañado, confirmando que el modelo de LSCD utilizado era adecuado ya que presentaba otro de los signos característicos de esta patología como es la vascularización de la córnea (51). Estos resultados confirman los mostrados por otros estudios en modelos de LSCD en conejos en los cuales también se observó mediante análisis histológicos la vascularización de la córnea a una semana de evolución de la enfermedad (54). No obstante, nuestros resultados no han podido demostrar ningún efecto de la inyección subconjuntival de hAT-MSCs sobre la vascularización corneal. Estudios a tiempos de evolución post-tratamiento más prolongados donde, además de a nivel histológico, se estudie la superficie ocular de los animales a nivel clínico, serían necesarios para corroborar los resultados de otros autores que han demostrado que la inyección subconjuntival de MSCs disminuye la neovascularización corneal en conejos con LSCD (55,56).

Uno de los signos típicos de la LSCD es la inflamación crónica de la superficie ocular, la cual puede ser evidenciada por la presencia de infiltrados inflamatorios en los distintos tejidos. Diferentes estudios han demostrado que la inyección subconjuntival de MSCs en modelos de LSCD disminuye la cantidad de infiltrados inflamatorios en los tejidos dañados de la superficie ocular (57–60). Sin embargo, nuestros resultados muestran que la inyección subconjuntival de hAT-MSCs en nuestro modelo de LSCD no sólo no disminuye, sino que incluso induce un leve incremento en la cantidad de infiltrados inflamatorios observados en los distintos tejidos de la superficie ocular analizados. La discrepancia entre nuestros resultados y los previamente publicados pudiera deberse a diferencias en los modelos de LSCD utilizados, al tipo y a la dosis de MSCs administradas, o a los tiempos de evolución post-tratamiento a los que se realizaron los análisis. En este sentido, existen estudios similares al nuestro donde sí que se observó el efecto antiinflamatorio de las MSCs. Sin embargo, en estos trabajos, los tiempos de evolución desde la inducción del daño hasta la aplicación del tratamiento fueron menores (61). Es por esto, y porque estudios a tiempos superiores post-tratamiento muestran una bajada del grado de inflamación en tejidos oculares tratados con este tipo de células (61,62), que se podría deducir que, a una semana de evolución, el efecto antiinflamatorio de las células inyectadas de manera subconjuntival pueda apreciarse levemente (61). Por otra parte, el análisis de la localización de las hAT-MSCs mediante inmunofluorescencia frente a BrdU puso de manifiesto que la cantidad de células BrdU+ presente en los distintos tejidos de nuestro estudio era en general bastante baja, por lo que la reducida presencia de hAT-MSCs en los tejidos dañados podría ser otra de las razones por las que no se apreció ningún efecto reductor en la cantidad de infiltrados inflamatorios.

Numerosos trabajos han puesto de manifiesto que las MSCs tienden a migrar hacia los tejidos dañados y a zonas con alto grado de inflamación (31,63). Sin embargo, los estudios hasta ahora publicados en los que se ha analizado la localización de las MSCs administradas mediante inyección subconjuntival en distintos modelos de daño corneal arrojan resultados muy dispares. Mientras que algunos autores sostienen que las MSCs migran desde el lugar de la inyección hasta los tejidos limbares y corneales dañados (46,56,57,60), otros han evidenciado que las MSCs no migran y permanecen en las zonas cercanas al lugar de la inyección (58,61,64). En este sentido, nuestros resultados concuerdan con los estudios que sostienen que las MSCs migran hacia los tejidos oculares dañados, ya que observamos que las hAT-MSCs inyectadas subconjuntivalmente en nuestro modelo de LSCD migraron hacia los distintos tejidos de la superficie ocular analizados. Aunque la cantidad de células BrdU+ observada fue en general bastante baja, pudimos apreciar que la cantidad de hAT-MSCs era ligeramente mayor en el estroma limbar y conjuntival, donde además pudimos observar grandes cúmulos de estas células en el estroma limbar de algunos de los tejidos analizados. La discrepancia entre los resultados obtenidos en los distintos trabajos, además de por diferencias en los modelos de LSCD utilizados y en el tipo y la dosis de MSCs administradas, podría deberse a discrepancias entre el tiempo transcurrido desde la inducción del daño y la

inyección subconjuntival de las MSCs. En este sentido, un retraso en la administración de las MSCs podría inducir una disminución de la capacidad migratoria de las mismas como consecuencia de una disminución de las señales liberadas por los tejidos dañados (45).

Para analizar el efecto de la inyección subconjuntival de las hAT-MSCs en el fenotipo epitelial corneal y limbar de nuestro modelo de LSCD, se realizó un estudio inmunohistoquímico mediante el cual se analizó la expresión de los marcadores de epitelio corneal CK3 y E-cadherina y de los marcadores del epitelio limbar CK15 y el factor de transcripción p63.

Con respecto a la CK3, aunque se ha demostrado que es un marcador específico del epitelio corneal (8) y que es un marcador adecuado para ser utilizado en modelos de conejo (15,65), también se ha visto que en algunas ocasiones este marcador se expresa en el epitelio del limbo de conejo sano en las capas suprabasales (52), tal y como nosotros hemos observado. En nuestro estudio, hemos comprobado que la inyección subconjuntival de hAT-MSCs produce un aumento de la expresión de CK3 tanto en la córnea como en el limbo de los conejos con LSCD, indicando que las MSCs estarían ejerciendo un efecto inductor de la recuperación del fenotipo epitelial. Aunque a día de hoy no hay trabajos publicados en los que se haya estudiado el efecto de la inyección subconjuntival de MSCs en la expresión de este marcador, nuestros resultados concuerdan con los publicados por Galindo et al. donde demostraron que el trasplante de hAT-MSCs sobre membrana amniótica en un modelo de LSCD en conejo inducía un aumento de la expresión de CK3 en el epitelio corneal y limbar transcurridas 8 semanas desde la administración del tratamiento (15). El aumento exacerbado de CK3 observado en el limbo superior podría deberse a que en esta zona el grado de inflamación encontrado fue mayor y que, por tanto, la elevada cantidad de infiltrados inflamatorios pudiera haber provocado una alteración en los niveles de expresión de este marcador.

En cuanto al análisis de los niveles de expresión de E-cadherina, observamos que la inyección subconjuntival de hAT-MSCs inducía un incremento en la expresión de este marcador en el epitelio corneal, indicando que las células administradas podrían estar favoreciendo el mantenimiento y/o la recuperación del fenotipo característico de las células del epitelio corneal. Estas observaciones concuerdan con las mostradas en estudios previos con tiempos de evolución más prolongados donde se observó que el trasplante de hAT-MSCs provocaba un aumento de la expresión de E-cadherina no sólo en el epitelio corneal, sino también en el epitelio limbar (15). No obstante, nuestros resultados difieren de los publicados por Li et al., en los cuales no observaron variaciones en los niveles de expresión de este marcador en conejos con LSCD inyectados subconjuntivalmente con MSCs limbares o de médula ósea (66). Sin embargo, la dosis de MSCs utilizada por estos autores fue mucho menor que la concentración celular utilizada en nuestro caso, por lo que quizás sea necesario utilizar dosis celulares similares a la nuestra para poder observar efectos terapéuticos y/o cambios significativos en los niveles de expresión de los marcadores analizados.

La expresión de la CK15 en los tejidos oculares sanos, como era de esperar, fue más elevada en la zona del limbo que de la córnea, ya que es un marcador específico del epitelio limbar (22) que se ha observado que también se expresa en el epitelio limbar de conejo sano (15,67). En los ojos con LSCD tratados con hAT-MSCs observamos que los niveles de expresión de este marcador fueron similares a los de los ojos dañados sin tratar, por lo que la inyección subconjuntival de MSCs en nuestro modelo no parece en principio tener ningún efecto en la expresión de CK15. No obstante, sí que encontramos diferencias en la expresión de este marcador en córnea central e inferior entre los tejidos sanos y los del grupo con LSCD sin tratar, siendo mayor en los tejidos dañados que en los sanos. Esto podría deberse a que las células madre de limbo que hubieran quedado remanentes en el tejido después de la generación del daño podrían haber proliferado con el fin de intentar reparar daño y, con ello, haber provocado el aumento de la expresión de CK15. Sin embargo, los resultados publicados de Galindo et al. son diferentes a los nuestros ya que los niveles de expresión de CK15 en su grupo de conejos con LSCD sin tratar eran prácticamente inexistentes, pero aumentaban de manera notoria al ser trasplantados con hAT-MSCs sobre membrana amniótica. Estas diferencias pudieran quizás deberse a que en el estudio de Galindo et al. el tiempo de evolución

al que se analizaron las muestras fue de 8 semanas tras la aplicación del tratamiento, mientras que en nuestro trabajo el tiempo de evolución desde la realización de la inyección subconjuntival fue de tan solo 1 semana (15). Para dilucidar si la inyección subconjuntival de hAT-MSCs posee algún efecto en la expresión de CK15 sería, por tanto, necesario realizar estudios a tiempos de evolución más prolongados.

El factor de transcripción p63 tiene una mayor expresión en limbo de conejo sano, ya que es un marcador de las células madre limbo-corneales (20,68,69) En nuestro trabajo, observamos que la expresión de este marcador aumentaba en la córnea de los tejidos con LSCD, tanto en los tratados con hAT-MSCs como en los tratados con solución vehículo sin células. El incremento en la expresión de p63, además de a un posible efecto regenerador consecuencia de la administración del tratamiento, podría deberse a que las células madre limbares que se encontraran residuales en el tejido, es decir, que no hubieran sido eliminadas durante la generación de la lesión, podrían haber estado proliferando con el objetivo de reparar el tejido epitelial dañado. En este sentido, se ha demostrado que las células que expresan el factor de transcripción p63 poseen su alto potencial proliferativo (70). Nuestros resultados en este aspecto son similares a los obtenidos en otro estudio en el cual se inyectaron subconjuntivalmente MSCs de médula ósea en ratones diabéticos con daño corneal, donde también se observó un aumento en la expresión de p63 a pesar de que los tiempos de evolución fueron más cortos (1-3 días tras el daño) que en nuestro trabajo (57). Nuestro estudio, en cambio, discrepa con los resultados publicados por Lin et al. donde no se vio que la inyección subconjuntival de hAT-MSCs en conejos con LSCD aumentara la expresión de este marcador (66). Como se ha comentado anteriormente, la dosis de hAT-MSCs utilizada por los autores de este último trabajo fue mucho menor que la nuestra, por lo que probablemente sea necesario inyectar subconjuntivalmente dosis de MSCs elevadas para poder observar efectos terapéuticos y/o cambios significativos en los niveles de expresión de los marcadores de epitelio corneal y/o limbar.

En conjunto, nuestros resultados muestran que las hAT-MSCs administradas mediante inyección subconjuntival migran a los tejidos dañados e inflamados de la superficie ocular, frenan la invasión conjuntival y contribuyen a mantener el fenotipo epitelial corneal y limbar de nuestro modelo de LSCD desarrollado en conejo. No obstante, para poder esclarecer el verdadero potencial terapéutico de este tratamiento, es necesario realizar estudios adicionales en los que se incremente el tamaño muestral y se establezcan tiempos de evolución más prolongados que los determinados en el modelo experimental utilizado en este trabajo.

7.-CONCLUSIONES

- 1.-** A nivel histológico, la inyección subconjuntival de hAT-MSCs frena la invasión conjuntival pero no reduce la vascularización corneal, ni la presencia de infiltrados inflamatorios en los tejidos dañados de la superficie ocular de un modelo experimental de LSCD desarrollado en conejo.
- 2.-** Las hAT-MSCs administradas mediante inyección subconjuntival migran hacia los tejidos dañados de la superficie ocular y tienden a localizarse de manera mayoritaria en las zonas con mayor presencia de infiltrados inflamatorios.
- 3.-** La inyección subconjuntival de hAT-MSCs induce un Incremento de los niveles de expresión de marcadores propios del epitelio corneal y limbar, lo que contribuye al mantenimiento del fenotipo epitelial corneal y limbar del modelo de LSCD desarrollado en conejo.
- 4.-** Para profundizar en el análisis del efecto de la inyección subconjuntival de hAT-MSCs en la estructura histológica y en el fenotipo epitelial corneal y limbar es necesario realizar estudios en los que se establezcan tiempos de evolución más prolongados que los utilizados en el modelo experimental de LSCD utilizado en este trabajo.

8.-LIMITACIONES

El trabajo realizado tiene ciertas limitaciones las cuales han de tenerse en cuenta a la hora de interpretar las conclusiones obtenidas.

La variabilidad biológica que tienen todos los modelos in vivo en nuestro trabajo está presente, lo que ha tenido como consecuencia que los resultados obtenidos muestren desviaciones típicas elevadas y que, por tanto, en muchos de los casos no se hayan conseguido detectar diferencias significativas pese a observarse una clara tendencia a la significación. Ha de tenerse en cuenta que el número de muestras analizadas de cada grupo experimental ha sido bajo (n=4), por lo que para conseguir resultados con significación estadística en futuros estudios se tendría que aumentar el tamaño muestral de cada grupo experimental.

Las escalas de valoración utilizadas para semicuantificar los infiltrados inflamatorios y la cantidad de MSCs BrdU+ han sido subjetivas y sujetas a un solo observador, por lo que los resultados obtenidos en estos dos parámetros deben ser considerados como menos precisos que los obtenidos mediante análisis de imagen. En futuros estudios sería conveniente realizar estas valoraciones por dos investigadores independientes con el fin de disminuir la subjetividad de los resultados e incrementar la precisión de los mismos.

Pese a que para realizar los distintos análisis el número de cortes tisulares analizados ha sido de, al menos, dos cortes seriados de cada una de las muestras oculares, para poder obtener unos resultados más precisos de la localización y del efecto de las hAT-MSCs en la estructura histológica y en el fenotipo epitelial corneal y limbar, sería conveniente realizar estos análisis en cortes histológicos procedentes de varios niveles de profundidad dentro de un mismo tejido. En futuros estudios se contempla realizar estos análisis utilizando cortes histológicos procedentes de, al menos, tres niveles de profundidad diferentes.

9.-BIBLIOGRAFÍA

1. Stern ME, Beuerman RW, Fox RI, Gao J, Mircheff AK, Pflugfelder SC. The pathology of dry eye: The interaction between the ocular surface and lacrimal glands. *Cornea*. 1998;17(6):584–9. doi: 10.1097/00003226-199811000-00002
2. Lee WB, Mannis MJ. Historical Concepts of Ocular Surface Disease. In *Ocular Surface Disease: Cornea, Conjunctiva and Tear Film*. Elsevier Inc. 2013. p. 3-10 <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-2876-3.00001-8>
3. Downie LE, Bandlitz S, Bergmanson JPG, Craig JP, Dutta D, Maldonado-Codina C, Ngo W, Siddireddy JS, Wolffsohn JS. CLEAR - Anatomy and physiology of the anterior eye. *Contact Lens Anterior Eye*. 2021;44(2):132–56. doi: 10.1016/j.clae.2021.02.009
4. Fernández A, Moreno J, Prósper F, García M, Echeveste J, Fernández A. Regeneración de la superficie ocular: stem cells/células madre y técnicas reconstructivas. *An Sist Sanit Navar*. 2008;31:69.
5. Sridhar MS. Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian J Ophthalmol*. 2018; 66(2):190–4. doi: 10.4103/ijo.IJO_646_17
6. Dua HS, Gomes JAPP, Singh A. Corneal epithelial wound healing. *Br J Ophthalmol*. 1994; 78(5):401–8. doi: 10.1136/bjo.78.5.401
7. Sangwan VS. Limbal stem cells in health and disease. *Biosci Rep*. 2001;21(4):21. doi: 10.1023/A:1017935624867
8. Kinoshita S, Adachi W, Sotozono C, Nishida K, Yokoi N, Quantock AJ, Okubo K. Characteristics of the human ocular surface epithelium. *Prog Retin Eye Res*. 2001;20(5):639-73. doi: 10.1016/s1350-9462(01)00007-6.
9. Mohan R, Lee B, Panjwani N. Molecular cloning of the E-cadherin cDNAs from rabbit corneal epithelium. *Current eye research*. 2009;14(12):1135–45. doi: 10.1080/02713689508995820
10. Schermer A, Galvin S, Sun T-T. 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(1): 49–62. doi: 10.1083/jcb.103.1.49
11. Țălu Ș, Stach S, Sueiras V, Ziebarth NM. Fractal Analysis of AFM images of the surface of Bowman's membrane of the human cornea. *Ann Biomed Engineering*. 2015 A;43(4):906–16. doi: 10.1007/s10439-014-1140-3

12. Wilson SE. Bowman's layer in the cornea– structure and function and regeneration. *Exp Eye Res.* 2020;195:108033. doi: 10.1016/j.exer.2020.108033
13. Joyce NC. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res.* 2003;22(3):359–89. doi: 10.1016/S1350-9462(02)00065-4
14. Singhal D, Sahay P, Goel S, Asif MI, Maharana PK, Sharma N. Descemet membrane detachment. *Surv Ophthalmol.* 2020;65(3):279–93. doi: 10.1016/j.survophthal.2019.12.006
15. Galindo S, Herreras JM, López-Paniagua M, Rey E, de la Mata A, Plata-Cordero M, Calonge M, Nieto-Miguel T, Galindo S, Herreras JM, et al. Therapeutic effect of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in experimental corneal failure due to limbal stem cell niche damage. 2017;35(10):2160–74. doi: 10.1002/stem.2672
16. Galindo S. Células madre mesenquimales de tejido adiposo como tratamiento de la superficie ocular en la deficiencia de células madre limbares. Universidad de Valladolid; 2015.
17. Thoft RA, Friend J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. [Internet]. Vol. 24, *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 1983 [cited 2021 Jul 20]. 1442–1443 p. Available from: <https://europepmc.org/article/med/6618809>
18. Daniels JT, Harris AR, Mason C. Corneal epithelial stem cells in health and disease. *Stem Cell Rev.* 2006;2(3):247–54. doi: 10.1007/s12015-006-0053-4
19. Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, De Luca M, Pellegrini G. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Engl J Med.* 2010; 363(2):147–55. doi: 10.1056/NEJMoa0905955
20. Di Iorio E, Barbaro V, Ruzza A, Ponzin D, Pellegrini G, De Luca M. Isoforms of Δ Np63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(27):9523–8. doi: 10.1073/pnas.0503437102.
21. Kawasaki S, Tanioka H, Yamasaki K, Connon CJ, Kinoshita S. Expression and tissue distribution of p63 isoforms in human ocular surface epithelia. *Exp Eye Res.* 2006;82(2):293–9. doi: 10.1016/j.exer.2005.07.001.
22. 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. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(11):4780–6. doi: 10.1167/iovs.06-0574.
23. Li G-G, Zhu Y-T, Xie H-T, Chen S-Y, Tseng SCG. Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Limbal Niche Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(9):5686–97. doi: 10.1038/s41598-018-24862-6
24. Zhao H, Qu M, Wang Y, Wang Z, Shi W. Xenogeneic acellular conjunctiva matrix as a scaffold of tissue-engineered corneal epithelium. *PLoS One* [Internet]. 2014 Nov 6 [cited 2021 Jan 30];9(11):e111846. doi: 10.1371/journal.pone.0111846
25. 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(2):201–9. doi: 10.1016/0092-8674(89)90958-6
26. Li W, Hayashida Y, Chen Y-T, Tseng SC. Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell Res.* 2007;17(1):26–36. doi: 10.1038/sj.cr.7310137.
27. Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE. Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp Eye Res.* 2005;81(3):247–64. doi: 10.1016/j.exer.2005.02.016.
28. Dua, Saini J, Azuara-Blanco A, Gupta P. Limbal stem cell deficiency: Concept, aetiology, clinical presentation, diagnosis and management. *Indian J Ophthalmol* [Internet]. 2000 Jun [cited 2021 Aug 17];48(2):83. Available from: <https://www.ijo.in/article.asp?issn=0301-4738;year=2000;volume=48;issue=2;spage=83;epage=92;aulast=Dua>
29. Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Koizumi N, Kinoshita S. Ocular surface reconstruction using stem cell and tissue engineering. *Prog Retin Eye Res.* 2016; 51:187–207. doi: 10.1016/j.preteyeres.2015.07.003.
30. Ramírez BE, Sánchez A, Herreras JM, Fernández I, García-Sancho J, Nieto-Miguel T, Calonge M. Stem cell therapy for corneal epithelium regeneration following good manufacturing and clinical procedures. *Biomed Res Int.* 2015;2015:408495. doi: 10.1155/2015/408495
31. Nieto-Miguel T., Galindo S., López-Paniagua M., Pérez I., Herreras J.M., Calonge M.) Cell therapy using extraocular mesenchymal stem cells. In: Alió J., Alió del Barrio J., Arnalich-Montiel F. (eds) *Corneal Regeneration. Essentials in Ophthalmology.* Springer, Cham. 2019; 231-62. doi: 10.1007/978-3-030-01304-2_17
32. Al-Jaibaji O, Swioklo S, Connon CJ. Mesenchymal stromal cells for ocular surface repair.. 2019;19(7):643–53. doi: 10.1080/14712598.2019.16078366

33. Sharma A, Chakraborty A, Jaganathan BG. Review of the potential of mesenchymal stem cells for the treatment of infectious diseases. *World J Stem Cells*. 2021;13(6):568-593. doi: 10.4252/wjsc.v13.i6.568
34. Adak S, Magdalene D, Deshmukh S, Das D, Jaganathan BG. A Review on mesenchymal stem cells for treatment of retinal diseases. *Stem Cell Rev Rep*. 2021;17(4):1154-1173. doi: 10.1007/s12015-020-10090-x
35. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–7. doi: 10.1080/14653240600855905
36. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(9):726-36. doi: 10.1038/nri2395. doi: 10.1038/nri2395
37. Kim D, Lee AE, Xu Q, Zhang Q, Le AD. Gingiva-derived mesenchymal stem cells: Potential application in tissue engineering and regenerative medicine - A Comprehensive Review. *Front Immunol*. 2021;12:667221. doi: 10.3389/fimmu.2021.667221
38. Liu X-N, Mi S-L, Chen Y, Wang Y. Corneal stromal mesenchymal stem cells: reconstructing a bioactive cornea and repairing the corneal limbus and stromal microenvironment. *Int J Ophthalmol*. 2021; 14(3):448-455. doi: 10.18240/ijo.2021.03.19
39. Calonge M, Pérez I, Galindo S, Nieto-Miguel T, López-Paniagua M, Fernández I, Alberca M, García-Sancho J, Sánchez A, Herreras JM. A proof-of-concept clinical trial using mesenchymal stem cells for the treatment of corneal epithelial stem cell deficiency. *Transl Res*. 2019;206:18–40. doi: 10.1016/j.trsl.2018.11.003
40. Harkin DG, Foyl 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(3):785–91. doi: 10.1002/stem.1895
41. Holan V, Javorkova E. Mesenchymal stem cells, nanofiber scaffolds and ocular surface reconstruction. *Stem Cell Rev Rep*. 2013;9(5):609-19. doi: 10.1007/s12015-013-9449-0
42. Mittal SK, Omoto M, Amouzegar A, Sahu A, Rezazadeh A, Katikireddy KR, Shah DI, Sahu SK, Chauhan SK. Restoration of corneal transparency by mesenchymal stem cells. *Stem Cell Reports*. 2016;7(4):583–90. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.09.001
43. Yao L, Bai H. Review: Mesenchymal stem cells and corneal reconstruction. *Mol Vis*. 2013; 19:2237. Yao L, Bai H. Review: mesenchymal stem cells and corneal reconstruction. *Mol Vis*. 2013;19:2237-43.
44. Li F, Zhao SZ. Control of cross talk between angiogenesis and inflammation by mesenchymal stem cells for the treatment of ocular surface diseases. *Stem Cells Int*. 2016;2016:7961816. doi: 10.1155/2016/7961816.
45. Galindo S, de la Mata A, López-Paniagua M, Herreras JM, Pérez I, Calonge M, Nieto-Miguel T. Subconjunctival injection of mesenchymal stem cells for corneal failure due to limbal stem cell deficiency: state of the art. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):60. doi: 10.1186/s13287-020-02129-0
46. Shukla S, Mittal SK, Foulsham W, Elbasiony E, Singhania D, Sahu SK, Chauhan SK. Therapeutic efficacy of different routes of mesenchymal stem cell administration in corneal injury. *Ocul Surf*. 2019;17(4):729–36. doi: 10.1016/j.jtos.2019.07.005
47. 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. *Curr Eye Res* 2013;38(9):933–44. doi: 10.3109/02713683.2013.802809
48. Kethiri AR, Singh VK, Damala M, Basu S, Rao CM, Bokara KK, Singh V. Long term observation of ocular surface alkali burn in rabbit models: Quantitative analysis of corneal haze, vascularity and self-recovery. *Exp Eye Res*. 2021;205:108526. doi: 10.1016/j.exer.2021.108526
49. Kethiri AR, Raju E, Bokara KK, Mishra DK, Basu S, Rao CM, Sangwan VS, Singh V. Inflammation, vascularization and goblet cell differences in LSCD: Validating animal models of corneal alkali burns. *Exp Eye Res*. 2019;185:107665. doi: 10.1016/j.exer.2019.05.005
50. 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(2):315–21. doi: 10.1634/stemcells.2005-0046
51. Deng SX, Borderie V, Chan CC, Dana R, Figueiredo FC, Gomes JAP, Pellegrini G, Shimmura S, Kruse FE. Global consensus on definition, classification, diagnosis, and staging of limbal stem cell deficiency. *Cornea*. 2019; 38(3):364–75. doi: 10.1097/ICO.0000000000001820

52. Reinshagen H, Auw-Haedrich C, Sorg R V., Boehringer D, Eberwein P, Schwartzkopff J, Sundmacher R, Reinhard T. Corneal surface reconstruction using adult mesenchymal stem cells in experimental limbal stem cell deficiency in rabbits. *Acta Ophthalmol.* 2011; 89(8):741–8. doi: 10.1111/j.1755-3768.2009.01812.
53. García-Vázquez C, Galindo S, López-Paniagua M, Herreras JM, Rey E, Calonge M, Nieto-Miguel T. Eficacia del trasplante de células madre mesenquimales de médula osea y de tejido adiposo en un modelo de deficiencia de células madre limbares desarrollado en conejo: estudio comparativo. In: Repositorio de la Universidad de Valladolid [Internet]. 2019 [cited 2021 Aug 23]. Available from: <https://uvadoc.uva.es/handle/10324/40507>
54. Xu B, Fan T-J, Zhao J, Sun A, Wang R-X, Hu X-Z, Yu H-Z, Fan X-Y, Xu X-H. Transplantation of tissue-engineered human corneal epithelium in limbal stem cell deficiency rabbit models. *Int J Ophthalmol.* 2012; 5(4):424. doi: 10.3980/j.issn.2222-3959.2012.04.04
55. 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. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2015; 253(7):1121–35. doi: 10.1007/s00417-015-3042-y
56. Li G, Zhang Y, Cai S, Sun M, Wang J, Li S, Li X, Tighe S, Chen S, Xie H, et al. Human limbal niche cells are a powerful regenerative source for the prevention of limbal stem cell deficiency in a rabbit model. *Sci Rep.* 2018;8(1):6566. doi: 10.1038/s41598-018-24862-6.
57. Di G, Du X, Qi X, Zhao X, Duan H, Li S, Xie L, Zhou Q. Mesenchymal stem cells promote diabetic corneal epithelial wound healing through tsg-6–dependent stem cell activation and macrophage switch. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58(10):4344–54. doi: 10.1167/iovs.17-21506
58. Ghazaryan E, Zhang Y, He Y, Liu X, Li Y, Xie J, Su G. Mesenchymal stem cells in corneal neovascularization: Comparison of different application routes. *Mol Med Rep.* 2016; 14(4):3104–12. doi: 10.3892/mmr.2016.5621
59. 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(3):e0119725. doi: 10.1371/journal.pone.0119725
60. Acar U, Pinarli FA, Acar DE, Beyazyildiz E, Sobaci G, Ozgermen BB, Sonmez AA, Delibasi T. Effect of allogeneic limbal mesenchymal stem cell therapy in corneal healing: role of administration route. *Ophthalmic Res.* 2015; 53(2):82–9. doi: 10.1159/000368659
61. Yao L, Li Z, Su W, Li Y, Lin M, Zhang W, Liu Y, Wan Q, Liang D. Role of mesenchymal stem cells on cornea wound healing induced by acute alkali burn. *PLoS One.* 2012; 7(2):e30842. doi: 10.1371/journal.pone.0030842
62. Jiang T-S, Cai L, Ji W-Y, Hui Y-N, Wang Y-S, Hu D, Zhu J. Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats. *Mol Vis.* 2010;16:1304.
63. Martinez JO, Evangelopoulos M, Brozovich AA, Bauza G, Molinaro R, Corbo C, Liu X, Taraballi F, Tasciotti E. Mesenchymal stromal cell-mediated treatment of local and systemic inflammation through the triggering of an anti-inflammatory response. *Adv Funct Mater.* 2021; 31(3):2002997. doi: 10.1002/adfm.202002997
64. Zhang N, Luo X, Zhang S, Liu R, Liang L, Su W, Liang D. Subconjunctival injection of tumor necrosis factor- α pre-stimulated bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhances anti-inflammation and anti-fibrosis in ocular alkali burns. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2021;259(4):929-940. doi: 10.1007/s00417-020-05017-8.
65. Gu S, Xing C, Han J, Tso MOM, 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.
66. Lin H-F, Lai Y-C, Tai C-F, Tsai J-L, Hsu H-C, Hsu R-F, Lu S-N, Feng N-H, Chai C-Y, Lee C-H. Effects of cultured human adipose-derived stem cells transplantation on rabbit cornea regeneration after alkaline chemical burn. *Kaohsiung J Med Sci.* 2013; 29(1):14–8. doi: 10.1016/j.kjms.2012.08.002
67. Vaïtinadapoulé H, Perrache C, Forest F, Dumollard JM, Gavid M, Gain P, Thuret G, He Z. Immunolabelling of usual and putative limbal stem cells markers on flat mounted whole human corneas. *Acta Ophthalmol.* 2021; 99(S265). doi: 10.1111/j.1755-3768.2020.0135
68. Norrick A, Esterlechner J, Niebergall-Roth E, Dehio U, Sadeghi S, Schröder HM, Ballikaya S, Stemler N, Ganss C, Dieter K, et al. Process development and safety evaluation of ABCB5+ limbal stem cells as advanced-therapy medicinal product to treat limbal stem cell deficiency. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1):194. doi: 10.1186/s13287-021-02272-2
69. Chen Z, Paiva CS de, Luo L, Kretzer FL, Pflugfelder SC, Li D-Q. Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia. *stem cells.* 2004;22(3):355–66. doi: 10.1634/stemcells.22-3-355

ANEXOS

LISTA DE ABREVIATURAS

BrdU: 5-bromo-2'-deoxiuridina

BSS: solución salina balanceada, del inglés *Balanced Salt Solution*.

CK: citoqueratina.

CLET: trasplante de células madre epiteliales de limbo cultivadas, del inglés *Cultivated Limbal Stem Cell Transplantation*.

hAT-MSCs: células madre mesenquimales de tejido adiposo humano, del inglés *human Adipose Tissue- derived Mesenchymal Stem Cells*.

LIF: formato de imagen Leica, del inglés *Leica Image Format*.

LSCD: deficiencia de células madre de limbo, del inglés *Limbal Stem Cell Deficiency*.

MSCs: células madre mesenquimales, del inglés *Mesenchymal Stem Cells*.

PAS: ácido peryódico de Schiff, del inglés *Periodic Acid-Schiff*.

PBS: tampón fosfato salino, del inglés *Phosphate Buffered Saline*.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: LOCALIZACIÓN ANATÓMICA DE LA CÓRNEA, EL LIMBO ESCLERO-CORNEAL Y LA CONJUNTIVA EN LA SUPERFICIE OCULAR.	3
FIGURA 2. ESQUEMA DE UN CORTE HISTOLÓGICO TRANSVERSAL EN EL QUE SE REPRESENTAN LAS CAPAS HISTOLÓGICAS QUE COMPONEN LA CÓRNEA.....	3
FIGURA 3: ESTRUCTURA HISTOLÓGICA DEL LIMBO.	5
FIGURA 4: HIPÓTESIS DE LA RENOVACIÓN DEL EPITELIO CORNEAL, PROPUESTA POR THOFT Y COLABORADORES.....	6
FIGURA 5: ESTRUCTURA HISTOLÓGICA DE LA CONJUNTIVA.....	7
FIGURA 6: ANÁLISIS DE UNA IMAGEN DE INMUNOFUORESCENCIA UTILIZANDO EL PROGRAMA IMAGEJ.....	13
FIGURA 7: RECUADRO DE "RESULTS" DEL PROGRAMA DE ANÁLISIS DE IMAGEN IMAGEJ.....	13
FIGURA 8: ESTUDIO HISTOLÓGICO.....	16
FIGURA 9: LOCALIZACIÓN DE LAS HAT-MSCs MARCADAS CON BRDU EN LOS TEJIDOS DE LA SUPERFICIE OCULAR DEL MODELO DE DEFICIENCIA DE CÉLULAS MADRE LIMBOCORNEALES.....	17
FIGURA 10: IMÁGENES DE INMUNOFUORESCENCIA DE LA EXPRESION DEL MARCADOR DE CÉLULAS DE EPITELIO CORNEAL CITOQUERATINA-3 (CK3).....	18
FIGURA 11 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN RELATIVA DEL MARCADOR DE EPITELIO CORNEAL CITOQUERATINA 3 (CK3)	19
FIGURA 12: IMÁGENES DE INMUNOFUORESCENCIA DE LA EXPRESIÓN DEL MARCADOR DE CÉLULAS DE EPITELIO CORNEAL E-CADHERINA.....	19
FIGURA 13: ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN RELATIVA DEL MARCADOR DE EPITELIO CORNEAL E-CADHERINA	20
FIGURA 14: IMÁGENES DE INMUNOFUORESCENCIA DE LA EXPRESION DEL MARCADOR DE CÉLULAS DE EPITELIO LIMBAR CITOQUERATINA-15 (CK15).....	21
FIGURA 15: ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN RELATIVA DEL MARCADOR DE EPITELIO LIMBAR CITOQUERATINA-15 (CK15).....	21
FIGURA 16: IMÁGENES DE INMUNOFUORESCENCIA DE LA EXPRESIÓN DEL MARCADOR DE CÉLULAS MADRE LIMBARES P63.....	22
FIGURA 17: ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN RELATIVA DEL MARCADOR DE CÉLULAS MADRE EPITELIALES LIMBARES P63	22

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: ANTICUERPOS PRIMARIOS.....	12
TABLA 2: PRESENCIA DE INFILTRADOS INFLAMATORIOS EN LOS DISTINTOS TEJIDOS DE LA SUPERFICIE OCULAR.....	16
TABLA 3: CANTIDAD DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES MARCADAS CON BRDU.....	17

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

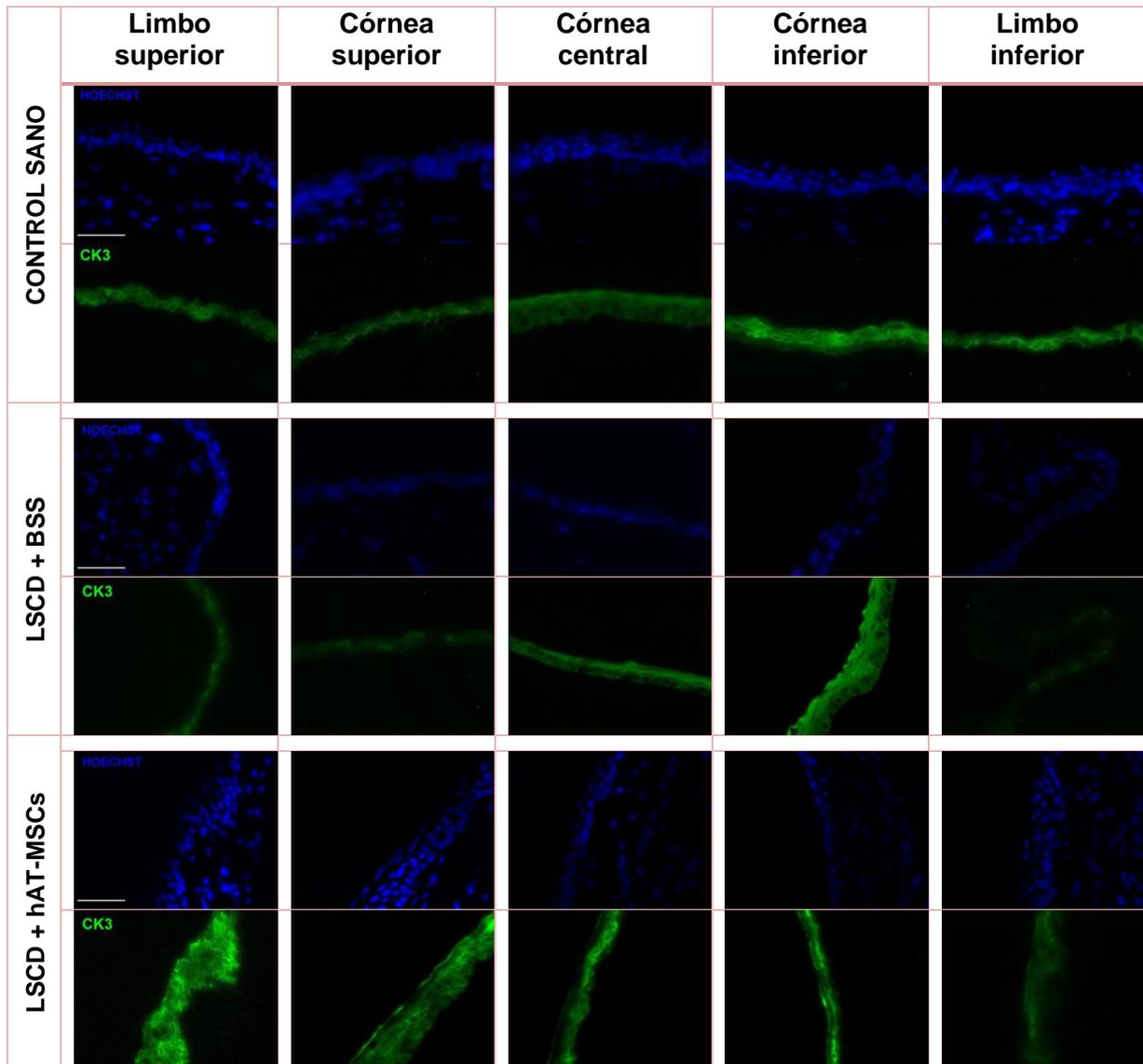


FIGURA S1: Imágenes de inmunofluorescencia de la expresión del marcador corneal citoqueratina-3 (CK3). Imágenes representativas de los tejidos la superficie ocular de los tres grupos experimentales analizados: tejidos oculares sanos (control sano), tejidos procedentes de conejos con deficiencia de células madre limbares (LSCD) inyectados subconjuntivalmente con solución vehículo sin células (LSCD + BSS) y tejidos de conejos con LSCD inyectados subconjuntivalmente con hAT-MSCs (LSCD + hAT-MSCs). En las fotografías se puede diferenciar en azul los núcleos teñidos con el colorante nuclear Hoechst y en verde la proteína CK3. Imágenes tomadas con un microscopio invertido de fluorescencia a 40X aumentos. Barra de escala= 50 μ M.

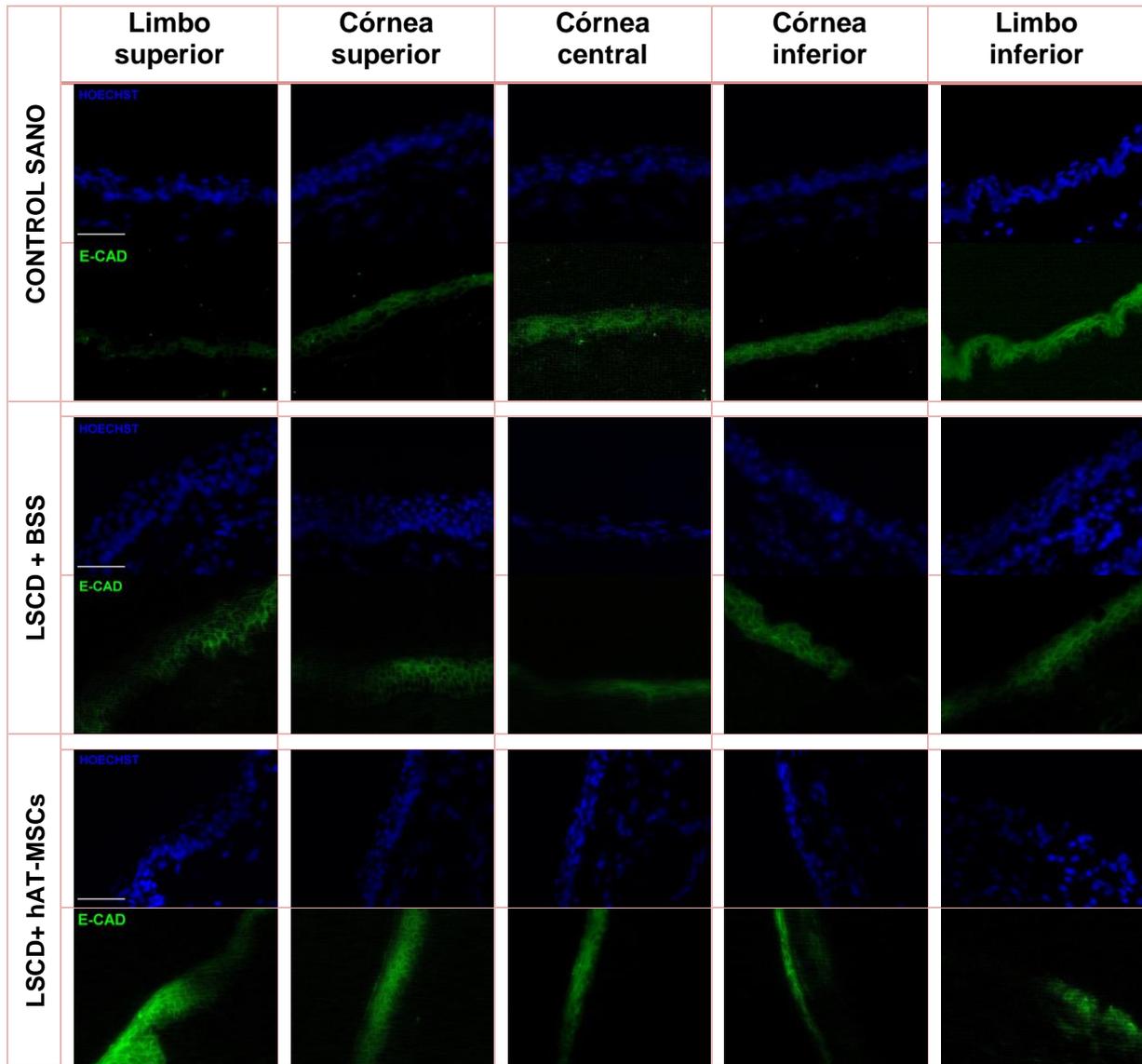


FIGURA S2: Imágenes de inmunofluorescencia de la expresión del marcador corneal e-cadherina (E-CAD). Imágenes representativas de los tejidos la superficie ocular de los tres grupos experimentales analizados: tejidos oculares sanos (control sano), tejidos procedentes de conejos con deficiencia de células madre limbares (LSCD) inyectados subconjuntivalmente con solución vehículo sin células (LSCD + BSS) y tejidos de conejos con LSCD inyectados subconjuntivalmente con hAT-MSCs (LSCD + hAT-MSCs). En las fotografías se pueden diferenciar en azul los núcleos teñidos con el colorante nuclear Hoechst y en verde la proteína E-cadherina. Imágenes tomadas con un microscopio invertido de fluorescencia a 40X aumentos. Barra de escala= 50 μ M.

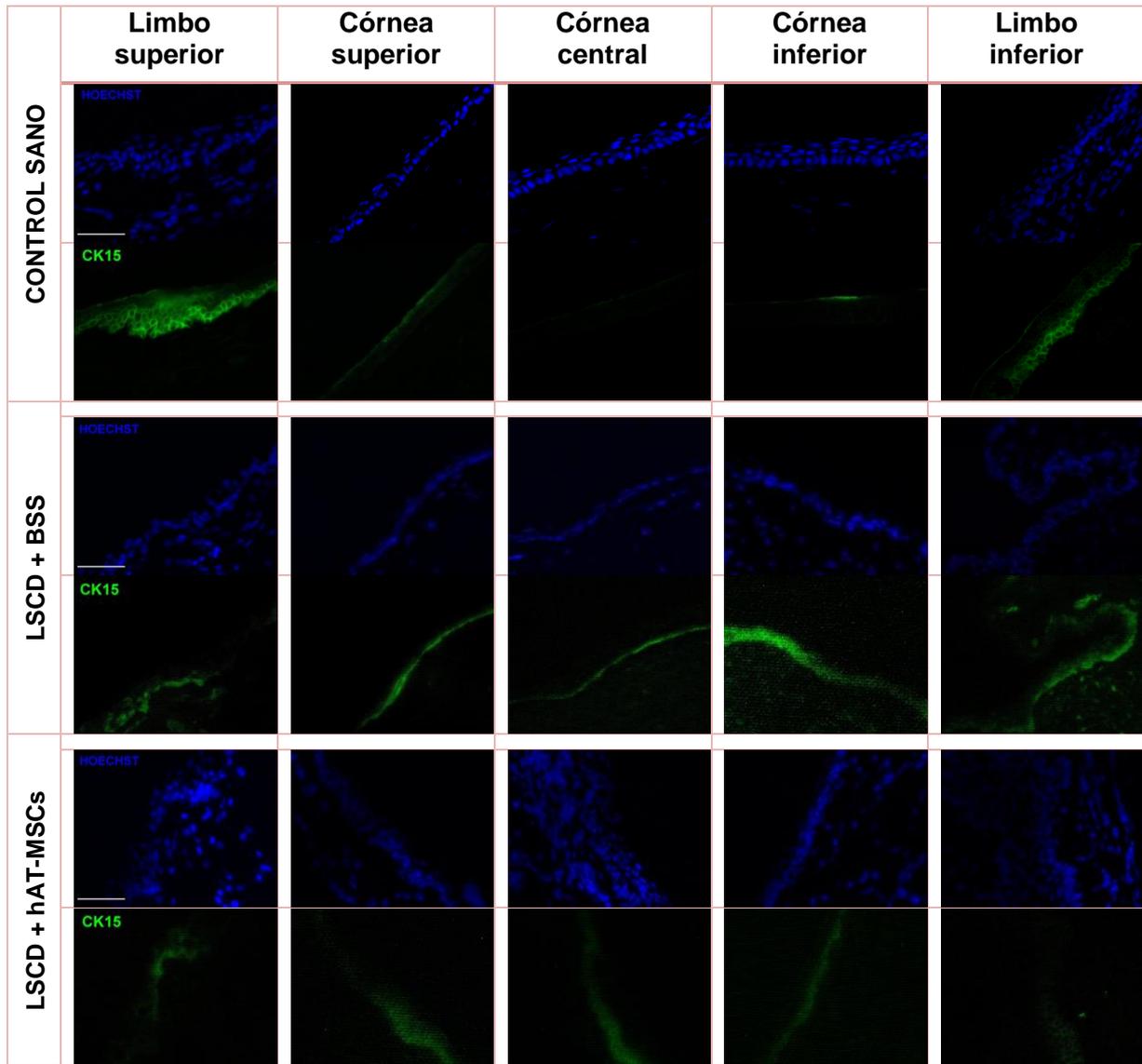


FIGURA S3: **Imágenes de inmunofluorescencia de la expresión del marcador limbar citoqueratina-15 (CK15).** Imágenes representativas de los tejidos la superficie ocular de los tres grupos experimentales analizados: tejidos oculares sanos (control sano), tejidos procedentes de conejos con deficiencia de células madre limbares (LSCD) inyectados subconjuntivalmente con solución vehículo sin células (LSCD + BSS) y tejidos de conejos con LSCD inyectados subconjuntivalmente con hAT-MSCs (LSCD + hAT-MSCs). En las fotografías se pueden diferenciar en azul los núcleos teñidos con el colorante nuclear Hoechst y en verde la proteína CK15. Imágenes tomadas con un microscopio invertido de fluorescencia a 40X aumentos. Barra de escala= 50 μ M.

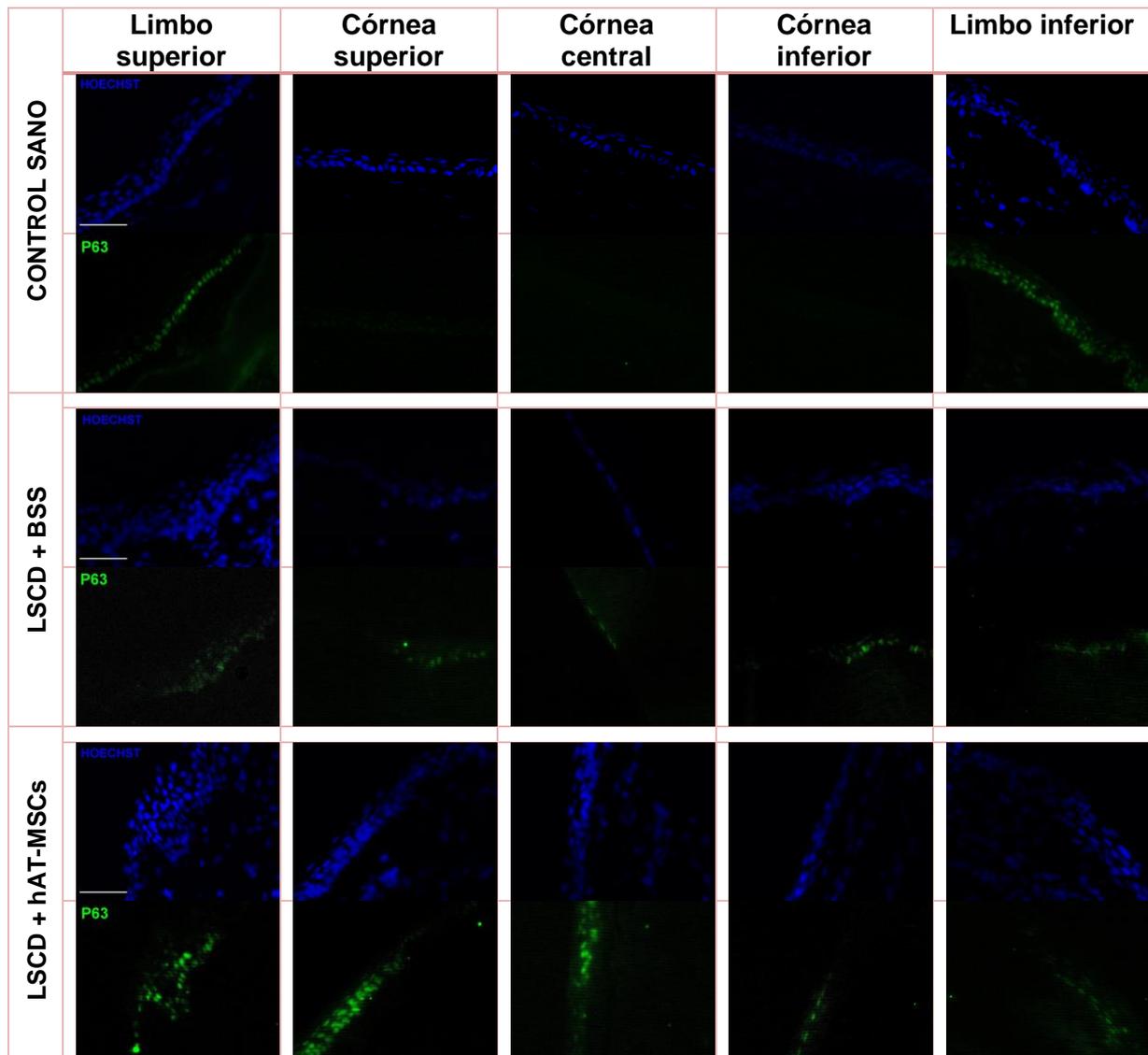


FIGURA S4: **Imágenes de inmunofluorescencia de la expresión del marcador de células madre limbares p63.** Imágenes representativas de los tejidos la superficie ocular de los tres grupos experimentales analizados: tejidos oculares sanos (control sano), tejidos procedentes de conejos con deficiencia de células madre limbares (LSCD) inyectados subconjuntivalmente con solución vehículo sin células (LSCD + BSS) y tejidos de conejos con LSCD inyectados subconjuntivalmente con hAT-MSCs (LSCD + hAT-MSCs). En las fotografías se pueden diferenciar en azul los núcleos teñidos con el colorante nuclear Hoechst y en verde el factor de transcripción p63. Imágenes tomadas con un microscopio invertido de fluorescencia a 40X aumentos. Barra de escala= 50 μ M.