



Universidad de Valladolid



PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA VISIÓN

TESIS DOCTORAL:

**Estudio mediante microscopía confocal del nicho limbar
en pacientes con síndrome de insuficiencia límica
sometidos a trasplante de células madre**

Presentada por D.^a Inmaculada Pérez Soto para optar
al grado de
Doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:
Dra. Margarita Calonge Cano y Dr. Jose María Herreras Cantalapiedra



Universidad de Valladolid



PROGRAMA DE DOCTORADO CIENCIAS DE LA VISIÓN

TESIS DOCTORAL:

**Estudio mediante microscopía confocal del
nicho limbar en pacientes con síndrome de
insuficiencia límbica sometidos a trasplante de
células madre**

Presentada por D.^a Inmaculada Pérez Soto
para optar al grado de
Doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:
Dra. Margarita Calonge Cano y Dr. José María Herreras
Cantalapiedra

Valladolid 2017



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR/A DE TESIS

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

D^a Margarita Calonge Cano con D.N.I 09255952-Q, Profesora del departamento de Cirugía, Oftalmología, Otorrinolaringología y Fisioterapia, de la Universidad de Valladolid.

Centro: Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada de Valladolid

e-mail: calonge@ioba.med.uva.es, con dirección a efecto de notificaciones en IOBA, Campus Miguel Delibes, Paseo Belén, 17 ,47011 Valladolid

D. José María Herreras Cantalapiedra con D.N.I. 09271358-N, Profesor del departamento de Cirugía, Oftalmología, Otorrinolaringología y Fisioterapia de la Universidad de Valladolid.

Centro: Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada de Valladolid

e-mail herreras@ioba.med.uva.es, con dirección a efecto de notificaciones en IOBA, Campus Miguel Delibes, Paseo Belén, 17 ,47011 Valladolid

Como Directores de la Tesis Doctoral titulada “Estudio mediante microscopia confocal del nicho limbar en pacientes con Síndrome de Insuficiencia Límica sometidos a trasplante de células madre” realizada por D^a María Inmaculada Pérez Soto, alumna del Programa de Doctorado en Ciencias de la Visión, autorizan su presentación, considerando que es **apta** para su defensa.

Valladolid, 10 de marzo de 2017

Los Directores de la Tesis,

Fdo.: Margarita Calonge Cano

Fdo.: José M^a Herreras Cantalapiedra

SR/SRA. PRESIDENTE/A DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO

Tesis doctoral: "Estudio mediante microscopía confocal del nicho limbar en pacientes con síndrome de insuficiencia límbica sometidos a trasplante de células madre"

A mis padres Eduardo y Pilar

A mi compañero Vicen

A mis maravillosas hijas Aurora y Mencía

Tesis doctoral: "Estudio mediante microscopía confocal del nicho limbar en pacientes con síndrome de insuficiencia límbica sometidos a trasplante de células madre"

"Todos somos genios. Pero si juzgas a un pez por su habilidad de trepar un árbol, vivirá toda su vida creyendo que es estúpido." Albert Einstein

"La observación indica cómo está el paciente; la reflexión indica qué hay que hacer; la destreza práctica indica cómo hay que hacerlo. La formación y la experiencia son necesarias para saber cómo observar y qué observar; cómo pensar y qué pensar."

Florence Nightingale

Agradecimientos

Una vez concluida la tesis, es imprescindible repasar el camino que has recorrido y valorar a las personas que han influido en este proceso de diferentes formas, colaborando para llegar al fin de la aventura.

Debo agradecer en primer lugar a mis padres Eduardo y Pilar todo lo que me han dado, es imposible poder enumerar todas esas cosas pequeñas y grandes que los padres hacen por ti; espero poder devolverles algún día una mínima parte de ello. Algo que seguro que he aprendido de ellos es a mejorar cada día y eso no lo voy a olvidar.

A Vicen, por su apoyo, por ser mi compañero incansable, por hacer que todos mis días sean especiales y ayudarme a lograr mis sueños. Mil gracias.

A mis hijas Aurora y Mencía por enseñarme desde que nacieron lo que es realmente importante en la vida y por sus sonrisas sin las que ya, no sabría vivir.

A mis tías Mayte y Adita, porque son como una madre más y siempre pude contar con ellas.

A mis antiguas compañeras María Angeles y Rita con las que empecé mi camino en la oftalmología y que plantaron los cimientos de la profesional en la que me he convertido.

Al profesor Pastor por inculcarme las motivaciones para participar en la investigación, animar en los momentos duros y confiar en mi capacidad.

A los colaboradores del IOBA que me "prestaron sus ojos" para practicar: Verónica, José Alberto, Sara, Ana, Jose, Claudia, Marisa y Guadalupe.

A mis compañero/as Inés, Angela, Anita, Guadalupe y Rubén por haberme ayudado directamente en la atención de los pacientes que participaron en mi proyecto.

Y en especial a Inés y Guadalupe, porque siempre me han aportado algo más con su amistad incondicional.

A Rubén y José Alberto por su ayuda en los toques finales.

A Sara que me ayudó a entender la estadística más básica y me aconsejó en la redacción de los resultados.

A Raquel, Verónica, Erma, Yrbani, Lidia, Lucía, Cristina, Jimena ... por su ayuda en la atención de los pacientes del estudio.

A Victoria que me ayudó a ser rigurosa en mis comienzos con mi TFM y cuyos consejos me han ayudado mucho.

A todos mis compañeros ópticos (José Alberto, Rubén, Angela, Guadalupe y Ana), enfermeras (Marisa, Esther, Eva, María e Inés), TCAE (Pepe) y secretarías (Virginia, Nuria A., Nuria J., Amaya y Lourdes) que han contribuido a que mi trabajo diario sea algo más que un trabajo y con los cuales siempre puedo contar.

A Lourdes, MariPaz y Ana por su ayuda directa en todos los procesos administrativos que una tesis conlleva.

A Itziar sin cuyos análisis estadísticos y explicaciones no habría podido terminar.

Al departamento de anatomía patológica del IOBA y en especial a Jose Carlos por sus explicaciones.

A los integrantes del Grupo de superficie ocular que han construido un gran grupo de trabajo y que siempre me han ayudado en todo lo que he necesitado, en especial a Sara y Marina que compartieron conmigo el mundo de las células madre.

A los pacientes que participaron en este proyecto por su paciencia y su disponibilidad.

A Dario y Beatriz que realizaron el primer proyecto y nos dieron las claves para seguir en la investigación. Y a Marisa Tesón por ayudarme con el aprendizaje del microscopía confocal in vivo.

A mi directora la Dra. Calonge por sus aportaciones y su apoyo durante el proyecto, sus esfuerzos y desvelos para obtener lo mejor de mi y sus consejos en esta trayectoria académica.

Y por último, a mi director Dr. José María Herreras por su paciencia y entrega, por haber tenido fe en mi desde el principio hasta el final.

En general a todos aquellos nombrados o no que han permitido que este proyecto tenga un final feliz.

Infinitas gracias.

Currículum Vitae de Inmaculada Pérez Soto

- **Posición actual**
 - Enfermera contratada en el IOBA, Universidad de Valladolid
 - Profesor Asociado 3+3 en el Departamento de Cirugía, Oftalmología, Otorrinolaringología y Fisioterapia, Universidad de Valladolid.
- **Estudios universitarios**
 - 06/1996- 06/1999: Diplomado Universitario en Enfermería. Escuela Universitaria de Enfermería, Universidad de Valladolid.
 - Curso 1999- 2000: Especialista Universitario en Enfermería Oftalmológica. IOBA, Universidad de Valladolid (título propio).
 - Curso 2010-2011: Máster Universitario Oficial en Investigación en Ciencias de la Visión. Coordinado por IOBA, Universidad de Valladolid.
- **Actividad docente**
 - Cursos 2013-2014, 2014-2015, 2015-2016 y 2016-2107. Con plaza de profesor asociado 3+3. Docencia en el Grado de Óptica y Optometría, en las siguientes asignaturas:
 - Prácticas en equipos de oftalmología y sistemas diagnósticos.
 - Farmacología ocular
 - Habilidades quirúrgicas en las intervenciones oftalmológicas
 - Recuerdo de anatomía y fisiopatología ocular
 - Urgencias en la consulta de oftalmología.
 - Cursos 2010-2011, 2011-2012, 2012-2013, 2013-2014, 2014-2015, 2015-2016 y 2016-2017. Profesor colaborador en el Máster Universitario de Enfermería Oftalmológica.
- **Dirección de trabajos de investigación**
 - Curso 2011-12. "**Estudio de técnicas biométricas. Cálculo de potencia de LIO**". Trabajo Fin del Máster Universitario de Enfermería Oftalmológica de la alumna: Leivin Cariniy Torres Hernández.
 - Curso 2013-14. "**Evaluación de la lente fáquica de cámara posterior con puerto central para la corrección de la alta miopía**". Trabajo Fin del Máster Universitario de Enfermería Oftalmológica de la alumna: Belén Ruiz Rojas.

- **Actividad investigadora**

- Curso 2010-2011. Realización de Trabajo Fin de Máster en Ciencias de la visión titulado “**Evaluación de las modificaciones en la superficie ocular inducidas por la cirugía de catarata**” que obtuvo el premio a la mejor comunicación científica en el XI Congreso de la Sociedad Española de Enfermería Oftalmológica. Oviedo. Septiembre 2011.

- **Proyectos de investigación**

- Subvención para la realización de proyectos de investigación en biomedicina, gestión sanitaria y atención socio sanitaria de uno o dos años de duración en el Marco de la Política de I+D+I de la Junta de Castilla y León. Resolución del 26 de agosto de 2011. Con el proyecto titulado “Evaluación de las modificaciones de la superficie ocular por la cirugía de cataratas”.
- Participación en el Proyecto de Innovación Docente con el título “Diseño del sistema de evaluación integral y virtual del aprendizaje basado en el desarrollo de competencias y su aplicación profesional para el Máster Universitario de Enfermería Oftalmológica” desarrollado durante el año 2011.
- Participación en el ensayo clínico ““Terapias avanzadas para la reconstrucción de la superficie ocular. Trasplante alogénico de células madre epiteliales limbares (TACM-LE) frente a mesenquimales de médula ósea (TACM-MO): ensayo clínico randomizado y doble-enmascarado” aprobado en diciembre de 2012
- Participación en el proyecto de investigación “Desarrollo de un nuevo producto de terapia avanzada para la regeneración y reconstrucción de la superficie ocular en el proyecto "BioscaffEye" y transferencia del proyecto y de los resultados del mismo" desarrollado en la Universidad de Valladolid aprobado en 2013.
- Participación en el proyecto “Transformando eficacia en eficiencia: del trasplante de epitelio limbar al de células mesenquimales adiposas para tratar la ceguera por fracaso de la superficie ocular”. **Entidad financiadora:**

Tesis doctoral: "Estudio mediante microscopía confocal del nicho limbar en pacientes con síndrome de insuficiencia límica sometidos a trasplante de células madre"

Ministerio de Economía y Competitividad. Fondo Europeo de Desarrollo

Regional. **Referencia:** SAF2015-63594-R (MINECO/FEDER). **Entidades**

participantes: Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada

Universidad de Valladolid (IOBA-UVA), Centro de Investigación Biomédica

en Red (CIBER). **Duración:** 01/01/2016-31/12/2018. **Cuantía de la**

subvención: 121.000 €. **Equipo investigador:** Margarita Calonge Cano (IP),

Teresa Nieto-Miguel (Co-IP), David Galarreta Mira, Inmaculada Pérez Soto.

Equipo de trabajo: Marina López Paniagua, Sara Galindo de la Rosa,

Carmen García Vázquez.

- Participación en proyecto solicitado. XIV edición de ayudas a la investigación. Fundación Mutua Madrileña. Proyecto: "Terapias avanzadas para la reconstrucción de la superficie ocular en pacientes con aniridia congénita. Trasplante de células madre mesenquimales y recuperación del gen Pax6 mutado mediante terapia génica" en 2017.

- **Divulgación científica.**

- 15/11/2012: HRT de córnea. Sesión clínica. Formación continuada. Hospital Clínico Universitario de Valladolid.
- Febrero 2013. Taller práctico para la utilización y análisis de HRT III. Residentes de Oftalmología. Hospital Clínico Universitario de Valladolid.
- 18/03/2013. Medicina regenerativa y superficie ocular. Sesión de coordinación con el Instituto Carlos III. IOBA. Universidad de Valladolid.
- 03/06/2014. Sesión formativa práctica de manejo de HRT III. IOBA. Universidad de Valladolid.
- 19/12/2014. Análisis de la superficie ocular mediante microscopía confocal en pacientes diagnosticados de síndrome de insuficiencia límica y sometidos a trasplante de células madre epiteliales expandidas ex vivo. Día del IOBA. Universidad de Valladolid.
- Septiembre 2015. HRT III. Utilidad en la práctica habitual. XV Congreso de la sociedad española de enfermería oftalmológica. Sevilla.
- Septiembre 2015. Análisis del limbo corneal mediante microscopía confocal. XV Congreso de la sociedad española de enfermería oftalmológica. Sevilla.

- Curso lectivo 2015-2016. Desarrollo de un proyecto de tesis doctoral. Análisis de la superficie ocular mediante microscopía confocal en pacientes diagnosticados de síndrome de insuficiencia límica y sometidos a trasplante de células madre epiteliales expandidas ex vivo. HRT córnea. Máster de Universitario de Enfermería Oftalmológica. Universidad de Valladolid.
- 16/02/2017. Evaluación preoperatoria mediante HRT III. Jornadas de Terapia regenerativa de la superficie ocular y queratoplastias. Colegio oficial de médicos de Valladolid. Valladolid.
- **Asistencia a reuniones científicas**
 - Diciembre de 2011. Sesiones de formación para la utilización y análisis de imágenes de HRT III. Profesor Dra. Marisa Tesón. IOBA. Valladolid.
 - 11/01/2012, 12/01/2012, 18/01/2012, 26/01/2012, 08/02/2012, 09/02/2012, 10/02/12, 23/02/2012 y 15/03/12. Prácticas de utilización y manejo de HRT III con voluntarios sanos. Análisis de córnea central y zona limbar. IOBA. Universidad de Valladolid.
 - Septiembre 2012. XIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermería Oftalmológica. Barcelona.
 - 15/11/2012. Formación continuada. Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Valladolid.
 - 18/03/2013. Medicina regenerativa y superficie ocular. Sesión de coordinación. Instituto Carlos III. Valladolid.
 - 19/12/2014. Sesión de divulgación de proyectos científicos de estudiantes del programa interuniversitario de doctorado en Ciencias en la Visión. Día del IOBA. Valladolid.
 - Octubre 2015. Realización de proyectos de investigación en enfermería. Sociedad Española de Enfermería Oftalmológica. Curso on line.
 - Septiembre 2015. XV Congreso de la Sociedad Española de Enfermería Oftalmológica. Sevilla.
 - 16/02/2017. Evaluación preoperatoria mediante HRT III. Jornadas de Terapia regenerativa de la superficie ocular y queratoplastias. Colegio Oficial de Médicos de Valladolid.

Financiación

Esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la financiación obtenida de las siguientes fuentes:

- Ministerio de Sanidad y Política Social. EC10-256: Terapias avanzadas para la reconstrucción de la superficie ocular. Trasplante alogénico de células madre epiteliales limbares frente a mesenquimales de médula ósea: ensayo clínico randomizado y doble-enmascarado. Nº Eudra CT 2010-023535-42. 02/12/2011-02/12/2012. IP.: Margarita Calonge Cano. Financiación: 250.000 €. (Anexo 1)
- Instituto de Salud Carlos III: Centro en Red de Medicina Regenerativa y Terapia Celular de Castilla y León.
- Instituto de Salud Carlos III: Centro de Investigación Biomédica en Red en Biomateriales, Bioingeniería y Nanomedicina (CIBER-BBN).
- Red Nacional de Terapia Celular (TerCel). Instituto de Salud Carlos III.



Divulgación científica

El proyecto que ha constituido esta tesis doctoral ha dado lugar a las siguientes comunicaciones científicas (las marcadas * han sido impartidas directamente por Inmaculada Pérez)

1. *15/ 11/ 2012: HRT de córnea. Sesión clínica. Formación continuada. Hospital Clínico Universitario de Valladolid.
2. 19-20/02/2013. "*Who are the patients and how they are treated*" CME Seminario. Centro de Investigación y Desarrollo para Innovaciones Oftalmológicas (SILK), Universidad de Tampere. "*Ocular surface bioengineering and stem cell therapy*". Centro de Investigación y Desarrollo para Innovaciones Oftalmológicas (SILK) seminario. Universidad de Tampere.
3. *18/03/2013. Medicina regenerativa y superficie ocular. Sesión de coordinación. Instituto Carlos III. Valladolid.
4. 12/04/2013. Terapia celular en superficie ocular. XIII Congreso de la Asociación Española de Banco de Tejidos. AEBT. Palma de Mallorca.
5. 18/7/2013. "*SCT in Ophthalmology*". *Cell Therapy from the bench to the bedside and return*. Universidad Internacional del Mar. Los Alcazares, Murcia.
6. 21-22/11/2013. "*Bio-engineered stem cell niches in ocular surface reconstruction: from basic research to clinical trials*". Moderador de sesión: Biomaterials. 7 Annual Conference CIBER-BBN. Torremolinos, Málaga.
7. 29/11/2013. "*Limbal stem cell deficiency-Management with LSC cell therapy*", "*New advances in dry eye diagnosis and management*". 20th Encuentro MCLOSA. Londres.
8. *19/12/ 2014. Análisis de la superficie ocular mediante microscopía confocal (mc) en pacientes diagnosticados de síndrome de insuficiencia límica (sil) y sometidos a trasplante de células madre epiteliales expandidas ex vivo. Día del IOBA. Valladolid, 2014.
9. *Septiembre 2015. HRT III. Utilidad en la práctica habitual. XV Congreso de la sociedad española de enfermería oftalmológica. Sevilla.

10. *Septiembre 2015. Análisis del limbo corneal mediante microscopía confocal. XV Congreso de la sociedad española de enfermería oftalmológica. Sevilla.
11. 23/10/2015. "Terapias avanzadas: células oculares, otras fuentes celulares, ingenierías de tejidos". 91 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología (SEO). Sevilla.
12. *Curso lectivo 2015-2016. Desarrollo de un proyecto de tesis doctoral. Análisis de la superficie ocular mediante microscopía confocal en pacientes diagnosticados de síndrome de insuficiencia límbica y sometidos a trasplante de células madre epiteliales expandidas ex vivo. HRT córnea. Máster de especialista en enfermería oftalmológica. Universidad de Valladolid.
13. 22/01/2016. "*Cell therapy in ocular surface*". 1st Simposio sobre investigación en Inflamación ocular. Bilbao.
14. 30/6-02/07/2016. "*Regenerative medicine for the ocular surface*". V SIRCOVA Congreso Internacional.
15. 24-26/02/2017. "*Limbal Stem Cell Transplantation for Ocular Surface Disease Management*". Segmento Anterior Sonoma Eye 2017, Sonoma, California, 2017.
16. *16/02/2017. Evaluación preoperatoria mediante HRT III. Jornadas de Terapia regenerativa de la superficie ocular y queratoplastias. Hospital Clínico Universitario de Valladolid.
17. 24-25/03/2017: "Aniridia Congenita: terapia celular". XVII Encuentro Anual de Aniridia. Camping del Escorial.
18. Aceptado. 2017. A Randomized Controlled Trial of Cultivated Limbal Epithelial Cells Compared to Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Corneal Failure due to Limbal Stem Cell Deficiency. Presentación en ponencia en Conexiones Globales en Investigación de la Visión. Baltimore. Maryland. Reunión Anual ARVO.

Abreviaturas

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.

AV: Agudeza visual.

BPA: Biomicroscopía de polo anterior.

CAT: Célula amplificadora transitoria.

CIC: Citología de impresión conjuntival.

c-CLAL: Trasplante conjuntivo-limbar alogénico de donante cadáver.

CLAU: Trasplante conjuntival limbar-autólogo.

CLET: Trasplante de células epiteliales limbares cultivadas

DLAK: Queratoplastia lamelar profunda anterior.

DT: Desviación típica.

EVELAU: Trasplante de células madre de limbo de donante vivo o cadáver.

HRT: Tomógrafo de retina Heidelberg.

IBGM: Instituto de Biología Molecular y Genética.

IC: Intervalo de confianza.

IQR: Rango intercuartílico.

Ir-CLAL: Trasplante conjuntivo-limbar alogénico de donante vivo.

IrEVELAU: Trasplante de células madre de limbo tras expansión ex vivo autólogo.

KLAL: Trasplante keratolimbar alogénico.

MCIV: Microscopio confocal in vivo.

MSCT: Trasplante alogénico de células madre mesenquimales.

PBS: Solución salina tamponada con fosfato.

RCM: Rostock Cornea Module.

SIL: Síndrome de insuficiencia límica o limbar.

Resumen de la tesis doctoral

Justificación. Cuando el limbo esclero-corneal, nicho de las células madre epiteliales corneales, sufre una alteración funcional o estructural extensa, se desarrolla un síndrome de insuficiencia limbar (SIL) que conduce al fracaso del epitelio corneal, causando disminución visual y dolor. El abordaje quirúrgico más actual de los SIL completos y graves es la terapia celular y, concretamente, los trasplantes de epitelio limbar cultivado (CLET), en los que nuestro grupo de trabajo ya tiene experiencia y que se aprueban, de momento, de forma individual, por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.

Hipótesis. Para demostrar que los trasplantes de células madre mesenquimales (MSCT) también podrían ser útiles, disminuyendo los costes sanitarios y la morbilidad del receptor, se planteó la hipótesis de que los MSCT alogénicos eran tan bien tolerados y eficaces como los CLET alogénicos. Pero, además, se planteó que estas terapias no lograban mejorar la arquitectura del nicho limbar, ni siquiera en los casos exitosos.

Objetivos. Se planteó la descripción de las variables clínicas, el fenotipo del epitelio central de la córnea y del nicho limbar, mediante microscopía confocal in vivo (MCIV) en estos dos grupos de estudio previo a la cirugía de trasplante. Se establecieron los posibles cambios clínicos y del fenotipo del epitelio del centro corneal y la modificación microscópica del nicho limbar a los 6 y 12 meses tras la realización de un trasplante de células madre, tanto CLET como MSCT, discerniendo éxitos de fracasos. Y por último, se evaluó la existencia de una posible relación entre un resultado final de éxito o fracaso en la reconstrucción del epitelio corneal central y un posible cambio en el aspecto microscópico del nicho limbar.

Metodología. Se realizó un ensayo clínico de prueba de concepto, en fase I/II aleatorizado, controlado y doble enmascarado con ambos tipos celulares. Las variables de éxito requerían, no sólo una mejoría clínica (éxito parcial) sino también una mejoría en el fenotipo epitelial corneal central evaluado por microscopía confocal in vivo (éxito completo), a los 6 y a los 12 meses tras el trasplante. Con esta misma técnica, se evaluó exhaustivamente el nicho limbar en sus cuatro cuadrantes.

Resultados. Los MSCT (n=17) fueron tan seguros y eficaces (éxito global del 77,8% y 85,7% a los 6 y 12 meses) como los CLET (n=11) (72,7 y 76,5% a los 6 y 12 meses). La mejora del fenotipo epitelial central corneal a los 12 meses para MSCT (71,4%) no mostró diferencias significativas con el grupo CLET (66,7%). En el nicho limbar, no se observaron cambios significativos ni entre grupos ni entre visitas.

Conclusiones. Las células madre mesenquimales alogénicas han demostrado ser tan seguras y eficaces como las limbares alogénicas para reconstruir epitelio corneal. El éxito o fracaso de dichos tratamientos no está determinado por la situación anatómica del nicho limbar, pues éste no ha mostrado signos de recuperación estructural.

Tesis doctoral: "Estudio mediante microscopía confocal del nicho limbar en pacientes con síndrome de insuficiencia límbica sometidos a trasplante de células madre"

Índice

Índice

1. Justificación	3
2. Hipótesis	9
3. Objetivos	13
4. Introducción	17
4.1. Superficie ocular	17
4.1.1. Córnea	17
4.1.2. Conjuntiva	22
4.1.3. Nicho limbar	23
4.2. Células madre	27
4.2.1. Células madre mesenquimales	31
4.3. Nicho limbar	32
4.4. Síndrome de insuficiencia límbica o limbar (SIL)	36
4.4.1. Concepto y epidemiología.....	36
4.4.2. Fisiopatología y clínica	39
4.4.3. Diagnóstico.....	43
4.4.4. Tratamiento	52
5. Metodología	59
5.1. Diseño del estudio y pacientes	59
5.2. Aleatorización y enmascaramiento	62
5.3. Procedimientos	63
5.3.1. Elaboración de los productos de terapia celular	63
5.3.2. Cirugías del trasplante.....	65
5.4. Evaluación de los resultados	66
5.4.1. Cuestionarios clínicos.....	67
5.4.2. Agudeza visual.....	67
5.4.3. Valoración clínica de la superficie ocular	70
5.4.4. Otros procedimientos	71
5.4.5. Microscopía confocal <i>in vivo</i> (MCIV)	71
5.4.5.1. Evaluación de la córnea central.....	73
5.4.5.2. Evaluación del nicho limbar	73

5.4.6.	Valoración final	75
5.4.6.1.	Definición de éxito o fracaso del trasplante celular	75
5.4.6.2.	Definición de éxito o fracaso en la reconstrucción del nicho limbar	76
5.5.	Análisis estadístico	76
6.	Resultados	81
6.1.	Resultados del ensayo clínico	81
6.1.1.	Características de la muestra del ensayo	81
6.1.2.	Complicaciones. Efectos adversos	84
6.1.3.	Evaluación final del ensayo: objetivos primarios y secundarios	86
6.1.3.1.	Síntomas y signos clínicos	88
6.1.3.2.	Fenotipo epitelial en la córnea central	90
6.1.3.3.	Resultado definitivo de éxito o fracaso del trasplante celular	91
6.2.	Resultados de la evaluación del nicho limbar	96
6.2.1.	Análisis de la colaboración del paciente	96
6.2.2.	Evaluación de los diferentes parámetros en el nicho limbar	98
7.	Discusión	113
8.	Conclusiones	135
9.	Bibliografía	139
11.	Anexos	
11.1	Anexo 1. Aprobación de las ayudas para la investigación independiente para el ensayo clínico.	
11.2	Anexo 2. Aprobación del proyecto de investigación por el comité ético.	
11.3	Anexo 3. Resolución de autorización del ensayo clínico por la AEMPS.	
11.4	Anexo 4. Registro del ensayo en <i>The Clinical Trials.gov</i>.	
11.5	Anexo 5. Consentimiento informado.	
11.6	Anexo 6. Visita 1. Visita de inicio.	
11.7	Anexo 7. Cuaderno del paciente. Cuestionario SIDEQ, OSDI y VFQ25.	
11.8	Anexo 8. Tablas con datos globales de los pacientes.	

Tesis doctoral: "Estudio mediante microscopía confocal del nicho limbar en pacientes con síndrome de insuficiencia límbica sometidos a trasplante de células madre"

Justificación

1. Justificación

La córnea es la cubierta anterior y más externa del ojo. Es una estructura avascular y transparente, formada por 5 capas.

La capa más externa es el epitelio corneal, cuya regeneración se produce aproximadamente cada 7 días. Este proceso se lleva a cabo gracias a las células madre epiteliales situadas en el nicho celular limbar, que asienta en el limbo esclero corneal. El limbo es la zona de transición entre la córnea transparente por un lado y, la conjuntiva y esclera opacas por otro. Estas células se hallan en la parte más profunda de unas estructuras limbares denominadas empalizadas de Vogt de manera que se encuentran más protegidas del exterior.^{1,2}

Cuando esta región de la superficie ocular sufre una alteración lo suficientemente importante como para que la función del nicho limbar se altere y desencadene patología corneal, se produce el cuadro clínico denominado síndrome de insuficiencia límbica o limbar (SIL).³

El SIL tiene dos componentes interrelacionados. Por un lado, se rompe la barrera limbar, favoreciendo la penetración de tejido conjuntival en la córnea, fenómeno conocido como conjuntivalización o pannus. Por otro lado, al fallar las células madre, se altera la regeneración del epitelio corneal, produciendo un fracaso del mismo que se manifiesta como una alteración de la barrera epitelial de la córnea y, finalmente, como defectos epiteliales persistentes y recurrentes o úlceras epiteliales corneales. Naturalmente estos dos fenómenos van frecuentemente asociados.¹

Estas alteraciones de la superficie corneal generan una clínica caracterizada por fotofobia, pérdida de visión, lagrimeo, blefaroespasma y episodios reiterados de dolor, provocados por las erosiones epiteliales y la inflamación subsiguiente.⁴

El tratamiento tiene, en primer lugar, un abordaje médico, destinado a tratar la causa y a controlar la inflamación; en segundo lugar, y si no se soluciona con el tratamiento médico, habrá de abordarse quirúrgicamente, con el fin general de aportar nuevas células madre.

La opción quirúrgica utilizada hasta hace pocos años era el trasplante de tejido limbar esclero-corneal autólogo (procedente del ojo sano contralateral) o alogénico (procedente de otro individuo donante, vivo o cadáver). Nuestro grupo de trabajo⁵ mostró, en su estudio retrospectivo y multicéntrico (en el que intervinieron centros de la Red Temática de Investigación Cooperativa en Oftalmología del instituto de Salud Carlos III), que se obtenían mejores resultados en los trasplantes de limbo autólogo (81% de éxitos) que en los alogénicos (7,1% de éxitos). Además, el trasplante autólogo no precisa, lógicamente, tratamiento inmunosupresor, pues no podrán aparecer fenómenos de rechazo inmune. Este estudio también se confirmó que el éxito era menor (14,3%) en patología inflamatoria de base inmunológica y mayor (80%) en el pterigium. El mayor porcentaje de éxito se observó en los trasplantes de limbo autólogos y mujeres, en las cuales, se hallaron pobres resultados en trasplantes alogénicos.

El resultado de este trabajo en nuestro entorno, además de otros publicados en otras localizaciones geográficas, dejó claro que era necesario buscar otras soluciones que no implicaran trasplantar tejidos, sino células. Así, no sería necesario agredir a un ojo donante sano, se trasplantaría una cantidad de células mucho mayor y, además, la inmunosupresión en el caso de trasplante alogénico, no habría de ser tan intensa y duradera. De esta manera, nació, en 1997,⁶ la opción de trasplantar células limbares cultivadas en un sustrato específico con el que se pretende el traspaso de un gran número de ellas a partir de una donación de tan solo 1-2 mm². Nuestro grupo de trabajo empezó a trabajar en este tema, demostrando la posibilidad de obtener más de un explante limbar viable de células madre cultivadas de una sola muestra de biopsia⁷ y optimizando así mismo los diferentes métodos de extracción de las células limbares a partir del tejido⁸ y los medios de cultivo.⁹

En los últimos años, se han publicado numerosos estudios y ensayos clínicos en los que el trasplante de células limbares epiteliales previamente cultivadas demostró ser seguro y eficaz. De hecho, también nuestro grupo de trabajo avanzó en esta línea, publicando recientemente un estudio en el que se realizaron dichos trasplantes celulares, tanto autólogos como alogénicos a pacientes con SIL de diversas etiologías y

Tesis doctoral: "Estudio mediante microscopía confocal del nicho limbar en pacientes con síndrome de insuficiencia límbica sometidos a trasplante de células madre"

en el que se demostró una tasa de éxito, (80% en los dos primeros años), igual para autotrasplantes que para alotrasplantes.¹⁰

Posteriormente, y para solventar los problemas de obtención del tejido limbar de donante, nuestro grupo de trabajo se ha planteado la posibilidad de usar células mesenquimales, en concreto de tejido adiposo humano, lo cual permite una adquisición fácil y más rentable. De hecho, hemos demostrado *in vitro* la capacidad de estas células de obtener un fenotipo más epitelial,¹¹ y su eficacia en modelos experimentales de SIL.¹² Sin embargo, aún no se ha demostrado su seguridad y eficacia en estudios clínicos.

Pero esta solución, es decir, el trasplantar células madre de la superficie ocular, en principio, no parece suficiente para asegurar la reconstrucción de la superficie ocular normal. Al administrar únicamente células, no se implanta el nicho en el cual maduran; por lo tanto, sería de gran importancia que estas células fuesen capaces de crear su propio nicho de crecimiento y asegurar así la viabilidad de su futuro y el del epitelio corneal.

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la herida por una biopsia límbica de tan solo 1-2 mm² para su posterior cultivo y trasplantes, deja una cicatriz permanente (al menos hasta los 6 meses posteriores) y que el nicho, en esa zona, no recupera su anatomía normal previa.¹³ Pero se desconoce si el trasplante celular limbar, aún siendo exitoso en la reparación del epitelio corneal, mejoraría la apariencia histológica del nicho limbar; es decir, no se sabe aún si el trasplante de células madre en la superficie ocular funcionaría, al menos en parte, promoviendo una vuelta, aunque fuera parcial, a la normalidad previa. De hecho, a día de hoy, aún se desconoce el mecanismo de acción por el cual los trasplantes de células madre, logran éxito sobre la superficie corneal.

Por lo tanto, se hace necesario saber como se modifica el nicho limbar ante la aportación externa de células madre, no sólo para intentar averiguar un aspecto de su mecanismo de acción sino también antes de emprender futuras aproximaciones terapéuticas que intenten, por ejemplo, utilizar biopolímeros para reconstruir estos nichos, algo en lo que nuestro grupo de investigación lleva años trabajando en el contexto del Centro de Investigación Biomédica en Red de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN).¹⁴

Tesis doctoral: "Estudio mediante microscopía confocal del nicho limbar en pacientes con síndrome de insuficiencia límbica sometidos a trasplante de células madre"

Hipótesis

2. Hipótesis

La hipótesis de trabajo de esta tesis doctoral establece que el trasplante de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (MSCT) alogénica es tan seguro y eficaz como el de células limbares epiteliales cultivadas (CLET), también alogénico para la reparación de la córnea fracasada por un síndrome de insuficiencia limbar (SIL). Pero, además, establece que dichos trasplantes celulares no logran mejorar la estructura del nicho celular limbar, de manera que el resultado final del trasplante en la reconstrucción del epitelio corneal central no sería debido a una recuperación de la arquitectura limbar normal.

Tesis doctoral: "Estudio mediante microscopía confocal del nicho limbar en pacientes con síndrome de insuficiencia límbica sometidos a trasplante de células madre"

Objetivos

3. Objetivos

Para demostrar la hipótesis de trabajo, se planteó el análisis detallado del nicho limbar de células madre epiteliales de la córnea en aquellos pacientes que participarían en un ensayo clínico en el que se probarían dos tipos celulares distintos. Esto permitiría relacionar los posibles hallazgos en el nicho limbar a lo largo del tiempo con el éxito o fracaso de estos trasplantes, así como con el tipo celular empleado.

Objetivo 1

Descripción de las variables clínicas y del fenotipo del epitelio existente en el centro de la córnea, mediante microscopía confocal in vivo (MCIV), en pacientes con SIL que van a ser sometidos a un trasplante de células madre y aleatorizados para recibir un trasplante de células limbares epiteliales cultivadas (CLET) o de células madre mesenquimales (MSCT), ambas de origen alogénico.

Objetivo 2

Descripción del nicho limbar, en esos mismos pacientes, utilizando la misma técnica de imagen, MCIV, y analizando la posible relación con el fenotipo epitelial descrito en la córnea.

Objetivo 3

Evaluación del posible cambio clínico y en el fenotipo del epitelio del centro corneal a los 6 y 12 meses tras la realización de un trasplante de células madre, tanto CLET como MSCT, discerniendo éxitos de fracasos.

Objetivo 4

Análisis de la posible modificación microscópica en el nicho limbar a los 6 y 12 meses tras la realización de un trasplante de células madre tanto de origen epitelial (CLET) como de estirpe mesenquimal (MSCT).

Objetivo 5

Evaluación de la existencia de una posible relación entre un resultado final de éxito o fracaso en la reconstrucción del epitelio corneal central y un posible cambio en el aspecto microscópico del nicho limbar.

Tesis doctoral: "Estudio mediante microscopía confocal del nicho limbar en pacientes con síndrome de insuficiencia límbica sometidos a trasplante de células madre"

Introducción

4. Introducción

4.1. Superficie ocular

La superficie ocular se define como aquellos tejidos del ojo que están en contacto con el medio ambiente. Comprende, por lo tanto, los epitelios conjuntival, limbar y corneal, así como la película lagrimal suprayacente y el tejido conectivo inmediatamente subyacente. Su principal misión es el mantenimiento de la integridad estructural y funcional de la córnea, manteniéndola compacta y transparente.^{15,16}

(Figura 1)

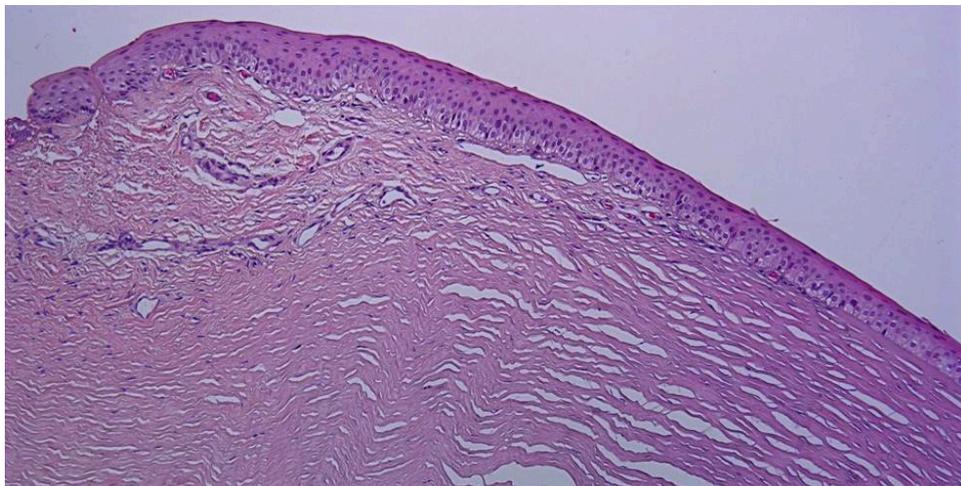


Figura 1. Tejidos epiteliales que forman parte de la superficie ocular; de derecha a izquierda: córnea, limbo y conjuntiva. Tinción hematoxilina-eosina. Aumentos 10 X. Imagen cedida por el laboratorio de patología ocular (LPO). IOBA.

A continuación se exponen sus principales componentes a excepción de la película lagrimal.

4.1.1. Córnea

La córnea es una estructura avascular, transparente y ricamente innervada que se encuentra en contacto con la película lagrimal en la cara anterior y con el humor acuoso en la parte posterior.¹⁷ (Figura 2)

Presenta una forma convexa y esférica, cuyas medidas aproximadas son entre 11 - 12 mm de diámetro horizontal y 10,6 mm de diámetro vertical. (Figura 2a y 2b)

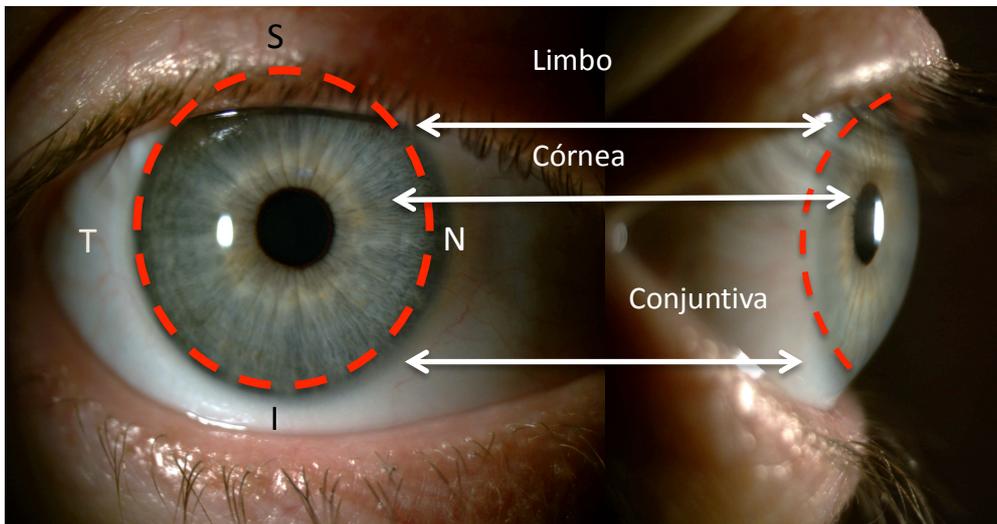


Figura 2a. Fotografía de la córnea realizada mediante lámpara de hendidura. Vista frontal. Imagen cedida por el área clínica. IOBA.

Figura 2b. Fotografía de la córnea realizada mediante lámpara de hendidura. Vista lateral. Imagen cedida por el área clínica. IOBA.

El espesor corneal es mayor en la periferia, en torno a 600 μm , con un radio de curvatura alrededor de 6,2-6,7 mm y es menor en la zona central, en torno a 500-550 μm , con un radio de curvatura en torno a 7,5-8,0 mm. Sus funciones principales son mantener su transparencia, imprescindible para la transmisión de la luz, permitir focalizar la imagen en la retina, gracias a las +42 DP de poder refractivo, junto con la potencia dióptrica del cristalino, y actuar como barrera frente a las diferentes agresiones (físicas y químicas) que pueden amenazar al globo ocular.

La córnea tiene 5 capas histológicas (sin considerar la conflictiva capa de Dua publicada recientemente) que, desde la cara más externa hacia la cámara anterior son: (Figura 3)

- Epitelio corneal
- Capa de Bowman
- Estroma
- Membrana de Descemet
- Endotelio

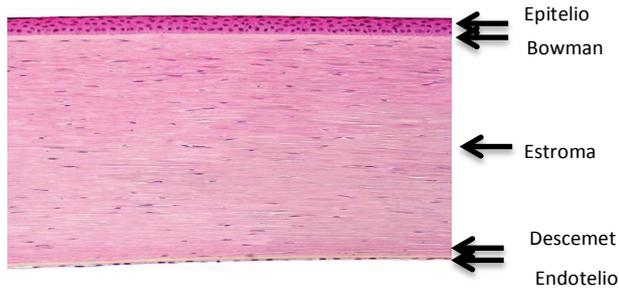


Figura 3a. Corte histológico de la córnea. Tinción con hematoxilina-eosina. Aumentos 10 X. Imagen cedida por el Laboratorio de Patología Ocular. IOBA.

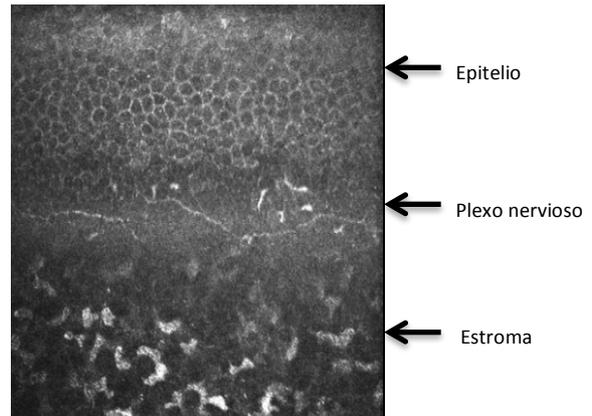


Figura 3b. Corte oblicuo de la córnea realizado con microscopía confocal in vivo. Imagen cedida por el área clínica. IOBA.

El **epitelio corneal** es de tipo escamoso estratificado no queratinizado. Su grosor es de aproximadamente 50 μm , lo que corresponde al 10% del total de la córnea. Está compuesto por 5 ó 6 capas, con 3 tipos celulares diferentes.^{1,15,16,18} (Figura 4)

Células superficiales. Es la parte más externa del epitelio. Está compuesta por 2 ó 3 capas de células poligonales cuyas membranas forman microvellosidades, que aumentan la superficie de contacto con el fin de optimizar el intercambio de solutos con la lágrima.^{15,16} (Figura 4)

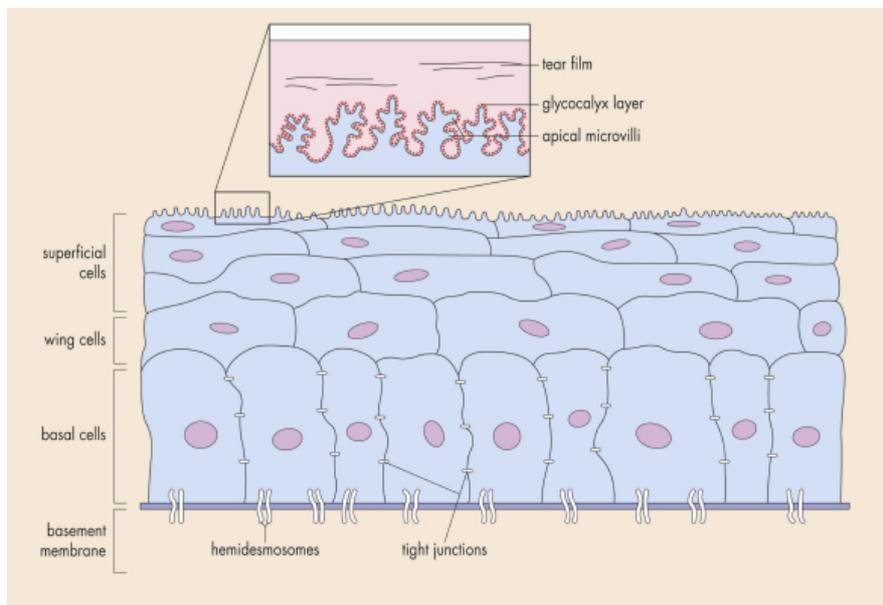


Figura 4. Microvellosidades del epitelio corneal. Imagen tomada del artículo Anatomy and physiology of the cornea. 2011.¹⁹

Además, en su membrana celular se encuentran múltiples glicoproteínas, conocidas como glicocálix, formadas por las mucinas transmembrana, cuya función principal es la de aportar propiedades hidrofílicas a la cara anterior de la córnea, y con objetivo de lograr una gran interacción con la capa acuosa de la película lagrimal. Las uniones intercelulares de esta capa son de tipo desmosomas, uniones estrechas y complejos de unión, lo que crea una barrera histológica, provocando que el transporte de sustancias se realice por vía transcelular.

Células aladas o suprabasales. Están ubicadas entre las células superficiales y las basales. Conforman 2 ó 3 capas celulares, y se denominan así por el aspecto que presentan a través del microscopio electrónico. Se caracterizan por presentar un estadio de maduración intermedio, con abundantes tonofilamentos intracelulares ricos en queratina. Están unidas entre sí por desmosomas y uniones tipo “*gap junctions*”.^{15,16}

Células basales. Forman una monocapa en contacto con la membrana basal epitelial. Son las únicas que presentan actividad mitótica aunque de forma muy limitada, originándose de ellas las células aladas y las superficiales. Se unen entre sí por desmosomas y uniones tipo “*gap junctions*”, y a la membrana basal por hemidesmosomas. Estos, a su vez, están unidos a fibras de anclaje emparejadas por colágeno tipo VII, que perforan la membrana basal y la capa de Bowman y se unen a placas de anclaje en el estroma superficial, formados por colágeno tipo I. Este sistema, en condiciones normales, mantiene el epitelio fuertemente adherido al estroma.^{15,16} (Figura 5)

Células superficiales

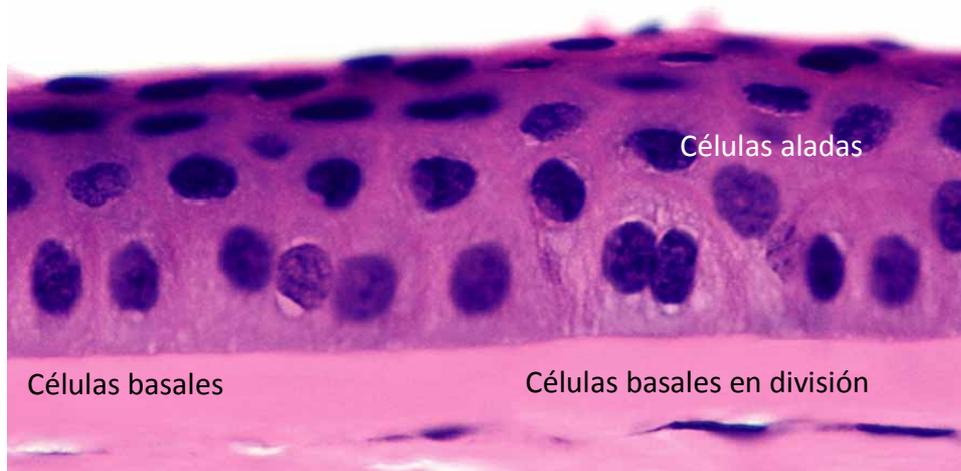


Figura 5. Epitelio corneal con sus diferentes capas celulares a microscopía óptica. Tinción hematoxilina-eosina. Aumentos 40X. Imagen cedida por el Laboratorio de Patología Ocular. IOBA.

En el epitelio de la córnea pueden encontrarse también linfocitos y células dendríticas.²⁰

La membrana basal del epitelio corneal, secretada por las células basales; tiene un grosor aproximado de 40-60 nm y está formada por una lámina lúcida más externa y una lámina densa en contacto con la capa de Bowman. El principal componente de la membrana basal es el colágeno de tipo IV.^{16,21,22}

La capa de Bowman es una zona acelular, entre el epitelio corneal y el estroma, formada por proteoglicanos y colágeno (principalmente colágeno de tipo I y II). Las fibras de colágeno de esta capa son sintetizadas por el estroma anterior y su función principal es la de ofrecer mayor resistencia mecánica; además, es una barrera frente a microorganismos y células tumorales.^{16,21,22}

El estroma supone la porción mayor del espesor corneal, midiendo unos 400-500 μm , lo que supone el 90% del espesor total. Está compuesto principalmente por fibras de colágeno de tipo I de espesor muy pequeño y separadas entre si por un espacio constante, lo que sumando a la ausencia de vasos sanguíneos y linfáticos, aseguran su transparencia. Representa una estructura fuerte y estable frente a las deformaciones.^{16,22}

La capa de Dua, descrita recientemente por este autor como una fina capa acelular fuerte e impermeable al aire, se localizaría entre el estroma y la membrana de

Descemet. Como se ha comentado anteriormente, existe controversia respecto a su verdadera entidad.²³

La membrana de Descemet se considera la membrana basal del endotelio corneal y es secretada por él; está compuesta de fibras de colágeno, principalmente de tipo IV y VIII. Se encuentra adherida firmemente a la porción posterior del estroma, presentando resistencia a traumatismos y reacciones inflamatorias.^{16,21,22}

El endotelio corneal está constituido por una capa unicelular, formando un patrón en panal de abeja, con células hexagonales. Esta capa tiene alrededor de 5 µm de espesor. Su función es primordial para la transparencia corneal, manteniendo la deturgescencia tisular (estado de relativa deshidratación de la córnea). Esto implica que cualquier alteración del endotelio corneal supondrá la entrada descontrolada de humor acuoso y, por lo tanto, la aparición de edema corneal que, de cronificarse conllevaría la opacidad corneal. Para realizar esta función esencial, debe existir un recuento celular endotelial adecuado. Y así, se considera que el número mínimo para mantener la transparencia corneal es entre 700-1000 células de manera uniforme en toda la capa, conservando, además, la forma hexagonal de las mismas.

El endotelio sufre pérdida celular, a causa del envejecimiento, las agresiones como las cirugías intraoculares o algunas patologías endoteliales. Al no existir en el ser humano células madre endoteliales y no tener las adultas capacidad mitótica, este descenso en la población celular no se compensa con nuevas células, lo que obliga a las células endoteliales remanentes a cubrir los huecos que dejan las células que mueren a base de agrandar su tamaño, lo que conlleva que coexistan células de diferentes tamaños (polimegatismo) y de formas diversas, desviándose de la forma original hexagonal (pleoformismo).^{16,21,22}

4.1.2. Conjuntiva

Otro componente de la superficie ocular es el **epitelio conjuntival**. Este epitelio es de tipo escamoso, estratificado y no queratinizado: y se une al epitelio corneal en el limbo y a la epidermis en el borde palpebral, continuándose con el epitelio respiratorio a través del epitelio del sistema lagrimal excretor. La capa más profunda está formada por células cuboideas y la más superficial por células cilíndricas. En el borde superior

Tesis doctoral: "Estudio mediante microscopía confocal del nicho limbar en pacientes con síndrome de insuficiencia límbica sometidos a trasplante de células madre"

de estas células se encuentran las microvellosidades, que son proyecciones del citoplasma cuya función es aumentar la superficie de contacto. Estas microvellosidades, al igual que sucede en la córnea, están recubiertas por el glicocálix, también conocido como mucinas transmembrana.^{15,16}

El estudio de la conjuntiva bajo microscopía electrónica demuestra la presencia de hasta 5 tipos de células, con misiones como la producción de mucina, enzimas y de otras proteínas presentes en la secreción lagrimal, así como la absorción de sustancias desde ésta última.^{15,16}

El epitelio conjuntival tarsal tiene morfología cuboidea, siendo más columnar en los fondos de saco es columnar. En esta zona se ha encontrado una población que podrían ser células madre de epitelio conjuntival,^{15,16} aunque no está universalmente aceptado y, de hecho, otros autores describen células madre conjuntivales dispersas por toda la conjuntiva.^{15,16} En todo caso, la localización de las células madre conjuntivales está mucho menos estudiada que las corneales.

Las células del epitelio conjuntival, al igual que sucede en la córnea, están adheridas entre sí por uniones tipo desmosomas, siendo la fortaleza de la barrera conjuntival algo menor que la córnea.^{15,16}

En el epitelio conjuntival también se encuentran células no epiteliales. De hecho, nuestro grupo de trabajo²⁴ ha demostrado que aproximadamente el 4% de las células del epitelio conjuntival recogidas por citología mediante cepillado, son de estirpe leucocitaria. Estas células forman parte del llamado "*conjunctival-associated lymphoid tissue*" (conocido con las siglas CLAT), junto con los acúmulos linfocitarios que existen en el estroma conjuntival. Este estroma, a diferencia del corneal, tiene vasos sanguíneos y linfáticos.²⁴

4.1.3. Nicho limbar

Aunque esta estructura forma parte de la superficie ocular, se describe más ampliamente en otro apartado al ser la estructura fundamental sobre la que se basa este trabajo de investigación. El limbo esclero-corneal es una zona de transición entre el epitelio corneal y el conjuntival. Es una área semitransparente de color grisáceo, de unos 1,5 mm de anchura.¹⁵ (Figura 6)

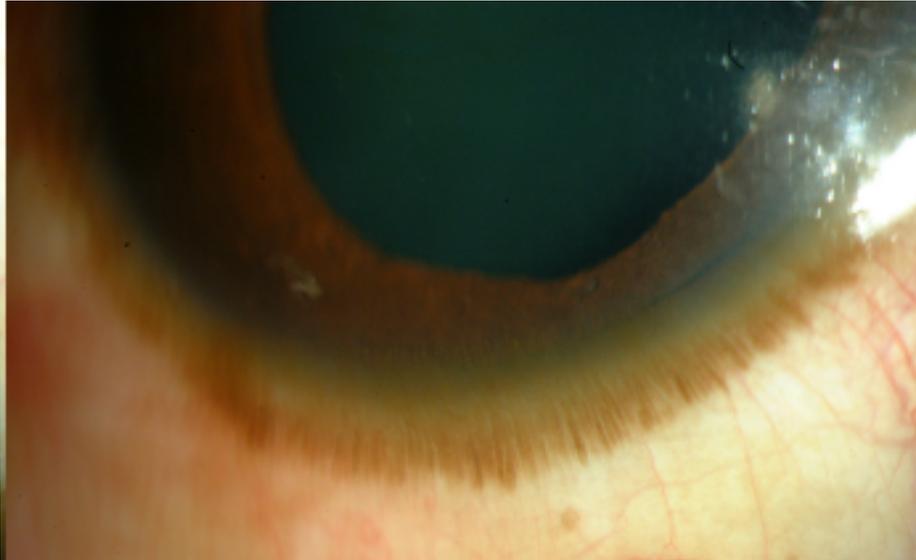


Figura 6. Imagen tomada mediante la lámpara de hendidura de un limbo esclero-corneal sano fuertemente pigmentado, perteneciente a un varón de raza negra. Las estructuras radiales corresponden a las empalizadas de Vogt, claramente visibles debido a la existencia de mayor pigmentación de la raza negra. Imagen cedida por el área clínica. IOBA.

El limbo está formado por 8-12 capas de células epiteliales escamosas no queratinizadas; las más superficiales son similares al epitelio corneal, acompañadas de células de Langerhans, presentadoras de antígeno, y células melanocíticas; las células basales son cuboidales. La matriz estromal está formada por fibras de colágeno, proteoglicanos, macrófagos, mastocitos, linfocitos y células plasmáticas. Contiene, además, vasos sanguíneos, linfáticos y fibras nerviosas amielínicas.²⁵ (Figura 7)

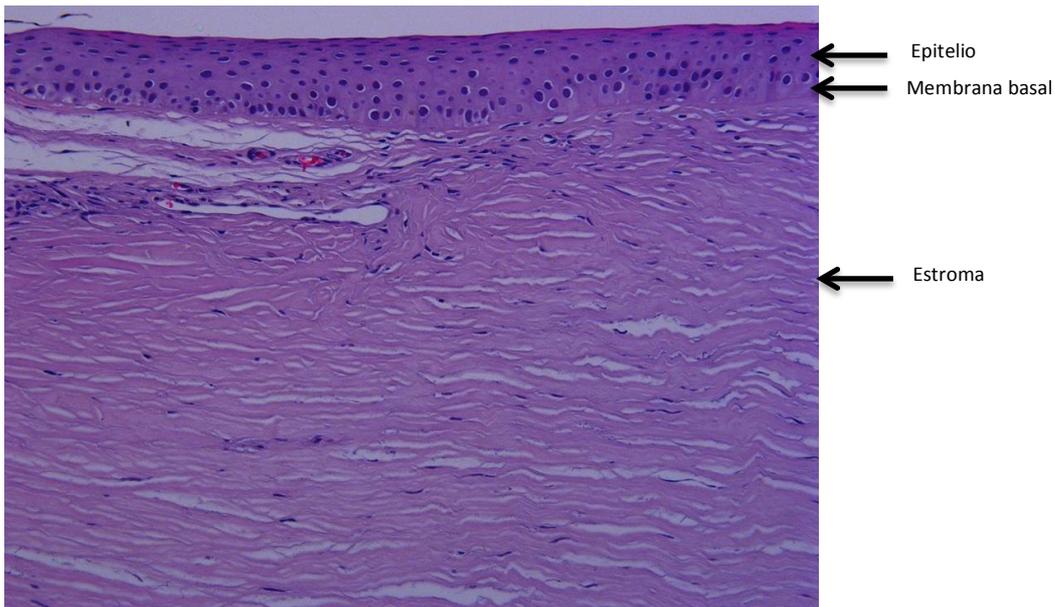


Figura 7. Imagen realizada con micrografía óptica donde se observan las capas del limbo corneal. Tinción realizada mediante hematoxilina-eosina 20X. Imagen cedida por el laboratorio de Anatomía patológica (LPO). IOBA.

Una de las partes fundamentales del limbo esclero corneal son las denominadas empalizadas de Vogt constituyendo la parte esencial del nicho de las células madre del epitelio corneal. Estas empalizadas son más numerosas en la zona superior e inferior del limbo.^{13,26-28} (Figura 8a y 8b)



Figura 8a. Fotografía realizada mediante lámpara de hendidura de las empalizadas de Vogt. Con flecha verde se señalan crestas de empalizada. La flecha roja indica los valles. Imagen cedida por el área clínica. IOBA.

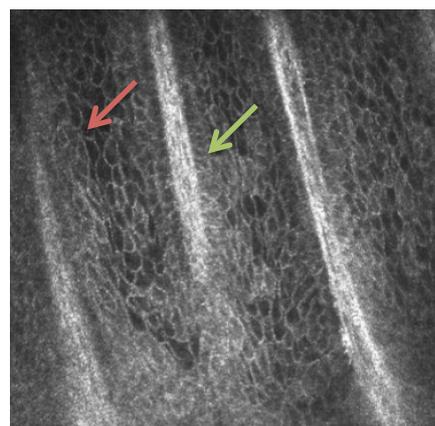


Figura 8b. Imagen de microscopía confocal de empalizadas de Vogt. Con flecha verde se señalan crestas de empalizada, hiperreflectantes. La flecha roja indica los valles. Imagen cedida por el área clínica. IOBA.

El limbo es una región especialmente vascularizada e inervada, con el fin de cumplir numerosas funciones, entre las que destacan:^{18,27,29}

- Permite la regeneración (renovación fisiológica) y reparación (renovación tras un daño) del epitelio corneal al contener sus células madre.
- Facilita la nutrición corneal periférica.
- Interviene en la cicatrización corneal.
- Participa activamente en la vigilancia inmunológica de la superficie ocular.
- Contiene melanocitos para evitar el daño potencial de la luz ultravioleta sobre las células madre.
- Mantiene una barrera física que evita la migración de las células conjuntivales sobre la córnea.

En la parte interna de esta zona se encuentra el ángulo camerular, donde está alojado el sistema de drenaje del humor acuoso, incluidos la malla trabecular y el canal de Schlem. Además, esta zona, tiene una rica distribución vascular, a expensas de vasos episclerales superficiales y profundas y vasos conjuntivales, que aportan el oxígeno y los nutrientes que requiere el área limbar.^{3,30}

Regeneración del epitelio corneal

El proceso de recambio completo del epitelio corneal dura aproximadamente 7 días, por lo que es necesario un sistema de producción celular extremadamente eficaz. La regeneración del epitelio corneal ocurre mediante un patrón que ya hace muchos años, fue definido por Thoft y colaboradores en 1983, como una hipótesis que se ha visto plenamente confirmada después y conocida como teoría XYZ.^{4,18,31,32} (Figura 9)

- Z es la descamación de la capa superficial, que ya era conocida desde hacía tiempo.
- X es el movimiento vertical de las células basales, que sufren 1 ó 2 mitosis y ascenderán para suplir a las que se pierden mediante la fuerza Z.
- Y sería la auténtica hipótesis, ya que en aquellos años no se sabía de la existencia de células madre en el limbo. Pero se sabía que las células basales del epitelio corneal tenían una capacidad de división limitada y que

cuando ésta se agotara, tendrían que venir más células de algún sitio. Había evidencias indirectas de que este sitio podría ser el limbo, lo que dio origen a que esta hipótesis Y fuera el movimiento centrípeto desde el limbo hacia el centro de la córnea.

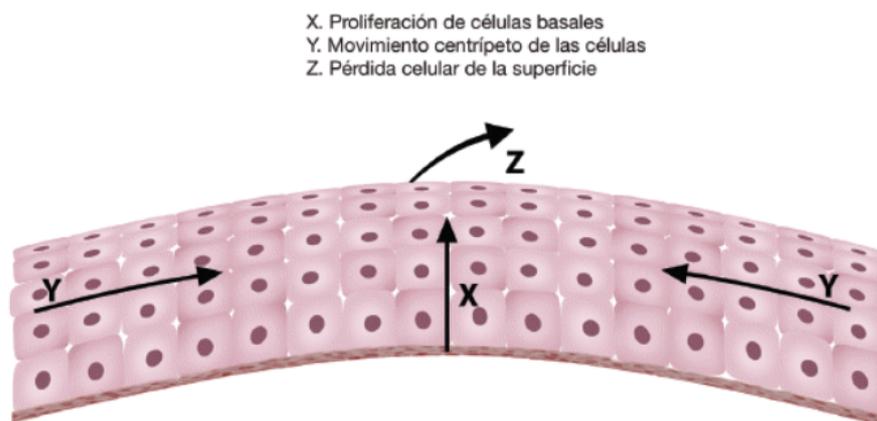


Figura 9. Representación gráfica de los tres ejes descritos en la hipótesis de Thoft en los años 80, en el que la Z representa la descamación de las células epiteliales superficiales, X su reemplazo por mitosis de las células del epitelio basal y, finalmente, Y representa el movimiento de células epiteliales limbares hacia la zona basal del epitelio corneal. Imagen tomada del artículo *The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance*. 1983.³¹

Posteriormente, a la vez que van perdiendo su capacidad de proliferación y tras el descubrimiento de que las células madre del epitelio corneal se encontraban en el limbo, como ya se había sospechado, esta hipótesis quedó plenamente confirmada, siendo ese movimiento Y el desplazamiento e inicio de diferenciación de las células madre limbares hacia el epitelio basal corneal.^{4,27,31,32}

4.2. Células madre

Las células madre (también llamadas progenitoras o troncales) fueron descritas por primera vez por Becquer y colaboradores en el año 1963.³³

Estas células presentan varias atribuciones, siendo la más característica la de poder dividirse indefinidamente. Este aspecto define varios tipos de células madre:

células *totipotenciales*, capaces de producir tejido embrionario y no embrionario, *pluripotenciales*, capaces de diferenciarse en cualquier tejido, *multipotenciales*, capaces de generar células diferenciadas y con capacidad de autorrenovación y *unipotenciales*, que son capaces de originar un solo tipo celular.³⁴

Analizando la progresión de la diferenciación de las células, según este criterio, cada nivel celular permite originar células del mismo nivel y del siguiente al que pertenecen.

En cuanto al origen, estas células se clasifican en células *madre embrionarias* y *células madre adultas*. *Las embrionarias*, derivadas del embrión, blastocitos o cresta gonadal, son totipotentes ya que son capaces de originar todos los tejidos. Estas células son capaces de dividirse, indefinidamente, *in vitro* continuando con sus características de indiferenciación.³⁵

Las células madre adultas son células indiferenciadas, capaces de autorrenovación y diferenciación, cuya labor es mantener la estructura de los tejidos. Se encuentran en todos los tejidos del organismo como reservorio para el mantenimiento, independientemente del origen embrionario.

Las células madre adultas presentan las siguientes características:^{4,16,18,26,36}

- Están diferenciadas pobremente, con un citoplasma primitivo.
- Proliferan sin errores genéticos, por lo que mantienen el reemplazo y la regeneración de los tejidos, sin maduración.
- Su vida media es larga y el tiempo de ciclo celular es mayor que en las células normales, manteniendo así la posibilidad de regeneración.
- Estas células madre, independientemente de su linaje inicial, pueden convertirse en una célula de un linaje diferente. (Figura 10)

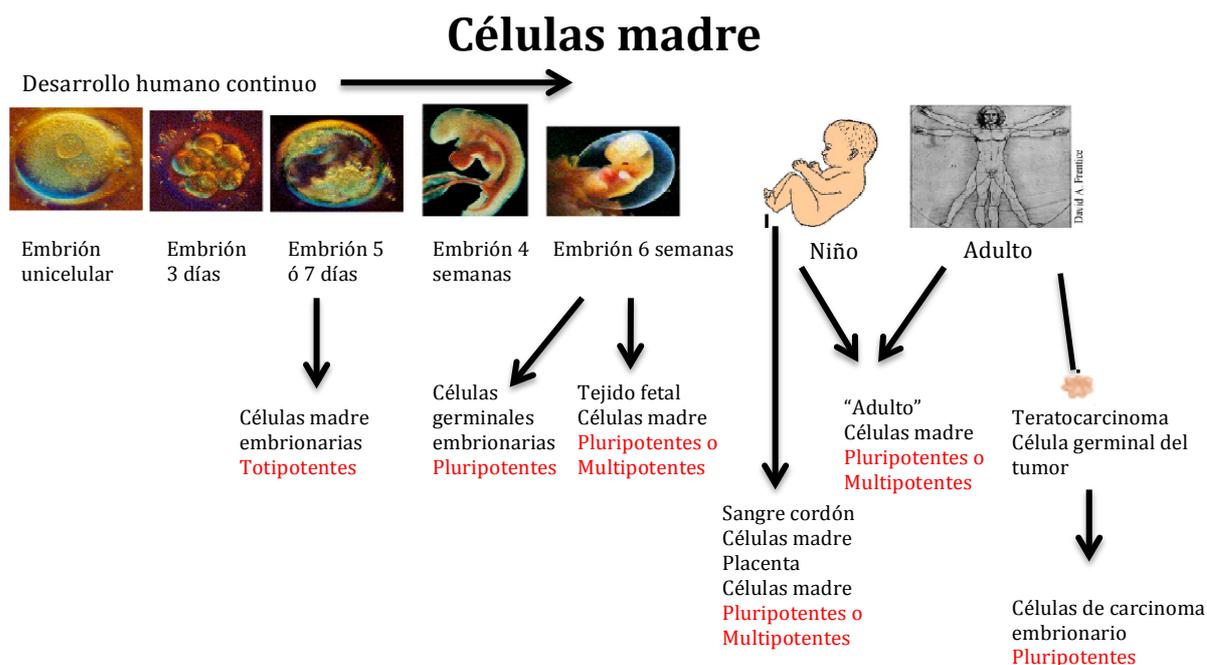


Figura 10. Desarrollo humano a partir de células madre. Imagen tomada de <https://es.pinterest.com/myqute/biomedical-research-stem-cells/2006>.

Las células madre pueden presentar dos tipos de división, simétrica y asimétrica.³⁷

La división asimétrica se produce de manera habitual en la regeneración de la población celular. Una vez una célula madre se divide, una de las células hija se destina a mantener el número de células madre, es decir, permanece con todas las características de célula madre en su nicho, y la otra célula hija, sin embargo, empieza el camino de la diferenciación, pasado en algunos sitios como en la córnea, por células madre amplificadora transitoria, para terminar de diferenciarse en la célula propia del tejido a donde está destinada, llamándose entonces célula terminalmente diferenciada.

En **la división simétrica**, tras la diferenciación, las dos células hijas se mantienen indiferenciadas, de tal manera que su finalidad es mantener la reserva. Esta división obedece a estímulos como la apoptosis; las células que se originan pueden tener diferentes destinos, en función de los estímulos a los que se expongan, y cuentan con gran capacidad proliferativa y de migración. (Figura 11)

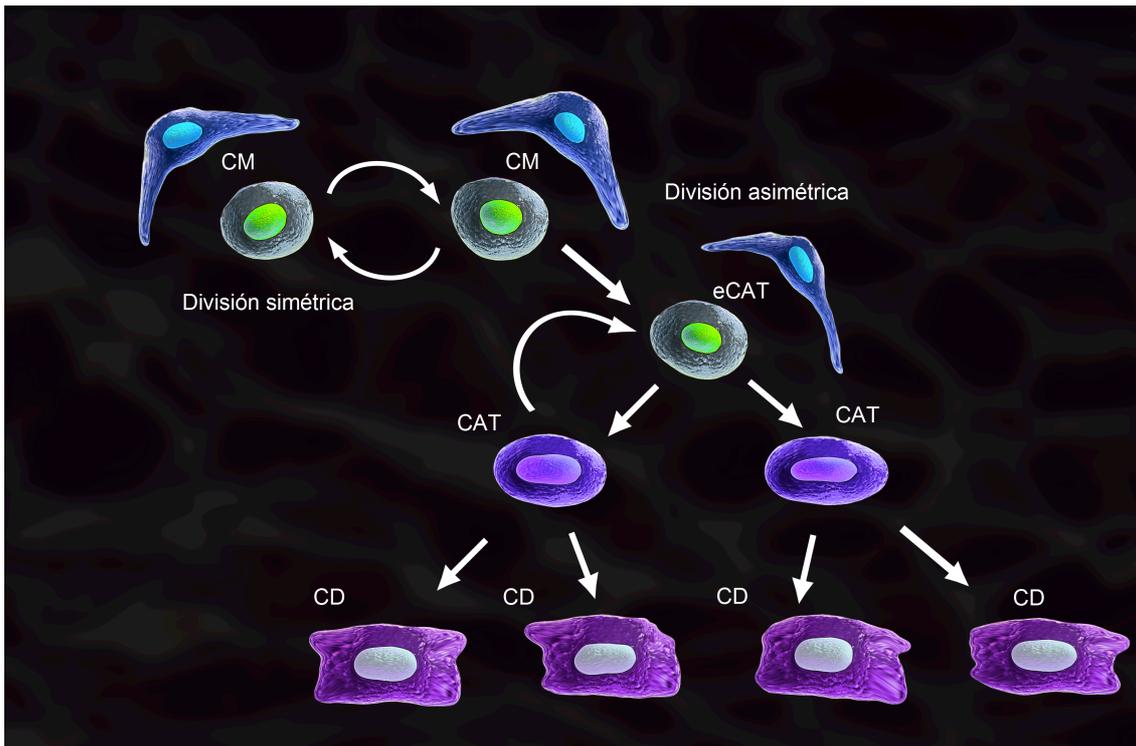


Figura 11. Imagen de la división simétrica y asimétrica de las células madre. En la división asimétrica se producen una célula madre (CM) que permanece en el nicho y una célula madre amplificadora transitoria (CAT). Esta es capaz de producir más células madre amplificadora transitoria y células diferenciadas terminalmente (CD). Imagen tomada de StemBook. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute 2008.³⁸

Las células madre adultas, debido a su rápida división, crean células que son capaces de regenerar así tejidos dañados; por ello presentan un gran potencial en aplicación clínica para medicina regenerativa.¹⁸

Este tipo de células madre, han sido identificadas en tejidos como el músculo esquelético, la médula ósea, la epidermis, el intestino, los testículos y los ovarios, el hígado, el sistema nervioso central, el corazón y por supuesto el ojo.³⁹

Además de las características inherentes a la diferenciación, están también las influencias extrínsecas del microambiente donde residen.¹⁸ Una de las diferencias fundamentales de este microambiente es el mayor aporte sanguíneo. Y así, en el caso del nicho limbar, los vasos sanguíneos forman una red ondulada en las empalizadas de Vogt, distribución que asegura un nivel de nutrientes constante.^{40,41}

4.2.1. Células madre mesenquimales

Las células mesenquimales son células madre estromales no hematopoyéticas multipotentes, capaces de diferenciarse en múltiples linajes y contribuir a la regeneración de los tejidos. Se pueden aislar en diferentes lugares, como la médula ósea, el tejido adiposo, el hígado, el bazo, los testículos, el fluido amniótico, el páncreas, el periostio, el pulmón o la sangre.⁴²

Su existencia fue sugerida inicialmente por Cohnheim hace 130 años.⁴² pero fue Friedenstein quien plantea, por primera vez, la posibilidad de que la médula ósea contenga células que pueden diferenciarse en otras células mesenquimales, llevando a cabo estudios para analizar el grado potencial de clonación de las células de la médula ósea.^{43,44} Las observaciones de estas células en la década de los 80 permitieron establecer que las células mesenquimales podían diferenciarse en osteoblastos, condrocitos, adipocitos y mioblastos. Por estas razones, se han utilizado para reparar miocardios infartados, en deformidades óseas y en fracturas. Posteriormente, se demostró que las células mesenquimales podían contribuir a la regeneración de tejidos de estirpe no mesodérmica, como los derivados del ectodermo: los epitelios bronquial y alveolar, glomerular y tubular, gastrointestinal y el epitelio pigmentario de la retina.⁴⁵⁻⁵¹ Este proceso de diferenciación dependerá de factores externos que cohabitan en el medio ambiente donde se encuentran y puede ser inducido y controlado.^{52,53}

Nuestro grupo de investigación, de hecho, ha probado que las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano pueden diferenciarse adquiriendo características de células epiteliales corneales *in vitro*.¹¹ Y, posteriormente, nuestro grupo ha demostrado también que puede contribuir a reconstruir el epitelio dañado por SIL en un modelo animal.¹²

Además, estas células poseen propiedades inmunosupresoras, ya que inhiben la proliferación, diferenciación y quimiotaxis de los linfocitos B, por lo que en tejidos inflamados tendrían efectos beneficiosos.^{42,54} Este tipo de células presentan la propiedad de migrar hacia los tejidos dañados e inducir propiedades terapéuticas.

Además, dado su carácter no inmunogénico permiten realizar trasplantes alogénicos sin necesidad de realizar inmunosupresión, no originando rechazos inmunológicos.⁵⁵

4.3. Nicho limbar

El limbo esclero-corneal, como ya se ha descrito anteriormente, es una estructura situada entre la córnea y la esclero-conjuntiva y que contiene el nicho de las células madre epiteliales de la córnea. Es una zona de transición que se identifica como una banda circular de color oscuro de 1-2mm de grosor.¹⁷ El nicho de las células madre es un microambiente que asegura su supervivencia, su proliferación y su diferenciación adecuadas. La figura 12 muestra el nicho limbar humano.

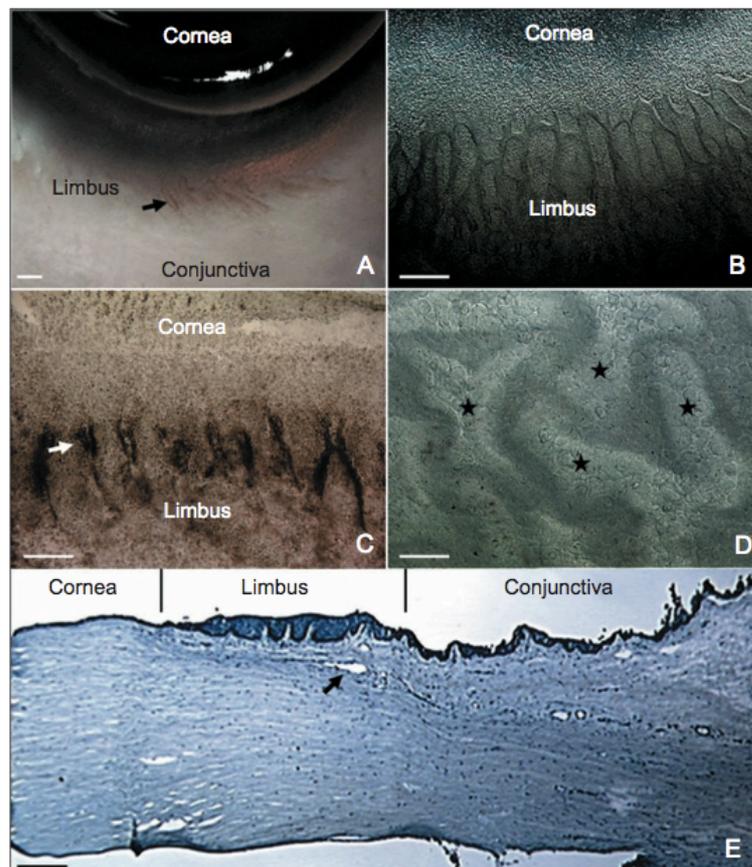


Figura 12. A: Imagen de empalizadas de Vogt de limbo humano (flecha negra). B: Imagen de estructura pigmentada perfectamente reconocible. C: Imagen de las empalizadas en pacientes de raza negra (flecha blanca). D: Imagen de mayor aumento que permite ver áreas límbicas con papilas epiteliales onduladas (marcado con estrellas negras). E: Imagen de tinción con hematoxilina que permite apreciar mayor estratificación y más ondulación del epitelio limbar con alta celularidad y vascularización, la flecha negra corresponde a vasos sanguíneos. Imagen tomada del artículo Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. 2007.²

Para el mantenimiento de este proceso celular, en el entorno de estos nichos deben estar presentes las siguientes estructuras: las células madre, la matriz extracelular y factores secretados por otras células presentes en estos nichos, además de un adecuado aporte nutricional y nervioso.⁵⁶ En el caso del epitelio corneal, el primer indicio de su existencia en el limbo corneal se basó en los estudios de Mann, que describió movimientos de pigmento desde células limbares hacia el centro corneal en conejos.²⁹ Otros autores como Davanger y Evenson observaron migraciones centrípetas celulares a nivel corneal,⁵⁷ lo que propuso que la fuente de células madre se situara en el limbo. Y Tseng también observaron que el deterioro del limbo corneal provocaba alteraciones como neovascularización y crecimiento conjuntival.¹⁸

Existen varios hechos anatómicos que sugirieron que el nicho de las células madre se encuentra en el limbo:^{4,29,58}

- Las diferencias anatómicas y funcionales del limbo con respecto a la córnea incluyendo la existencia de una vascularización e inervación muy importante, lo que permite la llegada de oxígeno y nutrientes.⁵⁹
- La orografía de las empalizadas, que funcionan como una barrera impidiendo el roce continuo del parpadeo con las células alojadas en su profundidad y mejorando la interacción epitelio-estroma.⁶⁰
- La presencia de pigmentación melánica para proteger de los daños de la luz ultravioleta. Las células encargadas de ello son los melanocitos con pigmento melanina.⁵⁷
- El hallazgo de estas criptas preferentemente en zona superior e inferior, más protegidas por los párpados.⁶¹

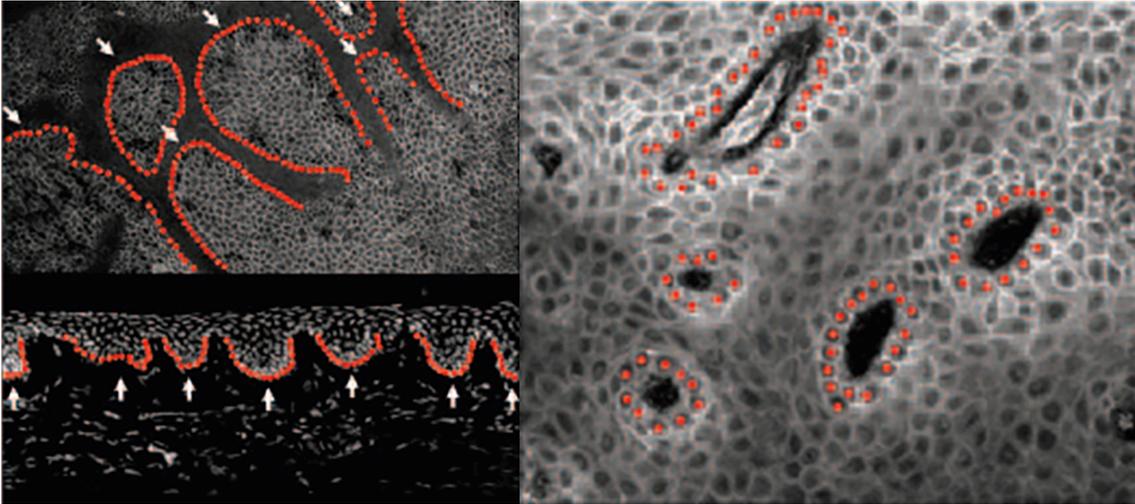


Figura 13. En estas tres imágenes se muestran las criptas limbares y las proyecciones estromales focales. Los puntos rojos determinan la presunta localización de las células madre del epitelio corneal. Realizadas con microscopía confocal. Escala 50 μm . Imagen tomada del artículo *Characterization of the Limbal Epithelial Stem Cell Niche: Novel Imaging Techniques Permit In Vivo Observation and Targeted Biopsy of Limbal Epithelial Stem Cells*. 2007.⁶¹

Los nichos están formados por invaginaciones de epitelio limbar periférico sobre el estroma limbar, constituyendo las criptas limbares, situadas en los valles de las empalizadas de Vogt; se encuentran con más frecuencia en las zonas superior e inferior y se las suponen como nichos de células más indiferenciadas, limitadas por proyecciones de estroma fibrovascular denominadas crestas de empalizadas.

En el análisis *in vitro* mediante microscopio confocal en córneas de cadáver, Shortt y colaboradores, determinaron la distancia entre las crestas como 40 μm , al igual que la profundidad de los valles. Las empalizadas presentan una longitud diversa, desde 350 a 900 μm .⁶² (Figura 13)

Se han documentado proyecciones del estroma limbar orientadas en sentido vertical llamadas proyecciones estromales focales. Las células madre parecen estar ubicadas en los niveles más basales de las criptas limbares, y rodeando las paredes de las crestas de empalizadas y de las proyecciones estromales focales.⁶¹ (Figura 14 y 15)

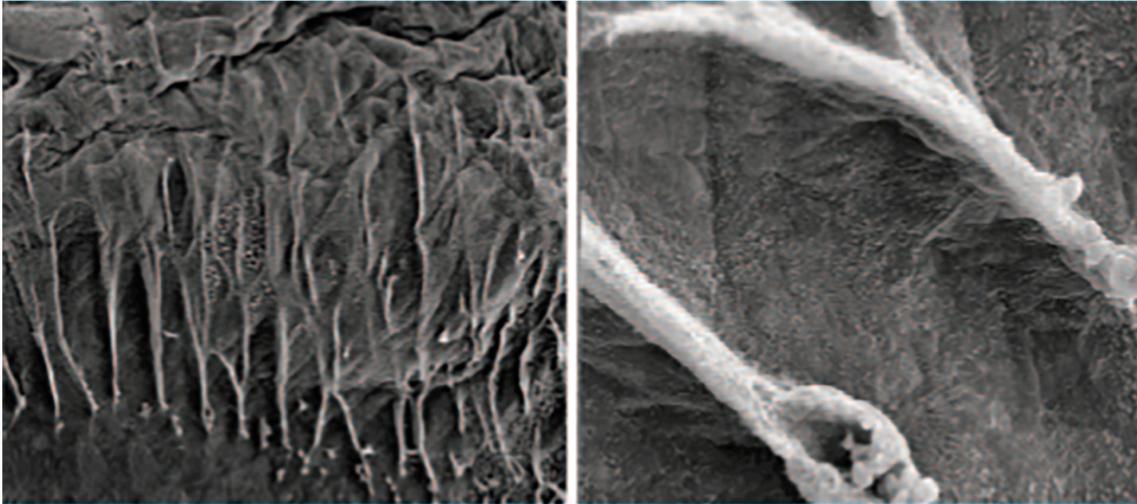


Figura 14. Microscopía electrónica de barrido en la que se aprecia la anatomía del estroma limbar, que forma las crestas limbares. Escala 50 μm . Imagen tomada del artículo *Characterization of the Limbal Epithelial Stem Cell Niche: Novel Imaging Techniques Permit In Vivo Observation and Targeted Biopsy of Limbal Epithelial Stem Cells*. 2007.⁶¹

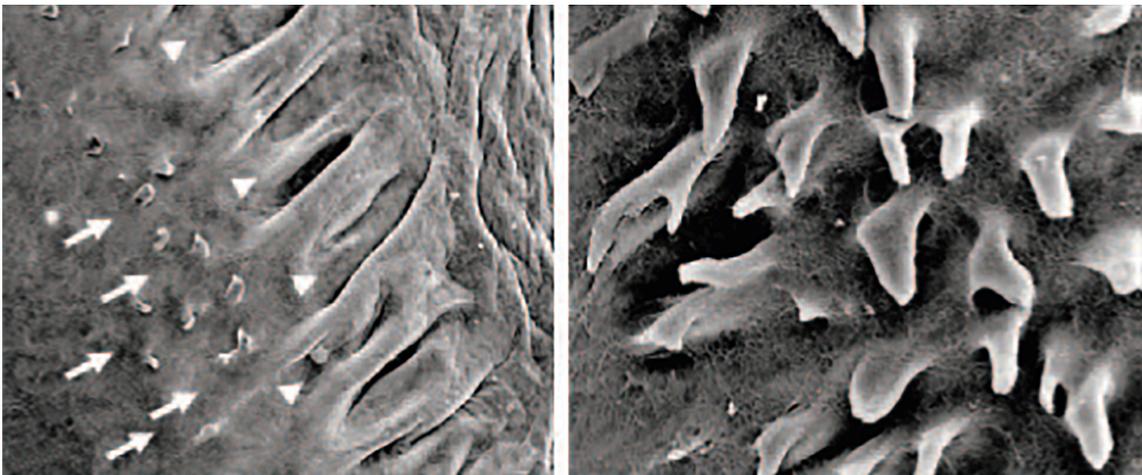


Figura 15. Microscopía electrónica de barrido en la que se aprecia la morfología de las proyecciones focales estromales en el limbo corneal. Escala 50 μm . Imagen tomada del artículo *Characterization of the Limbal Epithelial Stem Cell Niche: Novel Imaging Techniques Permit In Vivo Observation and Targeted Biopsy of Limbal Epithelial Stem Cells*. 2007.⁶¹

Este nicho proporciona un ambiente controlado en el que las células madre son estimuladas para su diferenciación y apoptosis.^{1,2,63}

Respecto a la estructura histológica, el limbo está compuesto por el epitelio limbar, la membrana basal y el estroma limbar.

El epitelio limbar se encuentra entre los epitelios corneal y conjuntival, con algunas características similares. Presenta un grosor aproximado de 85 μm y está compuesto por unas 10 capas de células.¹⁷

En la capa más interna de este epitelio se encuentra una monocapa de células donde se hallan las células amplificadas transitorias y células madre, acompañadas de

células de Langerhans, linfocitos T y melanocitos. En las capas más superficiales se encuentran células epiteliales diferenciadas y en las capas intermedias estas células epiteliales presentan un estado de diferenciación transitoria y están acompañadas de linfocitos T y células presentadoras de antígeno.⁶⁴

La membrana basal del limbo corneal mide aproximadamente 65 nm de grosor y está formada por proteoglicanos, colágeno y glicoproteínas. Permite el soporte del epitelio y proporciona la regulación de actividades metabólicas de las células. Esta membrana aporta el soporte al epitelio, porque le suministran el anclaje físico, además de ayudarle en el metabolismo de las células, proliferación, diferenciación y migración celular.⁶⁵

El estroma limbar está constituido por un componente celular formado principalmente por fibroblastos y la matriz extracelular. También se pueden encontrar melanocitos y células mesenquimales. También se han hallado células mesenquimales cercanas a la membrana basal. Favorece la modulación, la diferenciación, la proliferación y la apoptosis de las células epiteliales, convirtiéndose así en células indiferenciadas, por lo tanto el estroma tendría una posición fundamental en las actividades del nicho.⁶⁶

4.4. Síndrome de insuficiencia límbica o limbar (SIL)

4.4.1. Concepto y epidemiología

El SIL es una alteración de la regeneración del epitelio corneal por disfunción de células madre epiteliales en el limbo. Es una manifestación común a algunas enfermedades de la superficie ocular y se caracteriza por la conjuntivalización corneal.
27,28,38,67,68

Las causas del SIL pueden dividirse en dos grupos:^{27,28}

- Causas primarias. Se trata de alteración limbar primaria del nicho, como por ejemplo, en el contexto de la aniridia congénita, ciertas displasias ectodérmicas o las deficiencias endocrinas múltiples. (Figura 16)

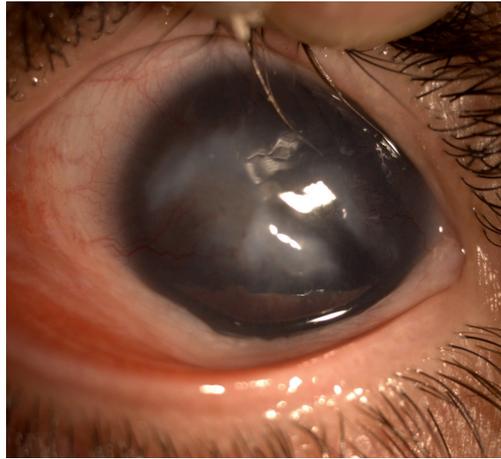


Figura 16. Fotografía de aniridia congénita realizada mediante lámpara de hendidura. Imagen cedida por el área clínica. IOBA.

- Causas secundarias o adquiridas:
 - Primariamente inflamatorias, como por ejemplo, las queratoconjuntivitis cicatrizantes de base inmunológica: penfigoide de las membranas mucosas, el síndrome de Stevens-Johnson, la rosácea, la queratoconjuntivitis atópica, etc. (Figura 17)

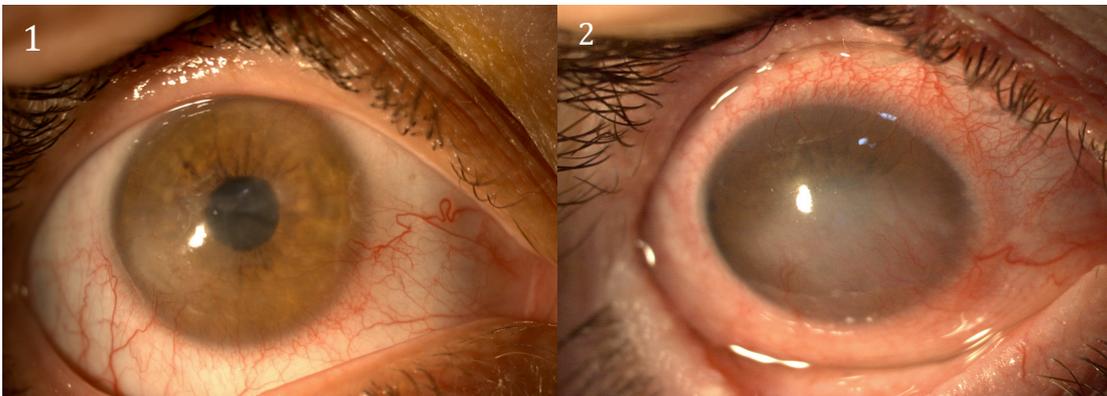


Figura 17. Fotografías de causas del síndrome de insuficiencia limbar, primariamente inflamatorias. Imagen 1 Queratoconjuntivitis atópica. Imagen 2 Síndrome de Stevens-Johnson. Imágenes tomadas mediante lámpara de hendidura. Imágenes cedida por el área clínica. IOBA.

- Primariamente no inflamatorias, como, las quemaduras químicas (causticaciones) o térmicas, las secuelas de procesos infecciosos graves, las causas traumáticas por múltiples cirugías, el uso abusivo de lentes de contacto, toxicidad medicamentosa, etc. (Figura 18)

Es necesario aclarar que esta clasificación no está exenta de controversia, ya que, por ejemplo, las causticaciones pueden tener un gran componente inflamatorio a pesar de que ya se haya hecho todo lo posible con medicamentos, como puede observarse en la Figura 18.



Figura 18. Mosaico de fotografías de causas de síndrome de insuficiencia límbica primariamente no inflamatorias. Imagen 1 Quemadura química. Imagen 2 Secuelas de queratitis por acantamoeba. Imagen 3 Síndrome de insuficiencia límbica por múltiples cirugías. 4 Causticación. Imágenes realizadas mediante lámpara de hendidura y cedidas por el área clínica. IOBA.

La incidencia del SIL es difícil de valorar de manera directa ya que, como se ha comentado, es un posible punto final de multitud de patologías. Por ello se manejan estudios de otras patologías que se relacionan con esta enfermedad.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece que existen 45 millones de personas que sufren ceguera bilateral en el mundo y de ellos, 10 millones, lo estarían por una enfermedad corneal.⁵³ Se estima que 8 millones de personas presentan ceguera por vascularización corneal y opacificación, a lo que contribuye el SIL.^{38,68}

- La aniridia congénita se encuentra en un caso de cada 100.000 personas, pero se desconoce la proporción que puede alcanzar el SIL dentro de esta rara enfermedad.
- En el caso del pterigium, debe tenerse en cuenta que afecta con diferente prevalencia según la zona geográfica que se estudie; en principio, en la raza caucásica se estima en un 1,2 % de la población.⁶⁹ Y por supuesto, sólo en pocos casos origina un síndrome de insuficiencia límbica total o completo que requiera trasplante de células madre.
- La incidencia de quemaduras oculares está entre el 7,7-18% de los traumas oculares, pero se desconoce cuántas de estas agresiones se traducen en una destrucción total o parcial del limbo, aunque se sabe que es una de las causas más frecuentes del SIL.
- La incidencia del síndrome de Stevens-Johnson es de 2,6 -7,1 casos por millón de personas en Estados Unidos y 1,1 casos por millón de personas en Alemania.⁷⁰
- La incidencia del penfigoide de membranas mucosas se estima en 1,16 casos por cada millón de habitantes en Francia y 0,87 casos por cada millón de habitantes en Alemania.⁷⁰ Pero, de nuevo, se desconoce la proporción de pacientes que, en estas dos últimas conjuntivitis cicatrizantes de base inmunológica, desembocan en SIL, aunque se presume alta.

4.4.2. Fisiopatología y clínica

El grado de afectación corneal dependerá, principalmente, de la extensión del limbo afectado, de la intensidad de su destrucción y de la causa que lo haya producido.

La fisiopatología del SIL se caracteriza por dos situaciones, producidas por la disfunción del nicho limbar y la subsecuente falta de regeneración del epitelio corneal y fracaso en su función de barrera:^{1,71}

1. Se provocan defectos epiteliales persistentes y recurrentes que pueden acabar por afectar al estroma y producir ulceraciones corneales, que se podrán infectar secundariamente. (Figura 19)

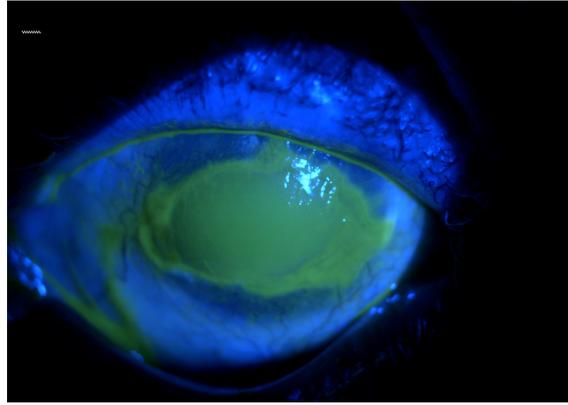


Figura 19. Defecto epitelial extenso y persistente del epitelio corneal en un paciente diagnosticado de causticación. Fotografía realizada mediante lámpara de hendidura. Imagen cedida por área clínica.IOBA.

2. Se desarrolla el avance de la conjuntiva sobre la córnea en un proceso que se conoce como conjuntivalización o pannus. (Figura 20a y 20b)

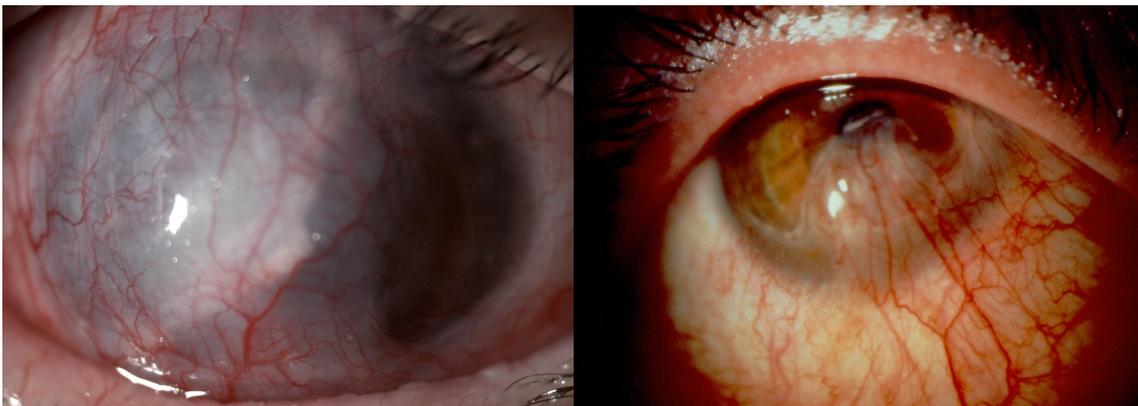


Figura 20a. Pannus vascularizado: se aprecia claramente la invasión de tejido conjuntival, opaco y con vasos. Paciente afectado de enfermedad injerto contra huésped. Fotografía realizada mediante lámpara de hendidura. Imagen cedida por área clínica. IOBA.

Figura 20b. Conjuntivalización en un paciente diagnosticado de rosácea. Fotografía realizada mediante lámpara de hendidura. Imagen cedida por área clínica.IOBA.

Es interesante reseñar que no sólo se pierden las células madre, sino el entorno biológico que permite su crecimiento y desarrollo.⁷² Esta situación da como resultado una metaplasia escamosa, donde se produce la transformación del fenotipo del epitelio corneal en conjuntival; ya que si el epitelio corneal no puede regenerarse mediante las células madre epiteliales limbares, lo hará “pidiendo ayuda” al siguiente

Tesis doctoral: "Estudio mediante microscopía confocal del nicho limbar en pacientes con síndrome de insuficiencia límica sometidos a trasplante de células madre"

tejido más cercano, la conjuntiva, quien le presta su tejido translucido y vascularizado. Así se intenta asegurar el mantenimiento estructural de la córnea, pero al precio de perder su transparencia.^{3,67,73}

Esta conjuntivalización de la córnea produce destrucción de la membrana basal, neovascularización superficial, inflamación crónica del estroma y cicatrización anormal de la córnea.⁷³ El tejido conjuntival que sustituye al tejido corneal normal define los cambios mencionados anteriormente. Las interconexiones son más flexibles que las del epitelio corneal, lo que favorece la tinción de fluoresceína. Además, estas conexiones permiten la penetración de leucocitos de la película lagrimal en el estroma, causando la sintomatología inflamatoria. Estas células no son capaces de secretar factores antiangiogénicos normales en el epitelio corneal, lo que condiciona la aparición de la neovascularización.¹⁶

Los pacientes que sufren un SIL presentan inflamación y alteraciones de la córnea, fotofobia, disminución variable de la visión, lagrimeo, blefaroespasma, episodios constantes de dolor provocados por erosiones epiteliales y enrojecimiento crónico. A esta clínica, además, hay que añadir la derivada de la etiología concreta de SIL.^{3,4,16,68}

La clasificación del SIL se puede hacer en base a la extensión de la zona afectada:³²

- SIL parcial. Su diagnóstico se basa en la pérdida de empalizadas de Vogt en uno, dos o tres cuadrantes del limbo esclero-corneal del limbo corneal. (Figura 21)
- SIL total. La afectación del limbo es de 360°. (Figura 22)

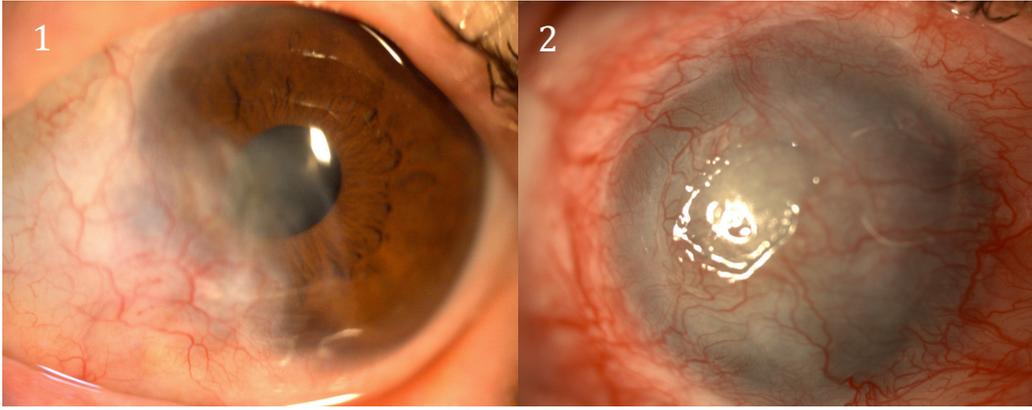


Figura 21. Insuficiencia límbica parcial. Paciente afectado de causticación. Fotografía realizada en el área clínica del IOBA mediante lámpara de hendidura.

Figura 22. Insuficiencia límbica total. Paciente afectado de causticación. Fotografía realizada en el área clínica del IOBA mediante lámpara de hendidura.

El SIL se puede catalogar de otras formas. Y así, López-García y colaboradores utilizan una clasificación del SIL en la que se consideran tanto síntomas y signos clínicos como alteraciones citológicas observadas mediante citología de impresión. Establecen 4 estadios de 0-3. Se diferencian cuatro grupos dependiendo de la gravedad de los síntomas en ausentes, leves, moderados o graves.⁷⁴

Existe también otra clasificación basada en la extensión de la deficiencia de células madre de manera indirecta y la presencia/ausencia de inflamación conjuntival. (Tabla 1)

Tabla 1. Clasificación del síndrome de insuficiencia limbar en función del grado de deficiencia de células madre y del grado de inflamación conjuntival.

	Conjuntiva normal (estadio a)	Conjuntiva previamente inflamada (estadio b)	Conjuntiva actualmente inflamada (estadio c)
Deficiencia parcial de células madre (estadio I)	Iatrogénico, uso de lentes de contacto (estadio Ia)	Quemadura química o térmica antigua (estadio Ib)	Stevens-Johnson grado medio, causticación reciente (estadio Ic)
Deficiencia total/subtotal de células madre (estadio II)	Aniridia, daño severo por uso de lentes de contacto o iatrogénico (estadio IIa)	Causticación química o térmica severa antigua (estadio IIb)	Stevens-Johnson grado severo causticación química o térmica reciente (estadio IIc)

Clasificación tomada del artículo *Ocular surface disease. Medical and surgical management*.2002⁷⁰

4.4.3. Diagnóstico

Biomicroscopía de polo anterior con lámpara de hendidura

El diagnóstico de SIL es fundamentalmente clínico, ya que es perfectamente visible en la biomicroscopía de polo anterior con lámpara de hendidura, al observar la conjuntivalización, la tinción positiva de fluoresceína de la córnea, la pérdida de transparencia de la córnea y la desaparición de las empalizadas de Vogt.^{3,4,68} La intensidad de los síntomas dependen, principalmente, de la gravedad del SIL.^{4,16}

Además existen otras pruebas que ayudan a confirmar la existencia clínica del SIL que se comentan a continuación.

Citología por impresión corneal

La citología de impresión es un procedimiento de análisis histológico del epitelio de la córnea o de la conjuntiva que se basa en la recolección de las capas más superficiales de estos epitelios mediante la impresión en un papel de filtro.

Esta técnica tiene como finalidad principal el determinar la densidad de células caliciformes, normalmente presentes en la conjuntiva normal y ausentes en la córnea y el grado de metaplasia escamosa epitelial; además se puede valorar la presencia de células inflamatorias o la presencia de alteraciones en la cromatina celular.^{27,75-77}

En un procedimiento que se considera rápido, fácil, reproducible, y permite la recogida de células epiteliales de manera poco invasiva.⁷⁸

La realización de estas citologías a nivel conjuntival está más extendida y, así, se puede realizar la caracterización de diferentes patologías de la superficie ocular, como la queratoconjuntivitis atópica, penfigoide, síndrome de Steven-Johnson o síndrome de ojo seco. En definitiva, es aplicable a todas las enfermedades que cursen con alteración de la superficie ocular con cambios de tipo celular y componente inflamatorio.^{1-4,27,69,79}

El uso de la citología por impresión corneal está menos extendido, sin embargo y, por las razones que se comentan más abajo, es poco realizada.



Figura 23. Citología por impresión corneal. Placas de células epiteliales que contienen células caliciformes. Células inflamatorias agudas acompañantes. Dentro del círculo rojo: células caliciformes (células grandes teñidas de morado) y con círculo negro: células inflamatorias (puntos más pequeños que una célula epitelial). PAS modificado 40 X. Imagen cedida por el laboratorio de Anatomía patológica. IOBA

Si en el proceso se detectan células caliciformes en la muestra corneal, se confirma la existencia de conjuntivalización.⁸⁰ (Figura 23) Aunque el diagnóstico del SIL se base directamente en su existencia, es posible no detectarlas en algunas ocasiones como en el Stevens-Johnson, penfigoide o quemadura química.³

También en las muestras obtenidas se puede analizar ARN, por ejemplo de las mucinas oculares de la superficie ocular. Las mucinas son un grupo de proteínas de elevado peso molecular que forman parte de las secreciones propias de los epitelios. La superficie ocular expresa 9 de los 18 genes de mucina humanas. Estas moléculas se encargan de mantener la superficie ocular húmeda y protegida de las agresiones externas.^{81,82} Entre ellas la MUC5AC es exclusiva de las células caliciformes, por lo que si se detecta en epitelio corneal es sugestiva de SIL, y de hecho, se ha desarrollado un test con este propósito por un grupo español (Limbokit, Bioftalmik).⁸³

El problema principal de esta técnica, además de la demora en el análisis de laboratorio que dificulta el diagnóstico precoz, es que obliga a la recolección de células, provocando un defecto epitelial corneal que, a veces, puede ser problemático

y desencadenar una úlcera persistente.^{73,84}

Además nuestro grupo de trabajo ya estableció que la microscopía confocal, técnica de la que se hablará más adelante, es óptima, mínimamente invasiva, para evaluar el epitelio corneal en la córnea central. Y así se estableció que una valoración clínica exhaustiva, junto con esta técnica de imagen, son las herramientas fundamentales para definir el éxito o rechazo de futuros ensayos clínicos.¹⁰

Microscopía confocal in vivo (MCIV)

La técnica denominada microscopía confocal (MCIV) se ha convertido en la técnica diagnóstica de elección para, entre otros usos, visualizar el limbo esclero-corneal y analizar el fenotipo del epitelio en la córnea, pudiendo así asegurar con certeza el diagnóstico del SIL. El Heidelberg Retina Tomography (HRT-3) con el módulo de córnea Rostock (RCM) (Heidelberg GmbH, Heidelberg, Alemania) es el equipo preferido hoy en día para realizar la MCIV que permite la adquisición de imágenes de gran calidad para la evaluación de la superficie ocular.

El sistema óptico de coherencia del HRT se considera no invasivo, confocal de barrido, para la adquisición de análisis cuantitativos y cualitativos, con imágenes en dos dimensiones y permite visualizar las microestructuras celulares y vasculares, sin utilizar contrastes o tinciones que dificultan la colaboración del paciente.

Para la adquisición de las imágenes, se enfoca un rayo láser diodo de 670 nm en la córnea y es desviado periódicamente por espejos oscilantes, por lo que cada sector de la córnea es escaneado secuencialmente. La cantidad de luz reflejada en cada punto se mide utilizando un detector sensible a la luz. En este sistema, la luz sólo se puede reflejar a partir de una estrecha región que rodea el plano de coordinación.

La luz dispersada fuera del plano focal es suprimida. Por ello, estas imágenes confocales de dos dimensiones pueden ser consideradas como una sección óptica a través de la córnea en la ubicación del plano focal. Este plano focal se puede mover manualmente a través de la córnea. (Figura 24)

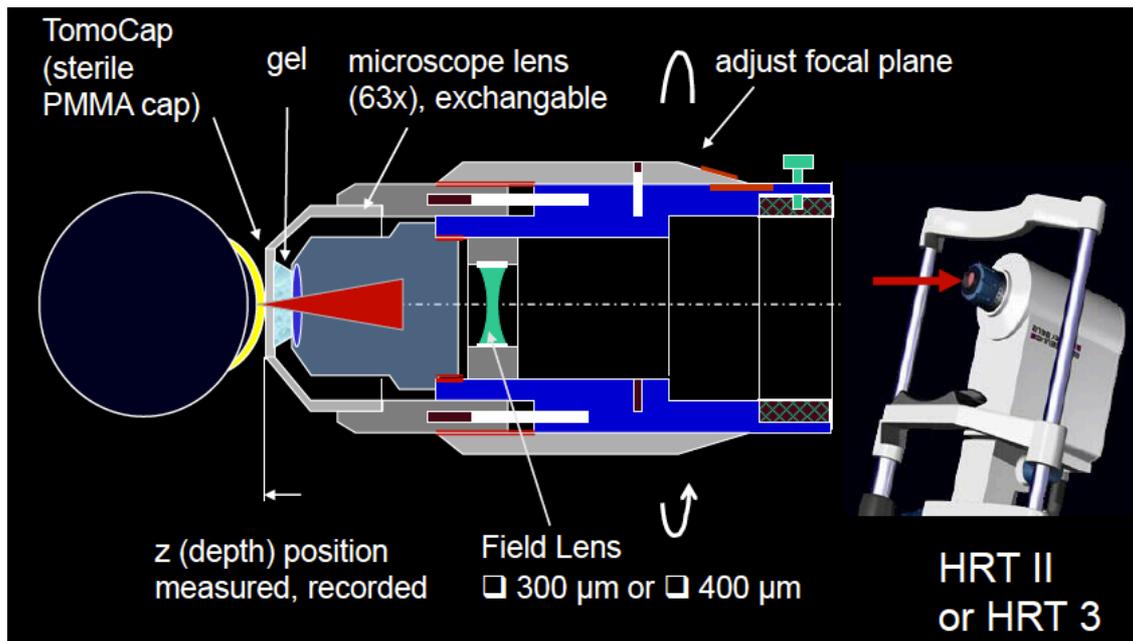


Figura 24. Esquema del interior del microscopio confocal. Imagen tomada de Heidelberg Retina Tomograph II Operating Instructions Software Version 1.2. 2005.⁸⁵

Por lo tanto, se pueden adquirir las imágenes de las distintas capas corneales: epitelio, estroma y endotelio. La ubicación real del plano focal se mide y se almacena con cada imagen adquirida. (Figura 25)

Estas imágenes bidimensionales consisten en 384x384 pixels cubriendo un área de 0,4 mm x 0,4 mm de la córnea usando 400 FOV (campo de visión) y un aumento de 63x. El tiempo de adquisición es de 0,024 seg./imagen en 2 dimensiones y de 4 seg./imagen de 3 dimensiones, con una resolución óptica de 2 µm en vertical y de 4 µm en horizontal y una resolución numérica de 1 mm por píxel en vertical y horizontal. Permite un desplazamiento en profundidad de 1 mm y la adquisición de imágenes está controlada por una cámara.⁸⁵

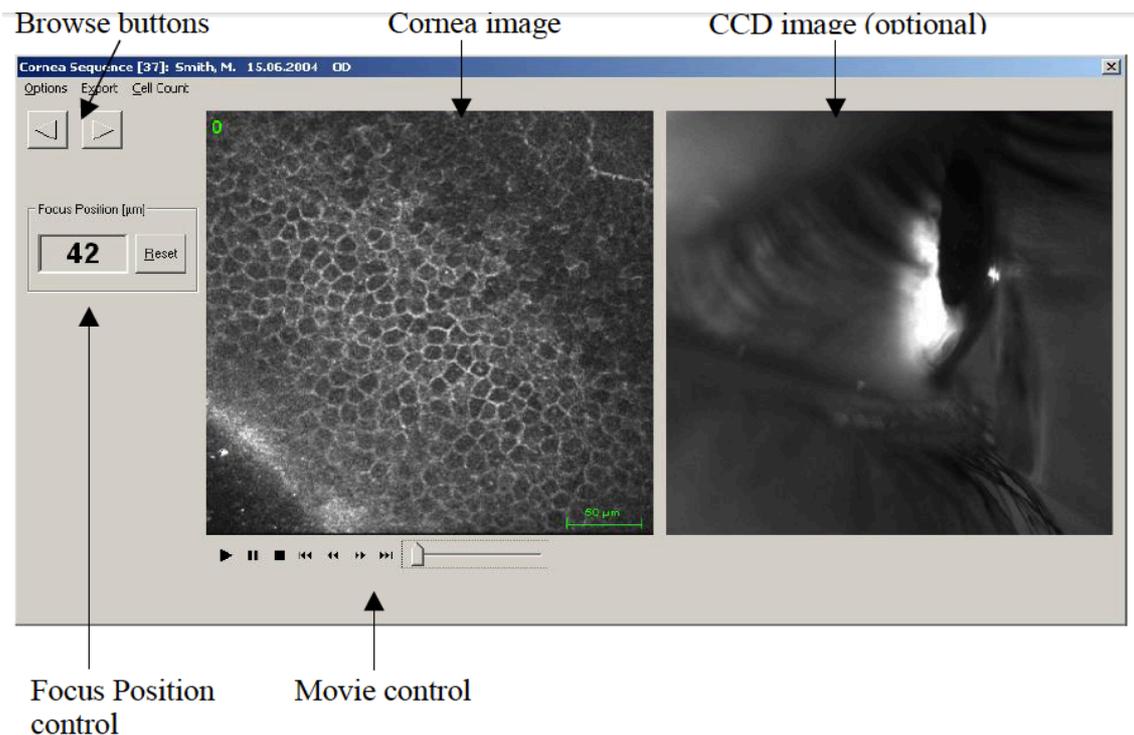


Figura 25. Captura de pantalla del HRT III. Ubicación real del plano focal. Imagen tomada de Heidelberg Retina Tomograph II Operating Instructions Software Version 1.2. 2005.⁸⁵

Con esta tecnología puede apreciarse, a tiempo real, las diferentes, capas de la córnea, permitiendo evaluar cambios patológicos como los que se producen en el SIL. Por ejemplo, se puede apreciar la presencia de células caliciformes en la zona conjuntivalizada, la aparición de neovasos o la existencia de células inflamatorias.⁷⁵

Nubile y colaboradores establecieron que la MCIV era una técnica muy útil para detectar empalizadas de Vogt y permitían establecer las bases del diagnóstico y evaluación en el uso de trasplantes de células madre.⁸⁶

El principal problema que presenta la técnica es su interpretación, ya que su valoración es puramente morfológica, además de requerir entrenamiento.³⁰

Cuando se analizan las imágenes de MICV del HRT, se pueden definir las siguientes estructuras:^{87,88}

- Epitelio corneal
 - Epitelio superficial con patrón poligonal, con núcleos negros y citoplasma ancho reflectante que están en estado de descamación. (Figura 26)
 - Intermedia, entre 10-30 µm de espesor, células con núcleo negro y

borde blanco hiperreflectante y de gran densidad. (Figura 27)

- Epitelio profundo, más allá de 30 μm , que presenta un patrón similar al epitelio medio con gran densidad celular.
- La capa de Bowman es una estructura mal definida con el microscopio confocal por la falta de células. Se encuentra inmediatamente subyacente al epitelio basal, donde se ve acompañado por numerosas fibras nerviosas. (Figura 28)
- El plexo nervioso se encuentra situado entre el epitelio y en el estroma más superficial. Son fibras hiperreflectantes, finas, brillantes, distribuidas de manera paralela u oblicua y con ramificaciones que unen las fibras. (Figura 29)
- El estroma se caracteriza por unas células ovoideas e hiperreflectantes, los fibroblastos corneales o queratocitos; a medida que se profundiza en el estroma, la densidad celular aumenta. (Figura 30)
- Aunque no existen estudios de MCIV para detectar la controvertida capa de Dua, es previsible que ésta no sea visible, dado que es acelular.²³
- La membrana de Descemet no es claramente visible con esta técnica, por la misma razón.^{85,89}
- El endotelio corneal se caracteriza por un mosaico de células hexagonales del mismo tamaño y forma. (Figura 31)

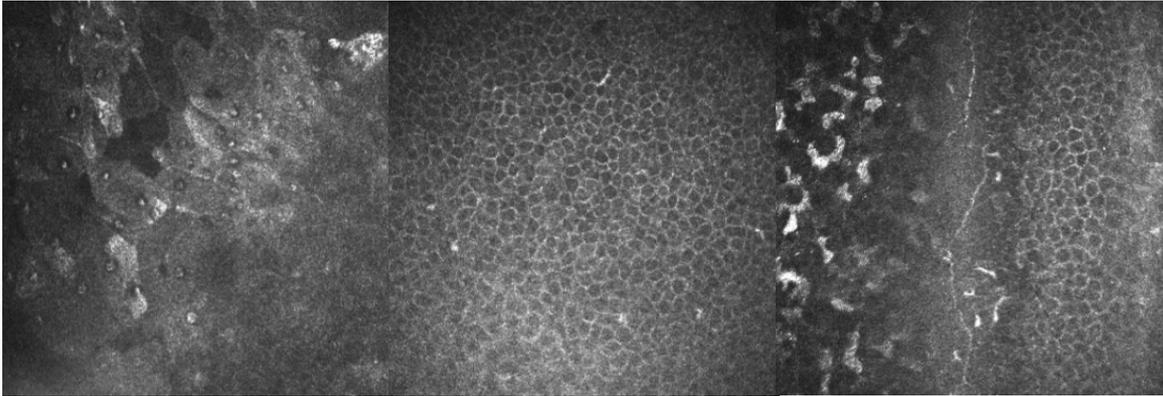


Figura 26. Imagen de microscopía confocal in vivo. Epitelio corneal en descamación. Imagen cedida por el área clínica. IOBA.

Figura 27. Imagen de microscopía confocal in vivo. Epitelio corneal en sus capas basales, 490 μm . Imagen cedida por el área clínica. IOBA.

Figura 28. Imagen de microscopía confocal in vivo. Sección oblicua de epitelio corneal, plexo nervioso y estroma. Imagen cedida por el área clínica. IOBA.

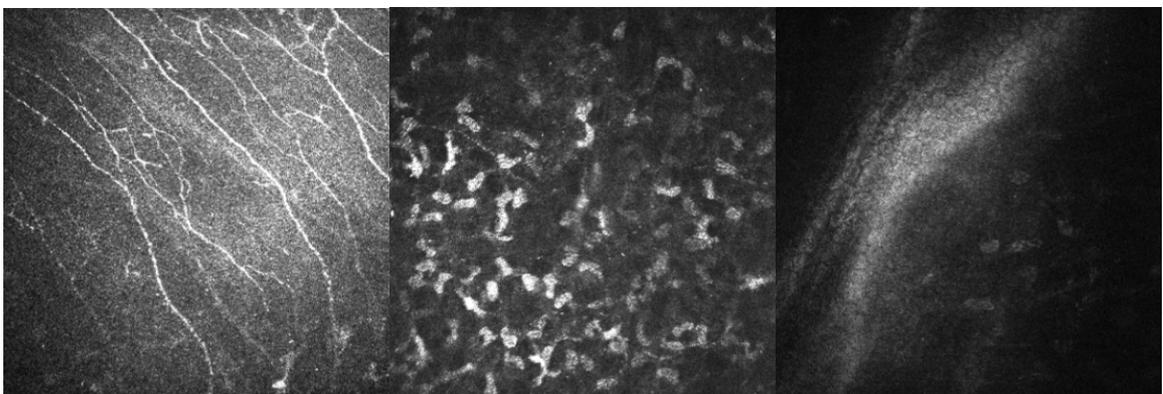


Figura 29. Imagen de microscopía confocal in vivo. Plexo nervioso subbasal de la córnea. Imagen cedida por el área clínica. IOBA.

Figura 30. Imagen de microscopía confocal in vivo. Estroma. Imagen cedida por el área clínica. IOBA.

Figura 31. Imagen de microscopía confocal in vivo. Endotelio y parte de estroma posterior. Imagen cedida por el área clínica. IOBA.

Para el presente trabajo es fundamental definir las estructuras que conforman el nicho limbar en el limbo esclero-corneal y que han sido descritas previamente en el trabajo realizado por el grupo de superficie ocular:¹⁰

- Se define la zona de transición epitelial conjuntival/corneal como una frontera entre dos tipos celulares, con fenotipo corneal y fenotipo conjuntival, donde se diferencian tanto la morfología celular como la intensidad en blancos/negros (Figura 32)
- Las empalizadas de Vogt se definen mediante MCIV como:^{87,90} (Figura 33)
 - Crestas de empalizada: estructuras lineares hiperreflectantes con un espacio acelular interno y rodeadas por estructuras hiperreflectantes pequeñas.
 - Criptas límbicas: son columnas de células epiteliales ocupando el espacio entre las crestas mencionadas previamente.

- Proyecciones estromales focales: estructuras ovaladas-circulares que se encuentran cercanas a la terminación de las empalizadas de Vogt, rodeadas por células hiperreflectantes pequeñas, correspondientes a proyecciones estromales hacia el epitelio corneal.

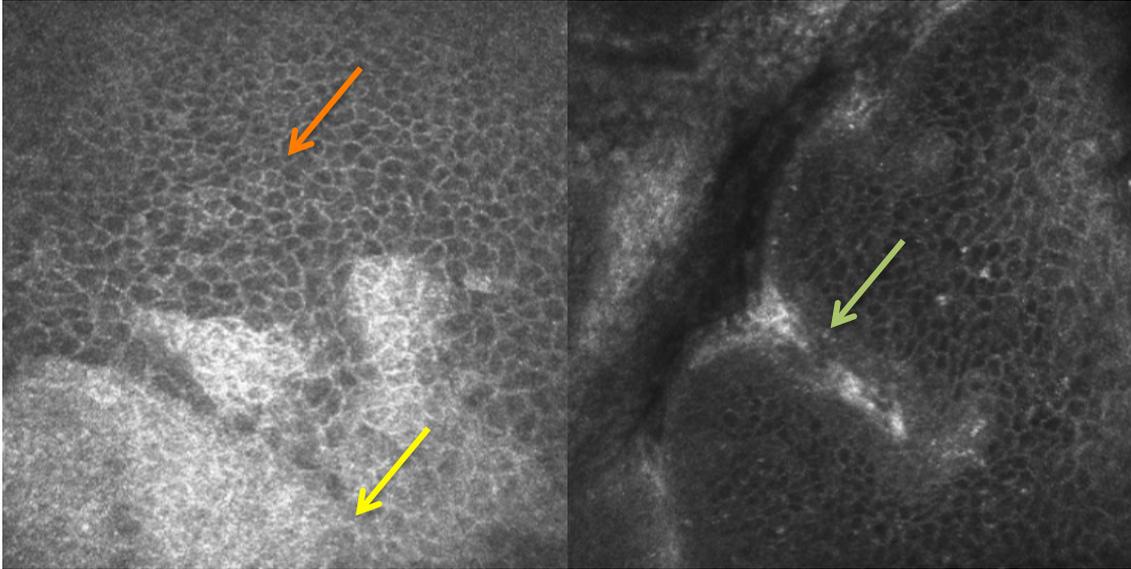


Figura 32. Imagen de microscopía confocal in vivo. Zona de transición entre los epitelios corneal (flecha roja) y conjuntival (flecha amarilla). Imagen cedida por el área clínica. IOBA.

Figura 33. Imagen de microscopía confocal in vivo. Crestas de empalizada (flecha verde). Imagen cedida por el área clínica. IOBA.

- Melanocitos: células hiperreflectantes correspondientes a la distribución de pigmento en pacientes con limbo pigmentado.
- Células de Langerhans: partículas hiperreflectantes morfológicamente similares a células dendríticas en capas basales de las empalizadas.

4.4.4. Tratamiento

El tratamiento depende de la etiología del SIL y de su severidad.^{68,91,92} Siempre hay que abordar primero el tratamiento médico y, si no es suficiente, complementarlo con un tratamiento quirúrgico, sin desechar el primero tampoco en la preparación preoperatoria y en el período postoperatorio.^{1,4,27,88,92-94} Es interesante reseñar que no sólo se pierden células madre, sino el entorno biológico que permite su crecimiento y desarrollo, complicando el abordaje de los tratamientos que se proponen.⁷²

Tratamiento médico

Cualquiera que sea la causa de esta patología, producirá una reacción inflamatoria, más o menos agresiva y duradera, por lo que, indiscutiblemente, la primera medida terapéutica es abordar el tratamiento etiológico de la patología causal, hasta el punto en que ya no se pueda mejorar más la situación de ese SIL.

La terapia antiinflamatoria se realiza mediante esteroides, inmunosupresores y otro tipo de medicación antiinflamatoria, todos ellos tanto por vía tópica como por vía sistémica. El empleo de corticoides está limitado a períodos cortos de tiempo, ya que su uso crónico presenta un alto riesgo de complicaciones. La ciclosporina A es eficaz y segura a largo plazo, pero necesita un aporte continuo y en ocasiones provoca problemas de tolerancia; no obstante, debe valorarse siempre su utilidad potencial.⁹⁵⁻⁹⁷

Se utiliza también tetraciclinas por vía oral, como moduladores de la inflamación de la superficie ocular, así como otras potenciales alternativas como derivados de la progesterona por vía tópica.

También hay que señalar la importancia del uso de sustitutivos lagrimales (gotas, geles, pomadas) que siempre serán útiles para conseguir la regeneración de la superficie ocular. Existe, por último, la posibilidad de utilizar, por vía tópica, colirios derivados de la sangre del propio paciente. Son los llamados sueros autólogos y derivados que, de forma sobredimensionada, son llamados a veces “terapia regeneradora”. **El colirio de suero autólogo**, a diferentes concentraciones, promueve la epitelización corneal y proporciona nutrientes adicionales.⁹⁸ **El colirio realizado con plasma enriquecido en factores de crecimiento** consiste en la elaboración y utilización de un plasma enriquecido con plaquetas que se obtienen de la sangre del propio paciente después de ser activado con cloruro cálcico, dando lugar a una

estructura de fibrina biodegradable y a la liberación de proteínas. Este proceso estimula la proliferación y migración de queratocitos y fibroblastos conjuntivales, mejorando la cicatrización de lesiones corneales y estabilizando, por tanto, la superficie ocular. Esta opción terapéutica es utilizada en otras especialidades médicas como odontología, traumatología, dermatología, etc.⁹⁸

Otra medida adicional es el uso de lentes de contacto para evitar, sobre todo, las molestias referidas por el paciente; sin embargo, su uso a largo plazo, puede facilitar la neovascularización, por reducción de los niveles de oxígeno. Además, aumenta la posibilidad de una infección.

Estos tratamientos, aunque no pueden solucionar la pérdida estructural del limbo, ni la barrera física que proporciona, deben ser tenidos en cuenta, con el fin de controlar la inflamación, tanto previa como posteriormente a una técnica quirúrgica reconstructiva.

Tratamiento quirúrgico

Lo primero que debe plantearse, antes del abordaje quirúrgico, es la situación del lecho corneal, independientemente de la técnica, ya que en muchas ocasiones es fundamental proceder a una preparación previa, realizando queratectomía y limbectomía para eliminar la conjuntivalización.^{3,16,27,74,99,100} (Figura 34)

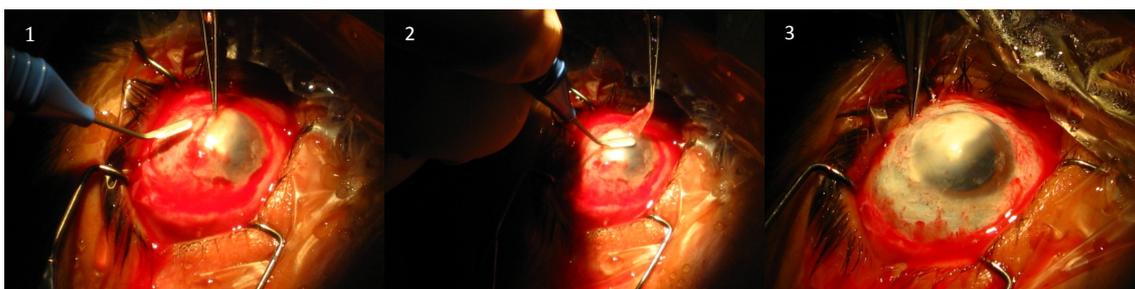


Figura 34. Desbridamiento del tejido conjuntival en un paciente afecto con síndrome de insuficiencia limbar. Imagen cedida por el área quirúrgica. IOBA.

Tras la preparación del lecho quirúrgico se realiza el abordaje de la patología mediante las siguientes técnicas:

1. El trasplante de membrana amniótica, descrito en la década de los 80 como tratamiento quirúrgico para defectos de la superficie ocular, se utiliza como primer abordaje terapéutico. Este tejido, debido a las propiedades de

promoción de crecimiento epitelial y disminución de la inflamación, puede restaurar la membrana basal y la matriz estromal.^{3,16,74} (Figura 35)

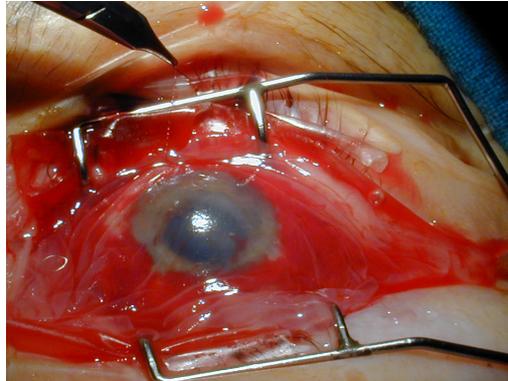


Figura 35. Implante de membrana amniótica. Imagen cedida por el área quirúrgica. IOBA.

Pero dado que no existe regeneración del limbo de esta manera, no es posible la recuperación a largo plazo del epitelio corneal y de hecho se sabe que no puede esperarse una solución con un trasplante de MA en SIL mayores de 90 grados.⁷³

2. El trasplante de limbo se utiliza para solventar los problemas de afectación del limbo esclero-corneal y estabilizar la superficie ocular; estas cirugías, presumiblemente, trasplantaban células madre, aunque nunca han funcionado adecuadamente, puesto que el número de células madre es mínimo y no permiten la regeneración del epitelio corneal a largo plazo. Pero, además, los problemas de rechazo inmune son importantes y se requiere inmunosupresión prolongada. Existen varias técnicas en función del origen del tejido donado:^{16,74}
 - a. Trasplante conjuntival limbar-autólogo (CLAU). Trasplante de tejido limbar sobre un soporte conjuntival del propio paciente.
 - b. Trasplante conjuntivo-limbar alogénico de donante cadáver (c-CLAL).
 - c. Trasplante conjuntivo-limbar alogénico de donante vivo relacionado con el receptor (lr-CLAL).
 - d. Trasplante conjuntivo-limbar alogénico de donante vivo no relacionado con el receptor (Inr-CLAL).
 - e. Trasplante queratolimbar autólogo (KLAL).

f. Trasplante queratolimbar alogénico (KLAL).

3. Debido a que estos estudios demuestran resultados pobres,⁵ se hace necesaria la opción de un trasplante no ya tisular, sino celular, que asegure el aporte de un gran número de ellas, sobre todo cuando la situación ocular es grave. Por este motivo surge la posibilidad del trasplante de células madre expandidas *in vitro* o cultivadas. (Figura 36)



Figura 36. Traslante de células madre a limbo corneal. Foto 1 Recipiente con el producto celular. Foto 2 Sustrato de las células madre. Membrana amniótica. Foto 3 Producto celular colocado sobre la superficie ocular. Imagen cedida por el área quirúrgica. IOBA.

La expansión *in vitro* es una técnica de regeneración de tejidos utilizada en la ingeniería tisular para solventar problemas en diferentes partes del organismo. Se realiza una siembra de células que crecen y se dividen en un sustrato que permita su trasplante.^{39,58}

Estos tratamientos permiten suministrar células madre de diverso origen y, en el caso de la patología ocular, células limbares o células epiteliales de la mucosa oral. Pueden ser tanto procedentes de fuentes alogénicas como autólogas.

Es importante determinar el sustrato ideal para estos procedimientos, como por ejemplo MA y/o matrices de fibrina.¹⁶

Existen dos procedimientos quirúrgicos en base al origen de las células utilizadas en el trasplante:

1. Traslante de células epiteliales limbares cultivadas, es decir, tras expansión *in vitro*, denominado CLET, utilizando las siglas del término anglosajón "*cultivated limbal epithelial transplantation*". Este trasplante puede realizarse obteniendo las células del ojo contralateral (CLET autólogo) o bien obteniendo las células de donante vivo o, preferentemente, de cadáver (CLET alogénico). El uso de CLET autólogo tiene la ventaja de no

necesita utilizarse inmunosupresión, pero la desventaja de que sólo puede usarse en pacientes con patología unilateral o bilateral con una afectación mínima del ojo que serviría de donante. El CLET alogénico, sin embargo, puede utilizarse en pacientes con patología bilateral y en aquellos que presenten afectación unilateral, evita la necesidad de tomar una biopsia del ojo sano eliminando así la posibilidad de daño iatrogénico. Pero hay que tener en cuenta que la mayor parte de estudios han presentado mejores resultados con autoinjertos, aunque con más frecuencia se realizan investigaciones en los que se utilizan ambos tipos de técnicas para mejorar los resultados.^{10,101,102}

2. Trasplante de células de mucosa oral. Esta posibilidad terapéutica fue descrita por primera vez en 2004. Se realiza obteniendo una biopsia de la mucosa oral y realizando un cultivo ex vivo de las células; al ser tejido propio del paciente se evita el rechazo y las enfermedades infecciosas. Los autores defienden esta técnica porque ha sido ampliamente utilizada en los últimos años y ha obtenido resultados prometedores.¹⁰³
3. Existen algunas posibilidades que no han pasado a nivel clínico, como las células procedentes de folículo piloso,¹⁰⁴ las de tejido adiposo, las células de cordón umbilical¹⁰⁵ o las células embrionarias¹⁰⁶.

Tesis doctoral: "Estudio mediante microscopía confocal del nicho limbar en pacientes con síndrome de insuficiencia límbica sometidos a trasplante de células madre"

Metodología

5. Metodología

5.1. Diseño del estudio y pacientes

Este trabajo de tesis doctoral está incluido en el contexto de un ensayo clínico fase I-II de prueba de concepto, aleatorizado, controlado, con doble enmascaramiento, basado en la hipótesis de que el trasplante alogénico de células madre mesenquimales médula ósea (MSCT) es al menos tan seguro y eficaz como el trasplante alogénico de células limbares epiteliales cultivadas (CLET) utilizado para el tratamiento de córneas dañadas por SIL.

Además de la hipótesis y de los objetivos propios de este ensayo clínico, este trabajo de tesis doctoral añade una segunda hipótesis reflejada anteriormente para la cual, se ha analizado el nicho limbar de cada paciente incluido y los resultados se han correlacionado con el resultado final del ensayo.

El protocolo (EudraCT 2010-023535-42) fue aprobado por el Comité Ético del Área de Salud Este de Valladolid (Anexo 2) y por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) (Anexo 3). El ensayo se encuentra registrado en [www.The Clinical Trials.gov](http://www.TheClinicalTrials.gov) con el identificador NCT01562002 (Anexo 4).

Todos los procedimientos se llevaron a cabo en conformidad con la Declaración de Helsinki así como las directrices sobre buenas prácticas clínicas y de fabricación en lo que respecta a tejidos y células establecidas por la Unión Europea. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito (Anexo 5).

El ensayo fue patrocinado la Unidad de Terapias Avanzadas IOBA-IBGM de la Universidad de Valladolid, y fue subvencionado por el Programa Nacional de Terapias Avanzadas (Ministerio de Salud de España) e indirectamente (en costes de personal), por el Centro de Medicina Regenerativa de Castilla y León y el CIBER-BBN.

Este ensayo presenta las siguientes características:

- Fase I-II: pretende averiguar no sólo la eficacia, sino también la tolerancia y seguridad del producto experimental frente al control.
- Es un ensayo de prueba de concepto: pretende establecer que el producto experimental es tan válido como el control, por lo que emplea el menor

número de pacientes posible, abriendo la puerta de lograr buenos resultados, a ensayos con mayor número de pacientes.

- Unicéntrico se ha llevado a cabo en un único centro: la Unidad de Terapias Avanzadas, IOBA-IBGM, de la Universidad de Valladolid.
- Prospectivo: este aspecto es inherente a todo el ensayo clínico; los pacientes fueron seguidos durante un año.
- Intervencional: la intervención realizada fue la aplicación de productos de terapia avanzada, concretamente, de terapia celular.
- Controlado, con grupo paralelo: se administraron dos productos de terapia avanzada distintos, experimental y control, de forma paralela a dos grupos diferentes:
 - Producto de terapia avanzada experimental, consistente en células madre mesenquimales de médula ósea de origen alogénico (donante vivo) cultivadas sobre membrana amniótica y posteriormente trasplantado a la superficie ocular afectada por SIL. El conjunto se denomina MSCT (*mesenchymal stem cell transplantation*)
 - Producto de terapia avanzada control, consistente en células limbares alogénicas (donante cadáver) cultivadas sobre membrana amniótica y trasplantadas posteriormente, denominándose al conjunto CLET (*cultivated limbal epithelial transplantation*).
- Randomizado o aleatorizado: los pacientes fueron distribuidos de forma aleatoria a uno de los dos grupos terapéuticos arriba mencionados.

Se incluyeron pacientes adultos, de ambos sexos, con los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

1. Diagnóstico de fracaso corneal unilateral o bilateral debido a SIL y caracterizado por:
 - a. Ser de extensión total y/o severo.
 - b. Estar acompañado invariablemente de ceguera o baja visión.
 - c. En el que todas las terapias médicas disponibles así como el trasplante de membrana amniótica u otros posibles trasplantes realizados, habían fracasado.

2. Ausencia de cirugías oculares en los 6 meses previos, con la excepción de poder haber sufrido un trasplante anterior previo en el contexto del presente ensayo.
3. El ojo afecto debía haber sido sometido, justo antes de la cirugía, a terapias médicas para disminuir el proceso inflamatorio lo más posible.
4. El/la paciente debía aportar serología negativa para las enfermedades transmisibles exigidas en los trasplantes de legislación visible (ver más adelante).
5. El/la paciente no debía tener contraindicaciones para recibir terapia inmunosupresora sistémica.
6. El/la paciente debía ser capaz de efectuar todas las visitas de seguimiento programadas.

Como el resultado final del trasplante de células puede depender directamente de la etiología del daño límbico, las patologías se agruparon, en la visita inicial, en una de las tres categorías etiológicas de diferente gravedad, enumeradas a continuación de peor a mejor pronóstico:¹⁰

1. Grupo 1: causticaciones o quemaduras químicas.
2. Grupo 2: queratoconjuntivitis cicatrizantes inflamatorias inmunes (por ejemplo, síndrome de Stevens-Johnson, epidermólisis necrotizante tóxica, penfigoide de las membranas mucosas, queratoconjuntivitis por rosácea, etc).
3. Grupo 3: enfermedades con nulo o escaso componente inflamatorio (por ejemplo, secuelas de cirugías múltiples, secuelas crónicas de queratitis infecciosa, aniridia congénita, etc).

El ensayo comprendía las siguientes visitas: la de inclusión (visita 1), la de la cirugía del trasplante (visita 2), 24 h posteriormente (visita 3), semanalmente durante el primer mes (visitas 4-7), mensualmente hasta el 6º mes (visitas 8-12) y cada dos meses hasta completar los 12 meses (visitas 13-15). Las visitas elegidas para aportar los resultados finales fueron la visita 12 (6 meses) y la visita 15 (12 meses). Además había visitas no programadas siempre que se juzgara necesario.

La inmunosupresión oral se prescribió, para todos los pacientes, en la visita inicial (visita 1) con uno de los fármacos siguientes (por orden de preferencia): 1,5-2,0 g/día de micofenolato mofetilo, 3-5 mg/kg/día ciclosporina A, 1-2mg/kg/día de azatioprina. Este tratamiento se mantuvo durante 12 meses después del trasplante y se suspendió en los tres meses siguientes. Pasado este tiempo, el paciente seguía revisiones en nuestro centro, ya fuera del ensayo o bien siguió siendo evaluado en su centro de referencia, o bien seguir las visitas habituales en nuestro centro. Se controlaron estrechamente los efectos secundarios potenciales clínicamente y por análisis de sangre/orina cada 2 meses.

5.2. Aleatorización y enmascaramiento

Este procedimiento fue realizado por la Unidad de Estadística del IOBA (Dra. Itziar Fernández).

Después de la comprobación de los criterios de inclusión/exclusión y tras equilibrar la aleatorización de las tres categorías etiológicas y pronósticas comentadas, todos los trasplantes programados fueron aleatorizados en una proporción de 1:1 a CLET o MSCT. La aleatorización se equilibró mediante el uso de bloques permutados de tamaño de bloque variable con un tamaño máximo de 6. El programa de asignación aleatorizada fue generado por ordenador (*R Statistical Software*). Cuando había que asignar a ambos ojos de un mismo paciente, el uso de CLET o MSCT fue randomizado para que ambos ojos no recibiesen necesariamente el mismo tipo de trasplante.

Cuando algún ojo hubo de ser sometido a un segundo trasplante, la asignación a CLET o MSCT fue aleatoria; por lo tanto, los nuevos trasplantes, CLET o MSCT, no fueron necesariamente los mismos que los anteriores que fracasaron.

Los productos de terapia avanzada fueron identificados por el número de asignación aleatoria y sólo la Unidad de Estadística y la Unidad de Procesamiento Celular del IBGM conocían la identidad de cada producto. Los paquetes recibidos en el quirófano (y que seguían las normas de buena práctica de manufacturación) el día del trasplante eran idénticos, pues la única diferencia entre ellos era el tipo celular crecido sobre el sustrato lo cual, lógicamente, es imposible de discernir a

simple vista. Por lo tanto, ningún personal sanitario conocía en ningún momento el tipo celular asignado a cada trasplante.

Un factor que hubiera alterado el enmascaramiento es el uso de los inmunosupresores orales, necesarios para evitar el rechazo inmune en el CLET alogénico pero no en el MSCT alogénico, ya que las células mesenquimales, a priori, no se rechazan. Y así, para asegurar el enmascaramiento, se hizo necesario inmmosuprimir por igual a todos los pacientes.

5.3. Procedimientos

Al inicio de estos procedimientos, todos los pacientes y todos los donantes de tejidos y células alogénicas se sometieron a un cribado obligatorio de enfermedades transmisibles, exigiéndose negatividad para el virus de inmunodeficiencia humana, virus de linfoma de células T humanas, sífilis y hepatitis B-C para ser incluidos en este ensayo.

5.3.1. Elaboración de los productos de terapia celular

Las células destinadas a CLET o MSCT (productos de investigación aprobados por la AMEPS 09-137 y 10-134, respectivamente) se cultivaron sobre membranas amnióticas humanas en la Unidad de Procesamiento Celular de la Universidad de Valladolid (IBGM, Universidad de Valladolid), operada bajo buenas prácticas de fabricación y licenciadas y acreditadas por la AEMPS.

Las membranas amnióticas humanas donadas y los anillos límbicos de cadáver (≤ 60 años de edad) provenían de un banco de tejidos registrado y acreditado (Centro Comunitario de Tejidos Sanguíneos, Oviedo, España). La médula ósea se obtuvo de la cresta ilíaca de pacientes donantes alogénicos menores de 60 años de edad que dieron su consentimiento por escrito y estaban bajo otros ensayos aprobados por la AEMPS.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹

Se prepararon las membranas amnióticas desepitelizadas (tamaño 2.5x2.5 cm) utilizando nuestro protocolo estándar publicado¹⁰ y sirvieron como sustrato para ambos tipos de células.

Para CLET, se obtuvieron dos piezas de 2x2 mm de anillos límbicos alogénicos que fueron procesados en las 4h siguientes y cultivados sobre

membrana amniótica (explantes), como ya se ha descrito.¹⁰ Brevemente, los explantes limbares se mantuvieron inicialmente bajo una gota de suero bovino fetal (FBS) (Life Technologies-Gibco) en condiciones estándar de 37°C, 95% de aire humidificado y 5% de mezcla de gas CO₂. Después de 24 h, se añadieron 3 ml del medio de cultivo siguiente: medio DNEM/F12 (mezcla 1:1) (Life Technologies-Gibco), FBS al 5% (Life Technologies-Gibco), hidrocortisona 50 µg/ml (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), 0,5 ng/ml de tóxina colérica (Gentaur, Kampenhout, Bélgica), 5 ng/ml de insulina transferrina-selenio (ITS) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), dimetilsulfóxido al 0,5% (Sigma Aldrich), 2,5 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico humano (Life Technologies-Gibco) y 0,5 mg/ml de gentamicina (Life Technologies-Gibco). Los explantes limbares se mantuvieron en cultivo hasta que hubo un frente de crecimiento celular de aproximadamente 2 mm (5-7 días), y después se retiraron para permitir una proliferación celular adicional hasta que las células alcanzaron una confluencia del 90% (3-4 semanas). El medio de cultivo se cambió cada 3 días y la progresión del crecimiento se observó diariamente mediante microscopía de contraste de fases.

Para MSCT, las células madre mesenquimales se caracterizaron siguiendo los protocolos de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT).^{107,108,110} y se cultivaron en la parte superior de las membranas amnióticas, sembrándose 100.000 células frescas en una gota de FBS sobre la membrana amniótica desepitelizada. Después de 2 h, se añadieron 2 ml de medio DNEM (High glucose, Life Technologies-Gibco) que contenían FBS al 20% (Life Technologies-Gibco) y 0,5 mg/ml de gentamicina (Life Technologies-Gibco) y la incubación continuó a 37°C, 95% de aire humidificado y 5% de mezcla de gas CO₂ hasta que las células alcanzaron una confluencia del 90% (3-5 días). El medio de cultivo se cambió cada 3 días y la progresión del crecimiento se observó diariamente.

Las membranas amnióticas se levantaron de sus placas de cultivo cuando estaban cubiertas en, aproximadamente, el 90% de su extensión, lo que suponía un total aproximado de 250.000 células. Como se acaba de comentar más arriba, las células epiteliales limbares, se necesitaron entre 3-4 semanas, y para las células madre mesenquimales en torno a 3-5 días. Después de determinar que los cultivos eran negativos para bacterias aerobias y anaerobios, hongos y micobacterias, los

productos de terapia celular se liberaban y se llevaban al IOBA dentro de las 48 horas anteriores a la programación de la cirugía del trasplante.

Al no contar con cultivos adicionales, no se pudieron realizar inmunotinciones de los productos a trasplantar. En todo caso, estos procedimientos ya habían sido ampliamente experimentados y sus características analizadas por nuestro grupo de trabajo, por lo que no se consideró necesario repetirlo.^{7,9,111}

5.3.2. Cirugías del trasplante

La cirugía (visita 2) tuvo lugar entre 3-6 semanas después de la visita de inicio o inclusión (visita 1), y todos fueron realizados utilizando la misma técnica por el mismo cirujano (Dr José M. Herreras) y enfermera (Inmaculada Pérez) experimentados en el procedimiento quirúrgico y manejo de los productos de terapia celular.¹⁰ La mezcla utilizada para la anestesia retrobulbar estaba compuesta de 3cc de lidocaína al 5% (Lidocaina Braun®, Braun Medical SA, Mensungen, Alemania). En primer lugar, se realizó una peritomía conjuntival y se retiraron los tejidos, dejando al descubierto la esclera. El pannus fibrovascular, si estaba presente, se raspó (queratectomía superficial) y se retiró de la córnea receptora extendiéndose hasta el área límbica, permitiendo una peritomía limbar de 360°. La superficie raspada se pulió con una fresa de diamante, y los vasos sangrantes se cauterizaron.

A continuación, el producto celular CLET o MSCT se levantó cuidadosamente del recipiente de cultivo y se colocó con las células en contacto con la superficie ocular del receptor. El injerto se suturó entonces a la epiesclera perilimbar, a 2-4 mm de distancia del limbo, con 8 puntos discontinuos de nylon 10-0. Se aplicaron gotas tópicas de un colirio en suspensión de 1 mg/ml + 3 mg/ml de dexametasona y tobramicina respectivamente (Tobradex® Laboratorios Novartis) y se colocó una lente de contacto de 18-11 mm de diámetro, ocluyéndose el ojo durante 24h.

El paciente fue evaluado a las 24 h tras la cirugía (visita 3) y se prescribió el tratamiento anterior cuatro veces al día hasta que se retiraron la lente de contacto y los puntos en 4-6 semanas. A continuación, se pautó un colirio de 1mg/ml de dexametasona (Maxidex® Laboratorios Novartis) 4 veces al día y se redujo lentamente en los 3 meses siguientes.

5.4. Evaluación de los resultados

Todos los criterios de evaluación de resultados se recogieron en la visita 1 o inicial, a los 6 meses (visita 12) y a los 12 meses (visita 15). Se realizaron en un orden establecido para minimizar las interacciones entre las pruebas (Tabla 2) y se recogieron en un cuaderno de recogida de datos (Anexo 6).

Tabla 2. Pruebas realizadas y orden de ejecución de las mismas en la exploración de los pacientes en las diferentes visitas hasta completar los 6 y los 12 meses de seguimiento.

Pruebas a realizar	<u>Visita 1</u> Inclusión	<u>Visita 2</u> Cirugía de trasplante	<u>Visita 3</u> 24 h tras cirugía	<u>Visita 4-11 y 13-14</u> Semana 1-mes 5 y mes 7-11	<u>Visita 12 y 15</u> Mes 6 y mes 12
Consentimiento informado	x				
Test de embarazo	x				
Historia clínica	x				
Cuestionario de síntomas y calidad de vida	x				x
Agudeza visual	x			x	x
Biomicroscopía de polo anterior con lámpara de hendidura	x	x	x	x	x
Tinción corneal con fluoresceína	x	x		x	x
Iconografía externa	x	x	x	x	x
Presión intraocular y examen de fondo de ojo en midriasis	x				x
Test de Schirmer					x
Microscopía confocal <i>in vivo</i>	x				x
Recogida de efectos adversos			x	x	x

Las visitas en las que se evaluó la variación de los criterios de mejoría con respecto a la visita 1 inicial fueron las de los meses 6 y 12 (en rojo).

5.4.1. Cuestionarios clínicos

Para medir los síntomas relacionados con el SIL y su impacto en las actividades de la vida diaria se utilizaron tres cuestionarios (Anexo 7) que debían ser entregados por personal sanitario (Inmaculada Pérez) y contestados por los pacientes, sin intervenciones ni explicaciones externas:

- Cuestionario OSDI (*Ocular Surface Disease Index*) (versión española homologada): evalúa los síntomas de la superficie ocular en la última semana con 12 preguntas y una puntuación de 0-4 para cada una de ellas, calculándose la puntuación final con una simple fórmula. Puntuaciones >12 indican ausencia de síntomas significativos, 13-32 puntos indican síntomas moderados y una puntuación >32 significa síntomas severos (puntuación máxima, 100).¹¹²
- Cuestionario SIDEQ (*Single Item Score Dry Eye Questionnaire*): el paciente otorga una puntuación de 0-4 a cada una de las 7 preguntas siguientes: sequedad, sensación de cuerpo extraño, quemazón/escozor, dolor, picazón, sensibilidad a la luz y visión borrosa (puntuación máxima: 28).
- Cuestionario de calidad de vida NEI-VFQ25 (*National Eye Institute 25-item Visual Function Questionnaire*): evalúa el impacto del problema ocular en la calidad de vida del paciente, donde las puntuaciones más altas en una escala de 0 a 100 indican una mejor función.¹¹³

5.4.2. Agudeza visual

Fue evaluada por Inmaculada Pérez. Tras la administración de los cuestionarios, se midió la agudeza visual (siempre con la mejor corrección posible), usando el estudio estándar de retinopatía diabética de tratamiento temprano (ETDRS), como es obligatorio en ensayos clínicos.

Es fundamental señalar que la mejora de la visión nunca es el objetivo principal de este tipo de trasplante de células porque esta técnica pretende reconstruir el epitelio corneal y no afectaría lógicamente, a la opacificación corneal más profunda, la catarata o el glaucoma que a menudo acompaña a estas

patologías u otras causas potenciales de visión disminuida, como la patología retiniana concomitante en los casos de SIL tras cirugías múltiples, el nistagmus, en la aniridia congénita y otros. Para estas condiciones, si no son irreversibles, pueden ser necesarias otras técnicas de rehabilitación visual después de CLET o MSCT. Para evitar una mala interpretación por parte del paciente, se explicó en la visita de inicio, la necesidad de procedimientos quirúrgicos considerados necesarios para restaurar la visión tras el trasplante de células y se le dio un grado como se muestra en la Tabla 3.

	Enrojecimiento conjuntival	Opacidad epitelial central	Integridad epitelial corneal		Neovascularización corneal superficial Area/Longitud	Pronóstico visual y posible recuperación visual		Fenotipo corneal epitelial central (MCIIV)
			Queratitis punteada	Area de ulceración		Opacidad de medios previa	Cirugías estimadas como necesarias para recuperar	
Grado 0	Conjuntiva blanca	Ausente		Ausente	Ausente/Ausente	Cualquier grado de opacidad corneal con pérdida visual no corneal irreversible (por ej. patología retiniana irreversible, glaucoma avanzado)	No hay posibilidad de ganancia. El trasplante de células madre sólo pretende mejorar la sintomatología para tratar el dolor y evitar la enucleación de globo	CORNEAL: Células regulares, hexagonales con un diámetro de celular <20 µm; núcleo y citoplasma oscuro, márgenes celulares; hiper-reflectantes, brillantes y bien definidos CONJUNTIVAL: Células redondas o de forma irregular, muy juntas; Diámetro celular > 20 µm (tamaño irregular); Relación núcleo / citoplasma grandes; citoplasma oscuro y núcleo brillante, hiperreflectante. Células calciformes ocasionales
Grado 1	Dilatación vascular	Leve		≤¼	≤¼ / 1mm	Opacidad corneal restringida a la córnea anterior (epitelio y estroma anterior)	Un procedimiento quirúrgico: sólo trasplante de células madre	Células redondas o de forma irregular, muy juntas; Diámetro celular > 20 µm (tamaño irregular); Relación núcleo / citoplasma grandes; citoplasma oscuro y núcleo brillante, hiperreflectante. Células calciformes ocasionales
Grado 2	Hiperemia leve	Moderada		>¼ y ≤½	>¼ y ≤½ / 2-3 mm	O la opacidad corneal restringida a la córnea anterior (como Grado 1) más otra etiología no corneal de la pérdida visual (ej. catarata)	Dos procedimientos quirúrgicos: trasplante de células madre + cirugía no corneal (por ej. extracción de cataratas)	MIXTO: Ambos fenotipos corneal y conjuntival están presentes
Grado 3	Hiperemia moderada	Intensa con visualización de la pupila posible aunque disminuida		>½ y ≤¾	>½ y ≤¾ / 4-5 mm	Opacidad corneal completa	Dos procedimientos quirúrgicos: trasplante de células madre + trasplante de córnea	
Grado 4	Hiperemia intensa	Intensa impidiendo la visualización de la pupila		>¾	>¾ / ≥6 mm	Opacidad corneal completa	Tres procedimientos quirúrgicos: trasplante de células madre + trasplante de córnea + cirugía no corneal (por ej. extracción de cataratas)	

Tabla 3. Signos clínicos y fenotipo epitelial corneal evaluado por microscopía confocal in vivo (MCIIV) considerados en la definición de éxito o fracaso del trasplante de células madre.

*Evaluación mediante biomicroscopía de polo anterior con lámpara de hendidura.

[†]Evaluación mediante Tomógrafo Heidelberg de Retina. HRT-3 y Módulo de Córnea Rockstock (HRT-3, Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Alemania)

5.4.3. Valoración clínica de la superficie ocular

Estos procedimientos fueron realizados por la Dra. M. Calonge y un/a alumno/a, especialistas en oftalmología, del Máster de Subespecializadas oftalmológicas del IOBA, lográndose acuerdo en cada uno de los signos puntuados. Después de la determinación de la agudeza visual, se evaluó el estado clínico de la superficie ocular mediante biomicroscopía de polo anterior usando una lámpara de hendidura (Topcon SL-8Z, Topcon Corp., 75-1, Hasunuma-cho, Habasi-ku, Tokio, 164, Japón), realizando tinciones vitales con fluoresceína y tomando fotografías (programa IMAGENet Fujifilm Finepix S1 Pro. Fuji Photo Film Co., Japón,) en cada visita.

Los signos evaluados fueron los siguientes y su rango y descripción se encuentran en la tabla 3.

- Hiperemia o enrojecimiento conjuntival: fue evaluado en la conjuntiva bulbar cercana a la córnea. Las áreas nasal y temporal fueron evaluadas independientemente en base a la escala Efron¹¹⁴ (puntuación 0-4) y la puntuación final se obtuvo después realizar la media entre ambos valores.
- Opacidad epitelial corneal central: fue evaluada también en 4 grados.
- Integridad epitelial corneal (queratitis superficial y defectos epiteliales persistentes): se valoró con la tinción con fluoresceína sódica, usando una tira comercial, previamente humedecida y aplicada el fórnix inferior. Tras dos minutos, se registró el grado de tinción utilizando un filtro de color azul cobalto (Topcon Corp. Tokio, Japón) sobre la fuente de luz de la lámpara de hendidura y un filtro amarillo Wratten nº 12 (Eastman Kodak, Rochester, NY, EE.UU.). Se registraron tanto la queratitis punteada superficial (esquema de Oxford, puntuación 0-5),¹¹⁵ como la presencia de defecto epitelial.
- Neovascularización superficial corneal (área/longitud): se valoró como se indica en la tabla 3.

5.4.4. Otros procedimientos

Estos procedimientos fueron realizados por Inmaculada Pérez, excepto la visualización de fondo de ojo (realizado por alumnos del Máster de Subespecialidades Oftalmológicas del IOBA).

Se realizó el test de Schirmer sin anestesia tópica para evaluar la producción de la lágrima. Para ello, se colocaba una tira estéril de Schirmer (Tearflo, HUB Pharmaceuticals LLC., Rancho Cucamonga, CA, EE.UU.) en el canto lateral del margen inferior del párpado. La longitud de la humectación se midió después de 5 minutos, con los ojos cerrados.

La presión intraocular se evaluó utilizando un tonómetro Perkins (Perkins MK 2, HS Clemens Clarke International, Essex, Reino Unido).

La evaluación del polo posterior se realizó mediante oftalmoscopia indirecta bajo la dilatación farmacológica de la pupila. Cuando la opacidad de los medios impedía la visualización de las estructuras intraoculares mediante el examen de la lámpara de hendidura o la oftalmoscopia, se realizaron tomografía óptica de coherencia del segmento anterior (OCT) o ecografía de segmento posterior (ultrasonido).

5.4.5. Microscopía confocal *in vivo* (MCIV)

Esta técnica fue realizada y valorada en todos los pacientes por Inmaculada Pérez.

El microscopio confocal utilizado fue el Heidelberg Retinal Tomograph versión 3 (HRT3) acoplado al Rostock Cornea Module (RCM) (RCM-HRT3) (Heidelberg GmbH, Heidelberg, Alemania), con lente de microscopio Zeiss 63x. Este equipo permite obtener cortes coronales del tejido observado mediante el uso de un láser infrarrojo de 670 nm (láser clase 1), de 384 x 383 píxeles con un campo de 400 μm x 400 μm , con un tiempo de adquisición de 0,024 segundos para imágenes en 2 dimensiones, con una resolución óptica de 2 μm vertical y de 4 μm horizontal, teniendo una resolución numérica de 1 μm por píxel en vertical y horizontal y un desplazamiento en profundidad de 1 mm.

Se siguió el protocolo para la toma de imágenes sugerido por la firma comercial productora del equipo, adaptando a la fuente de luz láser del RCM un dispositivo de contacto corneal desechable y estéril TomoCap®. (Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Alemania), cubierto en su superficie y en su cara interna por una capa de gel lubricante Viscotears®. (Carbomero 980, 0,2%; Farmacéutica Novartis S.A., Barcelona, España). El software de adquisición y procesamiento de imágenes fue el Heidelberg Eye Explorer V. 1.5.10.0. 2006 Heidelberg Engineering GmbH. Las imágenes fueron tomadas (Scan type: Section) siempre por el mismo investigador. Tras la instilación de anestesia tópica con clorhidrato de tetracaína 0,1% y clorhidrato de oxibuprocaina 0,4%, se colocó un blefarostato tipo colibrí en el ojo a examinar. En casos excepcionales se colocó una lente de contacto terapéutica (Focus®. Dailies®. CIBA Vision Corp. Duluth, GA, USA). Inicialmente se tomaron las fotografías de la córnea central desde el epitelio superficial hasta el estroma anterior, con el paciente mirando derecho al frente. Posteriormente, se captaron imágenes de los 4 cuadrantes del limbo, pidiéndole al paciente que mirara hacia abajo, hacia temporal, hacia nasal y hacia arriba, buscando encontrar un plano tangencial entre el tejido examinado y la superficie del TomoCap® para lograr una mejor calidad en las imágenes. Para la zona limbar, se enfocó inicialmente el epitelio superficial o intermedio de la periferia corneal y luego se desplazó centrífugamente el plano focal del RCM, hasta encontrar la zona limbar, momento en el que se hizo un barrido de la zona en sentido horizontal y vertical.^{10,13,86} Una dificultad que se presentó inicialmente fue localizar las empalizadas de Vogt, por lo que se enfocaba córnea periférica identificando estroma y epitelio basak y posteriormente se desplazaba el láser periféricamente hasta ver las empalizadas; cuando estas existían, una vez identificadas se enfocaba la imagen del epitelio superficial y se realizaba barrido en sentido horizontal y vertical (espesor del tejido).

Estas imágenes que permitieron evaluar la presencia de normalidad o no de las estructuras típicas del nicho limbar en los cuatro cuadrantes.

5.4.5.1. Evaluación de la córnea central

En las imágenes tomadas de la córnea central se valoró la presencia de fenotipo celular epitelial: corneal, conjuntival o mixto, según se define en tabla 3.^{10,84,116,117}

Y así, las imágenes confocales permitieron una evaluación objetiva de la presencia de SIL en la visita 1 y de la eficacia de las terapias de restauración a los 6 y 12 meses (Tabla 3).

5.4.5.2. Evaluación del nicho limbar

En las imágenes tomadas de cada uno de los 4 cuadrantes (nasal, inferior, temporal, superior), se evaluó la presencia de las siguientes estructuras y el porcentaje de casos en que estaban presentes, sin pretender una cuantificación más exhaustiva:

- **Crestas de empalizada:** estructuras lineares hiperreflectivas con un espacio acelular interno y rodeadas por células hiperreflectivas pequeñas.^{90,118}
- **Criptas limbares:** columnas de células epiteliales ocupando el espacio entre las crestas de empalizada.⁶¹ Estas estructuras, junto a las crestas de empalizada conforman las **empalizadas de Vogt**.
- **Proyecciones estromales focales:** estructuras ovaladas-circulares que se encuentran cercanas a la terminación de las empalizadas de Vogt rodeadas por células hiperreflectivas.^{61,118}
- **Zonas de células claras y oscuras:** Regiones de unión entre grupos de células epiteliales conjuntivales (claras) y corneales (oscuras).⁹⁰
- **Células inflamatorias:** células hiperreflectantes pequeñas, generalmente en grupos y poco definidas.^{116,117,119-124}

- **Células caliciformes:** células reflectantes de tamaño mediano, ovaladas, aisladas y bien definidas.^{84,116,117,121,122,124}
- **Neovasos:** estructuras lineales con forma tubular, definidos ocasionalmente con signos de circulación vascular y frecuentemente con bordes hiperreflectantes.^{116,117,121}
- **Área de fibrosis:** zona poco definida de hiperreflectividad donde no pueden valorarse otras estructuras.^{73,125}
- **Quiste conjuntival:** estructuras circulares reflectantes en el borde y no reflectantes en el interior.^{116,121,123}
- **Metaplasia escamosa:** células epiteliales con núcleo de pequeño tamaño; ^{117,126} otros autores lo identifican como células de citoplasma oscuro y núcleo y bordes brillantes.¹²⁷
- **Células de Langerhans:** partículas hiperreflectantes morfológicamente similares a células dendríticas en capas basales de las empalizadas.^{128,129}

El análisis se ha basado en el trabajo realizado previamente en nuestro grupo de investigación,¹³ y en un trabajo fin de máster realizado en el curso académico 2009-2010 por Darío Victoria titulado “Microscopía confocal in vivo del limbo esclero-corneal sano y afectado por el síndrome de insuficiencia límbica”.

De las 5 zonas examinadas en cada ojo (una de córnea central y 4 de limbares), se seleccionaron las imágenes más representativas y de mejor calidad a juicio del investigador (Inmaculada Pérez), eligiendo 6-12 fotografías de MCIV, intentando excluir imágenes borrosas o no tangenciales. Sin embargo, en algunos casos se incluyeron para el análisis imágenes del limbo parcialmente oblicuas, debido a la imposibilidad de obtenerlas tangenciales, dada la gran dificultad técnica del procedimiento de captura en pacientes poco colaboradores.

5.4.5.3. Colaboración del paciente en la MCIV

Debido a que la naturaleza de la prueba de MCIV exige colaboración del paciente se estableció una clasificación para determinar dicha cooperación y averiguar si ello afectaba a los resultados finales. Este baremo es subjetivo y depende directamente del personal que realiza la prueba que en este trabajo, ha sido siempre la

Tesis doctoral: "Estudio mediante microscopía confocal del nicho limbar en pacientes con síndrome de insuficiencia límica sometidos a trasplante de células madre"

misma persona. En el análisis estadístico se realizaron evaluaciones de dos visitas simultáneamente, comprobando si mejoraba, empeoraba o no se modificaba la colaboración de los pacientes. (Tabla 4)

Tabla 4. Clasificación para evaluar el grado de colaboración del paciente al realizar a la microscopia confocal in vivo

Grado	Significado
0	Nula. No colabora ni en posición ni en tolerancia a la prueba
1	Mínima. Trata de mantener la posición ocular con mucho esfuerzo y pobres resultados
2	Media. Colabora en el posicionamiento ocular con molestias mínimas y tolera la mayor parte de la exploración
3	Máxima. Colabora en el posicionamiento ocular completamente y tolera bien la duración y molestias de la toma de imagen

5.4.6. Valoración final

Todos los parámetros evaluados en la visita inicial así como en los 6 y 12 meses después del trasplante y las escalas asociadas se muestran en la Tabla 3.

5.4.6.1. Definición de éxito o fracaso del trasplante celular

Los objetivos primarios establecidos fueron los siguientes:

1. Mejora en cualquiera de los tres cuestionarios clínicos.
2. Mejora (de al menos un punto), en al menos dos de los tres parámetros clínicos siguientes: hiperemia conjuntival, opacidad corneal epitelial central o queratitis punteada superficial.
3. Ausencia completa de defectos epiteliales persistentes.
4. Mejoría en el fenotipo corneal epitelial central evaluado por MCIV: si se partía de fenotipo conjuntival, habría de mejorarse a uno corneal o al menos a uno mixto; y si se partía ya de un fenotipo mixto, habría de obtenerse uno corneal.

Los objetivos secundarios incluyeron:

1. Mejora de la visión de una línea o más.
2. Mejora de al menos un grado en los neovasos superficiales de la córnea periférica (área / longitud).

El resultado final, a los 6 y/o 12 meses, fue considerado **éxito global** cuando se logró un éxito completo o un éxito parcial. Un éxito completo se obtenía cuando se conseguían los cuatro objetivos primarios; y un éxito parcial suponía el logro de dos de los cuatro resultados primarios o uno primario y uno secundario. El **fracaso** se ratificó cuando sólo se cumplía uno o ninguno de los resultados primarios.¹⁰

5.4.6.2. Definición de éxito o fracaso en la reconstrucción del nicho limbar

Con respecto al estudio de la zona limbar, se consideró **éxito** a la aparición de algún cambio positivo, evaluado mediante MCIV, sobre la visita basal. Conscientes de la importancia que tendría observar el más mínimo aspecto de la reconstrucción tras la aplicación de células madre, se decidió ser relativamente laxos en este aspecto y, simplemente, valorar como éxito cualquier signo que supusiera una mejora sobre la situación basal en cualquiera de los parámetros referidos en el punto 7.4.5.2.

Se consideró **fracaso** cuando no se observó ningún cambio positivo. En los casos en los que se observase algún cambio, se realizaría una correlación estadística con los hallazgos clínicos y de MCIV encontrados en córnea central.

5.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado por la Unidad de Estadística del IOBA, (Dra. Itziar Fernández), quien estimó que, dado que se trataba de una prueba de concepto, con una muestra de 10 trasplantes por grupo se obtendría una potencia estadística del 80% para contrastar la hipótesis de no inferioridad del grupo experimental respecto del grupo control. Para realizar los cálculos se asumió una tasa de éxito del 80% en cada grupo y un margen de no inferioridad del 25% a un nivel de significación del 0,05.

Cada una de las variables cuantitativas fue resumida como media \pm desviaciones típica (DT), y las variables cualitativas se describieron como porcentajes junto con sus intervalos de confianza del 95%. (IC 95%) La mediana y rango

intercuartílico (RIC) se utilizaron para resumir las distribuciones de variables ordinales. La hipótesis de normalidad fue verificada utilizando el contraste de Shapiro-Wilk.

Para contrastar diferencias entre medias de dos grupos independientes se utilizó el contraste t de Student para dos muestras independientes o su alternativa no paramétrica, el contraste U de Mann-Whitney, si la hipótesis de normalidad no fue válida. La hipótesis de homogeneidad de la varianza fue evaluada utilizando el contraste de Levene. Las relaciones entre las dos variables cualitativas fueron evaluadas a partir del análisis de tablas de contingencia, utilizando, siempre que fue posible, el contraste chi-cuadrado, o en su defecto, en aquellas tablas con frecuencias esperadas pequeñas, al contraste exacto de Fisher. La diferencia de medias a lo largo del tiempo fue analizada utilizando el análisis de la varianza (ANOVA) con medidas repetidas con un factor intra-sujeto. La hipótesis de esfericidad requerida en este análisis fue verificada mediante el contraste de esfericidad de Mauchly. Cuando fue posible asumir esfericidad, se utilizó la corrección de Greenhouse-Geisser. Cuando la hipótesis global de igualdad de medias fue rechazada, se evaluaron las diferencias dos a dos utilizando la corrección de Bonferroni para resolver el problema de las comparaciones múltiples. En algunos casos, donde no fue posible asumir la hipótesis de normalidad, se utilizó el contraste de Friedman, como alternativa no paramétrica del ANOVA con medidas repetidas. Para las comparaciones dos a dos, se contrastó la hipótesis de simetría para las medidas repetidas, a partir del contraste de Wilcoxon-Nemenyi-McDonald-Thompson.

Por último, se evaluó el número de meses hasta el fracaso del trasplante. Se estimó la función de supervivencia a partir del estimador de Kaplan-Meier. Además, se utilizó el contraste *log-rank* para comparar las curvas de supervivencia de cada tipo de trasplante.

Todo el análisis estadístico se realizó utilizando el software estadístico R versión 3.1.3 (Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria).

Resultados

6. Resultados

Tal y como se ha comentado en la metodología, se analizaron, en primer lugar, los resultados correspondientes al ensayo clínico en sí para contestar a la primera parte de la hipótesis de trabajo. Posteriormente, se hizo un análisis exhaustivo del nicho limbar para demostrar la segunda parte de la hipótesis y comprobar, por ello si el resultado de éxito o fracaso del trasplante celular modificaba de alguna manera la morfología del nicho limbar de células madre epiteliales corneales.

6.1. Resultados del ensayo clínico

6.1.1. Características de la muestra del ensayo

Inicialmente se reclutaron 27 pacientes caucásicos (36 ojos, 42 trasplantes potenciales), entre el 22 de marzo y el 13 de diciembre de 2013. De ellos, 5 pacientes (10 ojos) que habían sido aleatorizados para CLET, cancelaron la cirugía debido a diferentes razones personales o logísticas. Por lo tanto, el número final de cirugías de trasplante fue de 37 (26 ojos de 22 pacientes). De ellos, 16 casos fueron aleatorizados a CLET y 21 a MSCT.

Del total de estos 37 trasplantes realizados, 9 casos (24,3%, IC 95%: 12,4-41,6) no alcanzaron los 6 meses de seguimiento obligatorio y, por ello no se consideraron para una evaluación posterior (Tabla 5). Entre estos 9 casos, había 5 CLET y 4 MSCT (6 ojos, 5 pacientes). Dos de esos 5 pacientes abandonaron el ensayo de mutuo acuerdo con los investigadores. Los tres pacientes restantes (4 ojos) tuvieron re-trasplantes evaluables posteriormente. La diferencia entre CLET (31,3%) y MSCT (19,1%) no evaluables no fue significativa ($p=0,6381$).

Tabla 5. Características de los 9 trasplantes (6 ojos, 5 pacientes) que no llegaron a la primera evaluación establecida de los 6 meses.

Nº de trasplantes perdidos/ Ojo/nº paciente	Tipo de trasplante	Enfermedad de base	Tiempo transcurrido desde la cirugía hasta la pérdida del trasplante	Causa de fracaso. Observaciones	Resultado final*
1/OD/5	MSCT	Custicación bilateral	Menos de 1 día	Injerto inexistente en el día 1 post-trasplante. Sutura y la lente de contacto en su lugar. (El paciente refirió posteriormente que los injertos de membrana amniótica recibidos en el pasado también se habían disuelto inmediatamente	Re-trasplantado (No. 2)
2/OD/5	MSCT				Re-trasplantado (No. 3)
3/OD/5	MSCT				Re-trasplantado (No. 4)
4/OD/5	CLET				El paciente abandona el ensayo
5/OD/10	CLET	Síndrome de Stevens-Johnson	2 días	Injerto semi-adherido en el día 1 tras la cirugía y recuperado de fórnices inferiores en el día 2. Las suturas estaban en su lugar. Las lentes de contacto se caían continuamente	Re-trasplantado (CLET-8 en OD; MSCT-6 en OI)
6/OI/10	CLET				
7/OI/14	CLET	Aniridia congénita	2 días	Injerto desprendido. Todos los puntos estaban flojos; Sólo uno sostenía el injerto, que estaba doblado bajo el párpado superior. Lente de contacto en su lugar	Re-trasplantado (MSCT-10)
8/OD/15	MSCT	Queratitis herpética unilateral (defecto epitelial persistente)	2 meses	Recidiva herpética intensa y perforación corneal posterior	Retirado al mes 2, por queratoplastia penetrante tectónica
9/OI/19	CLET	Causticación unilateral	2 días	Injerto parcialmente desprendido	Re-trasplantado (MSCT-13)

Ver anexo 8 para cada caso individual.

OD: ojo derecho; OI: ojo izquierdo; CLET: trasplante del epitelio limbar cultivado; MSCT: trasplante de células madre mesenquimales.

Finalmente, el número de trasplantes plenamente evaluables en el período mínimo establecido de 6 meses fue de 28 (23 ojos de 20 pacientes), un 75,7 % del total de trasplantes realizados. De ellos, 11 trasplantes (9 ojos, 9 pacientes) fueron CLET y 17 (16 ojos, 14 pacientes) fueron MSCT.

Los pacientes con trasplantes evaluables tuvieron una edad media de $49,3 \pm 10,8$ años (rango, 28-77 años). Las mujeres comprendían el 42,9% (IC 95%: 25-62,2) y los varones el 57,15 (IC 95%: 37,4-75) ($p=0,253$) (Tabla 6). La asignación de pacientes a los grupos CLET o MSCT fue estadísticamente independiente de la edad o el sexo.

Tres de los 20 pacientes (nº7, 10 y 21) (Anexo 8) tenían cada uno de sus dos ojos asignados a cada uno de los dos grupos, es decir, un ojo recibió CLET y el otro ojo recibió MSCT.

De los 28 trasplantes, 5 (17,9%, IC 95%, 6,8-37,6) se evaluaron a los 6 meses pero no a los 12 meses, ya que hubieron de ser retirados antes de llegar a los 12 meses por los siguientes motivos. Uno de ellos (MSCT-2) fue retirado del ensayo debido a una recaída grave de la enfermedad ocular de base, queratoconjuntivitis atópica, coincidiendo con un importante brote de la enfermedad sistémica de la que forma parte, dermatitis atópica, lo que provocó el fracaso del trasplante y también empeoró considerablemente su ojo contralateral. Los otros 4 casos (2 MSCT fracasados, 1 CLET fracasado y 1 CLET con éxito parcial) fueron retransplantados para mejorar su situación.

De los 28 trasplantes que pudieron ser evaluados completamente, cuatro fueron un segundo trasplante. De los 20 pacientes completamente evaluables (23 ojos, 28 trasplantes), cuatro tuvieron trasplantes en ambos ojos, tres de ellos tenían CLET en un ojo y MSCT en el otro ojo, y un paciente tenía MSCT en ambos ojos. Dos de ellos recibieron dos trasplantes en cada ojo, aunque uno de esos pacientes (nº 8) perdió sus primeros trasplantes bilaterales dentro de las 48h después de la cirugía (Tabla 5).

Los tres grupos etiológicos causantes de SIL, así como su severidad y extensión, fueron distribuidos equitativamente entre los grupos CLET y MSCT. En consecuencia, la diferente naturaleza y severidad de la enfermedad de fondo no tuvo influencia en los resultados. Las quemaduras químicas (Grupo 1) fueron la etiología más frecuente (57,1%), seguidas por las enfermedades inmunológicas del Grupo 2 (25%) y las etiologías no inflamatorias del Grupo 3 (17,9%).

De los 20 pacientes plenamente evaluables, 12 (60%, IC 95%: 36,4-80,0) tenían enfermedad bilateral: 6 pacientes tenían causticaciones (Grupo 1), 2 estaban diagnosticados de síndrome de Steven-Johnson, 2 presentaban queratonconjuntivitis atópica, 1 tenía enfermedad de injerto contra huésped (todos ellos pertenecientes al grupo 2) y 1 tenía aniridia congénita (Grupo 3). Cuatro de estos 12 casos bilaterales recibieron trasplantes en ambos ojos. Un paciente, CLET-10, había perdido ya uno de sus ojos y tenía una prótesis cosmética. Los 7 pacientes restantes solo tenían baja visión en su ojo contralateral.

De los 8 pacientes con enfermedad unilateral, incluidos 5 casos de quemadura química, tres eran ciegos o tenían sólo baja visión en el ojo contralateral debido a patologías oculares no relacionadas (Anexo 8).

6.1.2. Complicaciones. Efectos adversos

No hubo complicaciones intra- o post-operatorias en ningún caso, excepto las comentadas en los 9 pacientes que no lograron completar el seguimiento mínimo. Hubo tres acontecimientos adversos graves y 21 eventos adversos no graves, incluyendo 10 que fueron leves y 11 que fueron de moderados a severos (Tabla 6). Ninguno de ellos resultó relacionado con el tipo de trasplante celular recibido. La mayoría se debió a la activación o recurrencia de la enfermedad basal, y algunos fueron atribuibles a la inmunosupresión concomitante.

En lo que se refiere al tratamiento inmunomodulador sistémico, se hizo correctamente en todos los casos y, de hecho, no se detectaron casos de rechazo inmunológico. Se prescribió micofenolato mofetil en 12 casos (3 CLET, 9 MSCT), ciclosporina A en 6 casos (2 CLET, 4 MSCT) y azatioprina en 7 casos (4 CLET, 3 MSCT). Tres pacientes tenían dos drogas inmunosupresoras concomitantemente, pues estaban ya con dicho tratamiento debido a su enfermedad basal: CLET-10 sufría enfermedad de injerto contra huésped y tenía micofenolato y azatioprina; MSCT-2 y CLET-2 recibían ciclosporina y azatioprina debido a dermatitis atópica severa y a un trasplante cardíaco, respectivamente.

Los fármacos inmunomoduladores fueron bien tolerados en general y no hubo que retirar la inmunosupresión en ningún caso. El micofenolato mofetil se redujo de 2

Tesis doctoral: "Estudio mediante microscopía confocal del nicho limbar en pacientes con síndrome de insuficiencia límica sometidos a trasplante de células madre"

g/día a 1,5 ó 1 g/día en 3 casos debido a astenia. La ciclosporina A también se redujo de 5 a 3 mg/kg/día en 2 casos debido a una leve elevación de la presión arterial.

Tabla 6. Acontecimientos o eventos adversos graves y no graves encontrados en todos los trasplantes celulares realizados (N=37), incluyendo 9 trasplantes que no alcanzaron el mínimo establecido, 6 meses de seguimiento (5 CLET y 4 MSCT) 11 CLET y 17 MSCT)*.

EVENTO	CLET (N = 16)			MSCT (N = 21)		
	No. de eventos (%) / Trasplante-Paciente No. / Enfermedad de base / Inmunosupresores	Relación con la medicación del estudio (trasplante celular) / gravedad / relación atribuible	Resultado final / Comentarios	Número de eventos (%) * /Trasplante- Paciente No. / Enfermedad de base / Inmunosupresores	Relación con la medicación del estudio (trasplante celular) / Severidad / Relación atribuible	Resultado final
Acontecimientos adversos serios						
Queratitis herpética				1 (2,7) / 8-15 / Úlcera corneal persistente por queratitis por herpes simple / Micofenolato mofetil	Sin relación / Moderada / Recurrencia de la enfermedad basal, facilitada por trauma quirúrgico y/o inmunosupresión	Resuelto con secuela / Trasplante de córnea tectónico (perforación inminente)
Perforación corneal				1 (2,7) / 2-6 / Queratoconjuntivitis atópica secundaria a dermatitis atópica grave / Ciclosporina + azatioprina	Sin relación / Severo / Intensa recaída de la enfermedad basal, ya mal controlada sistémicamente	Resuelto con secuela / Trasplante de córnea tectónico
Neoplasia de la superficie ocular	1 (2,7) / 2-2 / Moderada / Úlcera corneal persistente secundaria a la neoplasia persistente y los tratamientos requeridos / Ciclosporina + Azatioprina	Sin relación / Moderada / Recurrencia de la enfermedad basal con el mismo patrón que antes del trasplante celular (paciente inmunosuprimida a largo plazo debido a trasplante cardíaco previo)	Resuelto (cirugía excisional) sin secuelas / La acción del trasplante celular no se interrumpió ya que el defecto epitelial persistente cicatrizó			

EVENTO	CLET (N = 16)			MSCT (N = 21)		
	No. de eventos (%) / Trasplante-Paciente No. / Enfermedad de base / Inmunosupresores	Relación con la medicación del estudio (trasplante celular) / gravedad / relación atribuible	Resultado final / Comentarios	Número de eventos (%) * / Trasplante- Paciente No. / Enfermedad de base / Inmunosupresores	Relación con la medicación del estudio (trasplante celular) / Severidad / Relación atribuible	Resultado final
Acontecimientos adversos no serios†						
Pérdida del trasplante dentro de las 24 hr tras la cirugía (no valorable ni en la primera evaluación)	1 (2,7) / 4-5 / Causticación / Micofenolato mofetil	Sin relación / Severo/enfermedad basal? (mismo destino para todos los injertos de membranas amnióticas anteriores)	No resuelto sin secuelas / No se tomaron más medidas; paciente retirado del ensayo	3 (8,1) / 1,2,3-5 / Severa / Causticación / Micofenolato mofetil	Sin relación / Severo/enfermedad basal? (mismo destino para todos los injertos de membranas amnióticas anteriores)	No resuelto sin secuelas / No se tomaron más medidas; paciente retirado del ensayo
Pérdida del trasplante dentro de las 48h tras la cirugía	4 (10,8) / 4, 6-14; 7-14; 9-19 / Grave / Stevens-Johnson (Nº 5, 6); Aniridia congénita (Nº 7); Lesión química (Nº 9) / Ciclosporina (Nº 5, 6); Azatioprina (Nº 7); Micofenolato mofetil (Nº 9)	Sin relación / Severo/Desplazamiento de la lente de contacto	Resuelto sin secuelas (todos fueron re-trasplantados con éxito)			
Erosión corneal				2 (5,4) / 14-20 / Moderado / Síndrome de Stevens-Johnson / Micofenolato mofetil	Sin relación / Leve / Leves / Triquiasis y distiquiasis rozando córnea, debido a enfermedad subyacente	Resuelto sin secuelas / Eliminación permanente de las pestañas
Episodio gripal				1 (2,7) / 10-14 / Moderado / Aniridia congénita / Azatioprina	Sin relación / Leve / Paciente no había sido vacunado	Resuelto sin secuelas / sin efecto en el trasplante

* CLET, trasplante de epitelio limbar cultivado; MSCT, trasplante de células madre mesenquimales.

† Los eventos adversos no graves que se muestran son aquellos que fueron moderados o severos. Los restantes eventos adversos no graves fueron leves, fácilmente solucionados y todos se consideraron no relacionados con el trasplante celular: náuseas, vómitos, faringitis, esguince maleolar e intervención de la prótesis cosmética existente en el ojo contralateral. Tres pacientes se quejaron de astenia leve y su micofenolato mofetil se redujo a 1,5 g/día en un paciente y a 1 mg/kg en 2 pacientes más. Dos pacientes presentaron una elevación leve transitoria de la presión arterial que se controló mediante la reducción de la dosis de ciclosporina de 5 a 3 mg/kg/día.

6.1.3. Evaluación final del ensayo: objetivos primarios y secundarios

El resumen de todos los hallazgos se encuentra en la Tabla 7 y su detalles en el Anexo

8.

Tabla7. Características, evaluaciones y resultado final de los 28 casos evaluables (23 ojos de 20 pacientes) con insuficiencia limbar aleatorizados al grupo de trasplante de epitelio limbar cultivado (CLET) o de células madre mesenquimales (MSCT).

Características/ Evaluación	CLET (N = 11)	MSCT (N = 17)	p-valor*
Mujeres/hombres – N (%); intervalo de confianza (IC) 95%	3 (27,3); 7,3 - 60,7/ 8 (72,7); 39,1 - 92,7	9 (52,9); 28,5 - 76,1/ 8 (47,1); 23,9 - 71,5	0,253
Edad – años (media±DE)	52,4±10,5	47,2±10,8	0,3448
Síndrome de insuficiencia limbar			
Grado: Total/ Severo – N (%),IC 95%	11 (100) /0 (0)	13 (76,5); 49,8 - 92,2/ 4 (23,5); 7,8 - 50,2	0,1324
Etiología – N (%); 95% IC			
Grupo 1: Causticaciones –16 (57,1)	7 (63,6); 31,6-87,6	9 (52,9); 28,5 - 76,1	0,8669
Grupo 2: Enfermedades Inflamatorias de base inmunológica – 7 (25,0)	2 (18,2); 3,2 - 52,3	5 (29,4); 11,4 - 56	0,8232
Grupo 3: Enfermedades no Inflamatorias, otras– 5 (17,9)	2 (18,2); 3,2 - 52,3	3 (17,7); 4,7 - 44,2	1
Meses desde el inicio de la enfermedad hasta el trasplante – media±DT	181,8±219,2	108,9±77,8	0,9437
Días desde el trasplante hasta la reabsorción de la membrana amniótica – media±DE	36,1±27,9	27,6±21	0,1634
Evaluación final: Objetivos primarios			
Visita de inicio / 6 meses / 12 meses			
Cuestionarios de síntomas / Calidad de vida * (rango)– media±DT			
Single item dry eye questionnaire SIDEQ (0-28)	15,7±6,1/ 14,3±5,8/ 14,4±4,1	18,7±6,5/ 16,4±5,4/ 14,2±5,7 p=0.0237 y p=0.0336 entre la visita de inicio y 6 ó 12 meses	0,2379/ 0,3408/ 0,9178
Ocular Surface Disease Index OSDI (0-100; severo>32)	78,8±15,1/ 68,2±20,7/ 75,4±19,8 p=0,0318 y p=0,0072 entre la visita de inicio y 6 ó 12 meses	71,2±22,5/ 66,5±21,8/ 68,9±24	0,4795/ 0,8352/ 0,4306
National Eye Institute 25-item visual Function Questionnaire NEI-VFQ25 (0-100)	48,9±7/ 49,4±8,8/ 47,1±8,6	42,5±8/ 42,7±9,9/ 42,4±9,8	0,0239 / 0,0774/ 0,2524
Signos clínicos (rango) – mediana (rango intercuartil [IQR])			
Enrojecimiento conjuntival (0-4)	2 (1)/ 2(1)/ 1 (0) p=0,0012 entre la visita de inicio y 12 meses	2 (2)/ 2(1)/ 1 (0) p<0,0001 entre la visita de inicio y 12 meses	0,6057/ 0,2638/ 0,2438
Opacidad epitelial corneal central (0-4)	3 (1)/ 3 (1)/ 2 (1) p=0,0129 entre la visita de inicio y 12 meses	2 (2)/ 1 (1)/ 1 (0) p=0,0023 entre la visita de inicio y 12 meses	0,1323/ 0,0275 / 0,04
Integridad epitelial corneal: queratitis punteada superficial (0-4)	2 (1)/ 1 (2)/ 0 (1) p=0,0428 y p=0,0012 entre la visita de inicio y 6 ó 12 meses	2 (2)/ 1 (1.25)/ 0.5 (1) p=0,0263 y p=0,0006 entre la visita de inicio y 6 ó 12 meses	0,4693/ 0,7356/ 0,3532
Integridad epitelial corneal: defecto epitelial persistente o ulceración (0-4)	0 (2)/ 0 (0)/ 0 (0)	0 (0)/ 0 (0)/ 0 (0)	0,2558/ 0,3422/ 1
Fenotipo epitelial corneal central (<i>microscopía confocal in vivo</i>) – N (%); IC 95%			
Fenotipo conjuntival 18 (64,3)/ 11 (42,3)/ 7 (30,4)	9 (81,8); 47,8 - 96,8/ 5 (50); 23,7 - 76,3/ 3 (33,3); 9 - 69,1	9 (52,9); 28,5 - 76,1/ 6 (37,5); 16,3 - 64,1/ 4 (28,6); 9,6 - 58	0,2486/ 1/ 0,2486

Características/ Evaluación	CLET (N = 11)	MSCT (N = 17)	p-valor*
Fenotipo mixto 10 (35,7)/ 6 (23,1)/ 5 (21,7)	2 (18,2); 3,2 - 52,3 / 3 (30); 8,1 - 64,6/ 3 (33,3); 9 - 69,1	8 (47,1); 23,9 - 71,5/ 3 (18,8); 5 - 46,3/ 2 (14,3); 2,5 - 43,9	1/ 0,4915/ 0,5735
Fenotipo corneal 0 (0)/ 9 (34,6)/ 11 (47,8)	0 (0); 0 - 32,2/ 2 (20); 3,5 - 55,8/ 3 (33,3); 9 - 69,1	0 (0); 0 a 22,9/ 7 (43,8); 20,8 - 69,5%/ 8 (57,1); 29,7 - 81,2	0,8261/ 0,4152/ 0,854
Evaluación final: Objetivos secundarios Visita de inicio / 6 meses / 12 meses			
Neovascularización corneal: área (0-4) – mediana (IQR)	3 (1)/ 3 (2,5)/ 1 (3) p=0,0129 entre la visita de inicio y 12 meses	3 (2)/ 2 (2)/ 2 (2) p=0,0307 and p=0,0045 entre la visita de inicio y 6 ó 12 meses	0,3197/ 0,594/ 0,8416
Neovascularización corneal: longitud (0-4) – mediana (IQR)	3 (0,5)/ 2 (1,5)/ 1 (2) p=0,0307 and p=0,0044 entre la visita de inicio y 6 ó 12 meses	2 (1)/ 2 (1)/ 1,5 (1) p=0,0055 entre la visita de inicio y 12 meses	0,074/ 0,2271/ 0,7037
Agudeza visual mejor corregida (AVMC): todos los casos – media±DE	0,06±0,11/ 0,09±0,17/ 0,11±0,16	0,06±0,07/ 0,13±0,16/ 0,13±0,14	0,148/ 0,1171/ 0,3668
AVMC: casos exitosos – media±DT	0,08±0,13/ 0,13±0,19/ 0,14±0,18	0,06±0,08/ 0,15±0,18/ 0,14±0,15	0,6837/ 0,4592/ 0,9307
Resultado final: EXITO 6 meses / 12 meses – N (%); IC 95%	8 (72,7); 39,3 - 92,7/ 7 (77,8); 40,2 - 96,1	13 (76,5); 49,8 - 92,2/ 12 (85,7); 56,2 - 97,5	0,8232/ 0,6241

*Entre los grupos CLET y MSCT. Los p-valores significativos se resaltan en negrita. Sólo los p-valores significativos se muestran en las columnas 2ª (CLET) y 3ª (MSCT).

Como se explicó en la metodología, los objetivos primarios en la evaluación final a los 6 y 12 meses eran 1) mejoría en al menos uno de los tres cuestionarios clínicos; 2) mejoría en un paso en al menos dos de los tres signos clínicos; 3) ausencia completa de defectos epiteliales persistentes; y 4) mejoría en el epitelio corneal central. Además, los objetivos secundarios fueron definidos como 1) mejoría visual de una línea o más y 2) mejoría, de al menos una unidad, en la neovascularización superficial.

6.1.3.1. Síntomas y signos clínicos

Respecto a los cuestionarios clínicos, en el SIDEQ no se apreciaron cambios en la visita basal y en las de los 6 y 12 meses en CLET. Si hubo mejoría significativa entre el valor basal y la mejoría observada a los 6 y 12 meses en MSCT. Lo contrario ocurrió con el OSDI, no mejorando en MSCT pero sí en CLET. Respecto al cuestionario de calidad de vida NEI-VFQ25, éste no mostró cambios. No hubo diferencias inter-grupo en ninguno de los cuestionarios clínicos (Tabla 7)

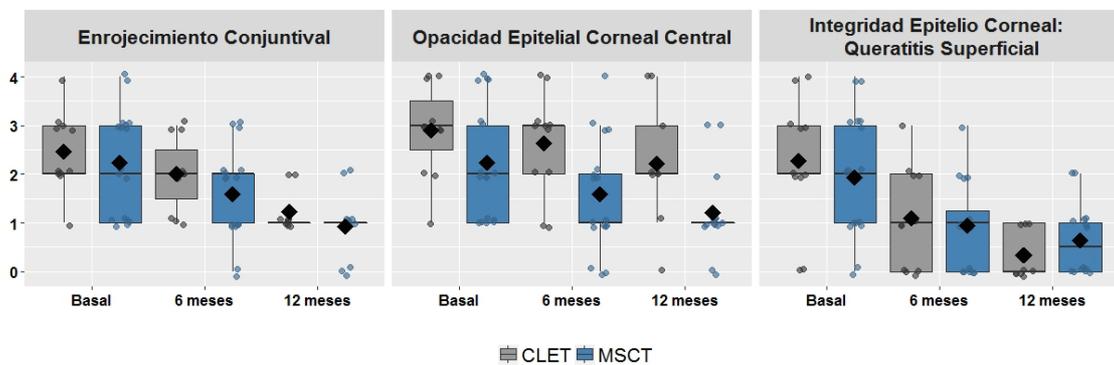
En cuanto a los signos clínicos evaluados con lámpara de hendidura, estos de detallan en la Tabla 7 (e individualmente en Anexo 8), así como en la Figura 37.

Se apreció una mejoría significativa en el enrojecimiento conjuntival entre el grado basal y el presente a los 12 meses en ambos grupo, sin diferencias inter-grupo.

En cuanto al grado de opacidad corneal central superficial se apreció una mejoría a los 12 meses en ambos grupo, siendo ligeramente mejor para el grupo MSCT a los 6 y 12 meses.

En cuanto al grado de queratitis punteada superficial la mejoría ya fue evidente a los 6 meses y se mantuvo significativa a los 12 meses, sin diferencias inter-grupo.

Figura 37. Signos clínicos evaluados en la lámpara de hendidura que constituyen tres de los cuatro objetivos primarios de evaluación del éxito/fracaso de los trasplantes de epitelio limbar cultivado (CLET, N=11) y de células madre mesenquimales (MSCT, N=17).



Las cajas se extienden entre el percentiles 25 y 75; las barras horizontales representan la mediana y las verticales se extienden 1,5 veces la longitud del rango intercuartil por encima y debajo de los percentiles 75 y 25, respectivamente. La media de cada grupo se muestra mediante un rombo negro y los valores individuales de cada caso mediante círculos.

Por otro lado, en lo que se refiere a los defectos epiteliales persistentes, había 5 casos que lo presentaron en el grupo CLET y 4 en el grupo MSCT; y entre los 6 y 12 meses, todos se resolvieron (Tabla 7, Anexo 8).

Como se esperaba, no hubo cambios significativos en la agudeza visual (aunque se observó una tendencia a la mejoría en los valores medios (Tabla 6) pues, como ya se ha explicado, las causas para que estos pacientes hayan perdido visión van más allá del problema de superficie epitelial, que es el que primariamente se pretende reconstruir con estos trasplantes (Tabla 7).

Por último, en lo que se refiere a la neovascularización corneal superficial, típica de la mayoría de los SIL, se observó un descenso significativo en la extensión y en la longitud en ambos grupos, sin diferencias inter-grupo (Tabla 7).

6.1.3.2. Fenotipo epitelial en la córnea central

Esta evaluación es el criterio más objetivo, y por ello el más importante, en la definición de éxito total del trasplante, que requería que el fenotipo epitelial de la córnea de ojos trasplantados debía haber mejorado por lo menos un paso hacia el fenotipo epitelial corneal normal. El resumen de estos resultados se encuentra en la Tabla 7 (e individualizados en el Anexo 8) y en la Figura 38.

Al inicio, no hubo diferencias significativas en la distribución del fenotipo conjuntival o epitelial mixto en la córnea central (prueba exacta de Fisher, $p=0,226$). En consecuencia, el resultado de cada tipo de trasplante celular no pudo ser influenciado por una presencia más frecuente de un fenotipo más favorable antes de la terapia celular en ninguno de los tres grupos etiológicos.

El cambio en el fenotipo epitelial en la córnea central no fue significativamente diferente entre CLET y MSCT a los 6 meses ($p=0,524$) o los 12 meses ($p=0,5562$).

Después de 6 meses, el 50% de los casos CLET (IC 95%: 23,7-6,3) y 62,5% de los casos de MSCT (IC 95%: 35,9-83,7) había mejorado el fenotipo epitelial en la córnea central.

A los 12 meses después de la cirugía, el 66,7% de CLET (IC 95%: 30,9-91) y 71,4% de MSCT (IC 95%: 42-90,4) habían mejorado el fenotipo epitelial en la córnea central.

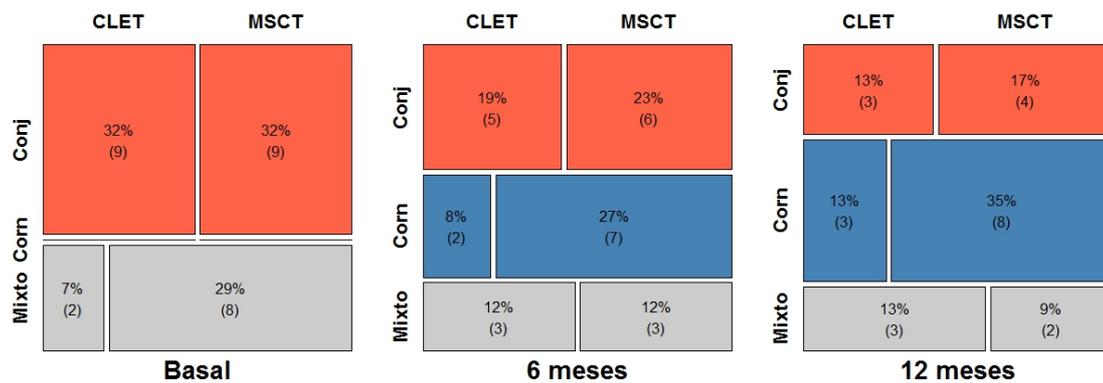
Las diferencias entre CLET y MSCT no fueron significativas ($p=0,6891$ y $p=1,000$) a los 6 y 12 meses respectivamente.

Para el grupo CLET, el fenotipo epitelial corneal estuvo presente en el 20,0% (IC 95%: 3,5-55,8) y 33,3% (IC 95%: 9-69,1) de los trasplantes a los 6 y 12 meses, respectivamente (las diferencias no fueron significativas).

Para el grupo MSCT, si se observaron diferencias significativas. Y así, el fenotipo epitelial corneal estuvo presente en el 43,8% (IC 95%: 20,8-69,5) y en el 57,1% (IC 95%: 29,7-81,2) de los casos a los 6 meses ($p=0,0469$) y a los 12 meses ($p=0,0234$) meses, respectivamente.

El porcentaje de casos que alcanzaron un fenotipo epitelial corneal, sin embargo, no fue significativamente diferente entre CLET y MSCT ni a los 6 meses ($p=0,4152$) ni a los 12 meses ($p=0,854$).

Figura 38. Distribución de fenotipos epiteliales posibles (corneal, conjuntival y mixto) en la córnea central, evaluados mediante microscopía confocal *in vivo*, en la visita de inclusión o basal, a los 6 y a los 12 meses tras el trasplante de epitelio limbar cultivado (CLET) o de células mesenquimales (MSCT).



Cada mosaico muestra el porcentaje (número de casos) de cada posible fenotipo epitelial en la córnea central en ambos grupos. Los mosaicos representan tablas de contingencia como matriz de rectángulos, cuyas dimensiones son proporcionales a las frecuencias observadas en cada clasificación. Los casos de fenotipo conjuntival (Conj), corneal (Corn) o mixto se dividieron en proporciones relativas para cada tipo de trasplante, CLET y MSCT. El fenotipo conjuntival disminuyó mientras que el corneal aumentó en los tiempos sucesivos.

6.1.3.3. Resultado definitivo de éxito o fracaso del trasplante celular

Como se explicó en metodología, se consideraron como éxito global aquellos trasplantes que presentaron éxito completo o parcial. Un éxito completo significaba que las 4 variables primarias mejoraban: síntomas, signos y el fenotipo epitelial en córnea central. Éxito parcial era aquel trasplante que logró mejorar al menos dos variables primarias o una de ellas más una secundaria.

El éxito global de todos los trasplantes celulares después de 12 meses fue del 82,6% (19 de 23), 15 éxitos completos y 4 éxitos parciales.

El éxito global de todos los trasplantes celulares después de 6 meses fue del 75% (21 de 28 casos), existiendo 13 éxitos completos y 8 éxitos parciales.

Cinco trasplantes fueron evaluados sólo hasta el mes 6 (4 casos re-trasplantados, un caso retirado del ensayo), lo que explica la diferencia de porcentajes. A excepción de CLET-2 y MSCT-15, que pasaron de éxitos parciales a los 6 meses a éxitos completos a los 12 meses, el destino final de todos los trasplantes ya estaba establecido a los 6 meses.

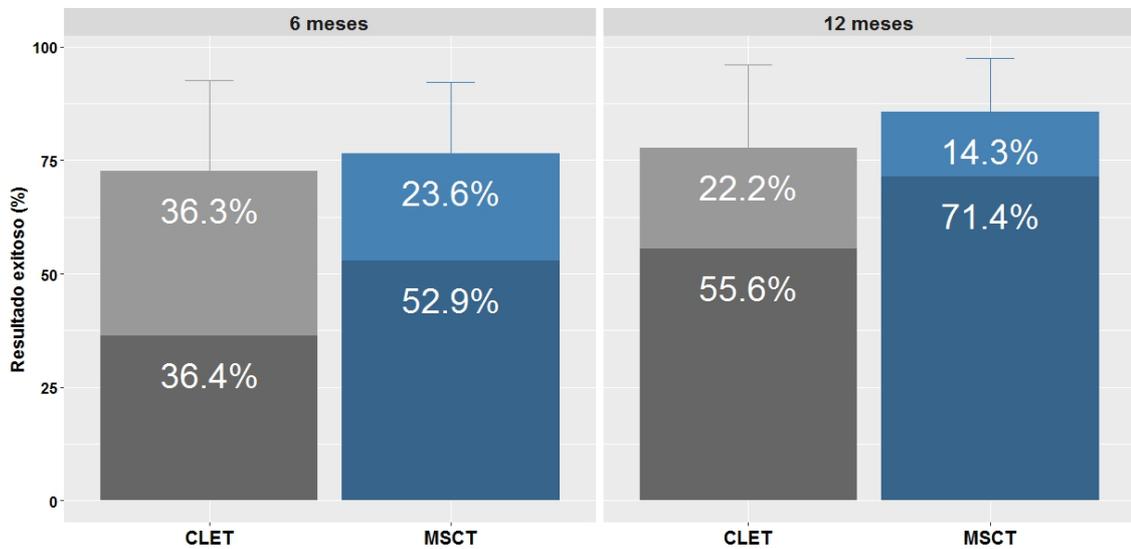
Todos los fracasos fueron en los ojos con lesiones químicas (Grupo etiológico 1, 4 de 7, 57,1%) o enfermedades inflamatorias mediadas por el sistema inmune (Grupo 2, 3 de 7, 42,9%). Ninguno de los cinco casos de enfermedad no inflamatoria (Grupo 3) fracasó.

Entre los trasplantes del Grupo 1, el 75% tuvo éxito; dos de los casos fallidos fueron CLET, y dos fueron MSCT.

Del mismo modo, el 25% de todos los trasplantes celulares fueron en pacientes con enfermedades inmunológicas (Grupo 2) y de ellos, el 57,1% fueron exitosos (2 MSCT en el mismo paciente y un CLET fracasaron).

El porcentaje de casos exitosos a los 6 y 12 meses fue ligeramente superior para el grupo de MSCT (76,5% y 85,7% respectivamente) que para CLET (72,7% y 77,8% respectivamente), pero las diferencias inter-grupo no fueron estadísticamente significativas (Tabla 7, Figura 39).

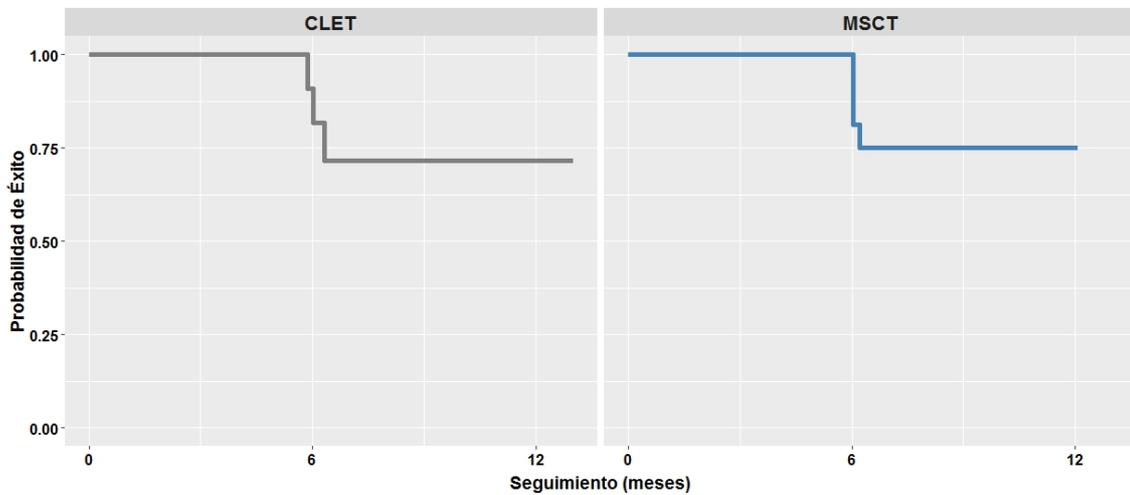
Figura 39. Resultado final evaluado como éxito global, diferenciado entre éxito completo y parcial, tanto a los 6 como a los 12 meses tras trasplante de epitelio limbar cultivado (CLET) como de células madre mesenquimales (MSCT).



Los éxitos completos se representan con los colores más oscuros y los parciales con los colores más claros. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes porcentajes en ninguno de los dos puntos de evolución final para cada uno de los dos tipos de trasplante.

Por último, el análisis de la probabilidad de éxito de un trasplante celular mediante la curva de supervivencia de Kaplan-Meier mostró lo siguiente. Tras CLET, la probabilidad de supervivencia fue de 0,818 (CI 95%: 0,6191-1,00) a los 6 meses y de 0,716 (CI 95%: 0,488-1,00) a los 12 meses. La probabilidad de supervivencia para un MSCT fue de 0,812 (CI 95%: 0.642-1.00) a los 6 meses y de 0,75 (CI 95%: 0,565-0,995) a los 12 meses. Las diferencias entre la supervivencia de CLET y MSCT no fueron significativas ni a los 6 meses ni a los 12 meses (prueba log-rank, $p=0,817$) (Figura 40).

Figura 40. Probabilidad de éxito o fracaso de un trasplante celular de limbo cultivado (CLET) o de células mesenquimales (MSCT), evaluada mediante el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier.



Así, los resultados finales fueron estadísticamente independientes del tipo de trasplante, confirmando la primera parte de la hipótesis de trabajo que establecía que los nuevos trasplantes MSCT eran igual de eficaces que los más conocidos de tipo CLET y, además, igual de seguros, como ya se ha demostrado en el apartado de efectos adversos.

Por último, estos resultados finales se ilustran con dos ejemplos que recibieron cada uno de los dos tipos de trasplante celular, uno en cada uno de sus dos ojos. (Figuras 41 y 42).

Figura 41. Paciente N°10 que recibió un trasplante del epitelio limbar cultivado (CLET) en su ojo derecho y uno de células mesenquimales (MSCT) en su ojo izquierdo. Análisis con MCIV de la zona central corneal del ojo derecho.

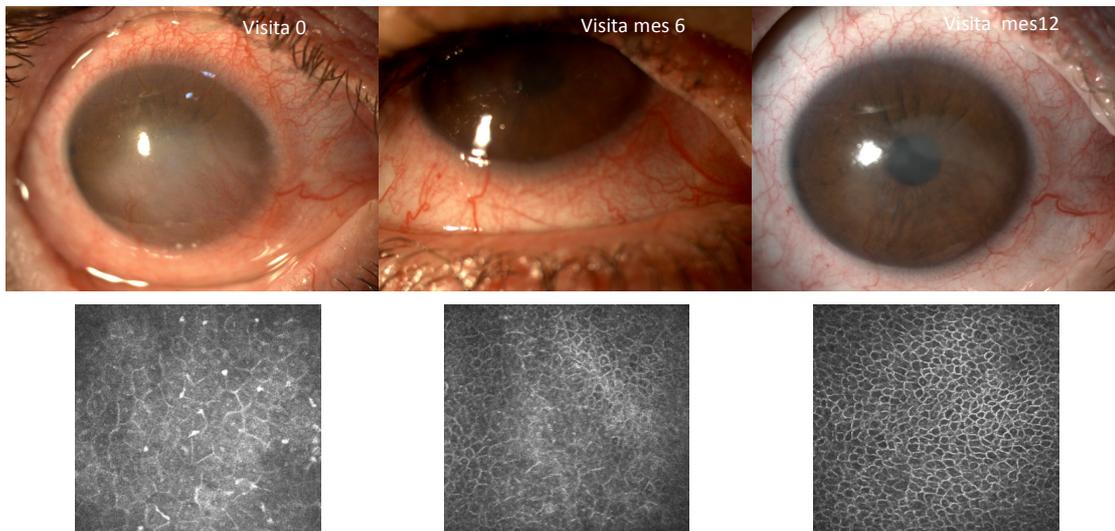


Figura 42. Paciente N°10 que recibió un trasplante del limbo cultivado (CLET) en su ojo derecho y uno de células mesenquimales (MSCT) en su ojo izquierdo. Análisis con MCIV de la zona central corneal del ojo izquierdo.



Paciente mujer de 44 años que muestra un fallo corneal bilateral debido a la deficiencia de células madre límbicas causada por un síndrome de Stevens-Johnson de 20 años de duración (perteneciente al grupo etiológico 2: enfermedades inflamatorias inmunológicas). La opacidad se limita a la córnea anterior (epitelio y estroma anterior) y existe catarata (no se aprecia en esta fotografía) y por lo tanto el pronóstico visual y el potencial de recuperación visual (ver tabla en anexo 8) asignado a ambos ojos fue un grado 2. Se necesitarán 2 procedimientos quirúrgicos: trasplante de células y extracción de cataratas en este caso. Antes de entrar en este ensayo, fue tratada agresivamente por su severa sequedad y una intensa enfermedad palpebral durante varios meses. Perdió sus primeros trasplantes bilaterales prematuramente (48h después de la cirugía) debido a un ajuste inadecuado de la lente de contacto. Tuvo un segundo trasplante de células bilaterales, manteniendo sus párpados cerrados, y fue seguida diariamente durante 10 días sólo abriendo los párpados para administrar colirios y por lo tanto los trasplantes se mantuvieron en su lugar. Las imágenes de MCIV del epitelio corneal basal muestran un fenotipo epitelial mixto antes de la cirugía (visita inicio) y

corneal a los 6 meses y 12 meses. La agudeza visual en el ojo derecho fue 0,25 en la visita inicial y mejoró a 0,32 a los 6 y 12 meses. La paciente no deseaba someterse a ninguna otra cirugía ya que era capaz de continuar con su vida y debido al riesgo de provocar una recaída inflamatoria no se alentaron nuevas intervenciones.

6.2. Resultados de la evaluación del nicho limbar

El nicho limbar se evaluó en los 4 cuadrantes (inferior, nasal, superior y temporal), en tres tiempos (visita inicial y en los dos tiempos de evaluación final, 6 y 12 meses) y valorando la presencia o ausencia de los parámetros detallados en la metodología.

6.2.1. Análisis de la colaboración del paciente

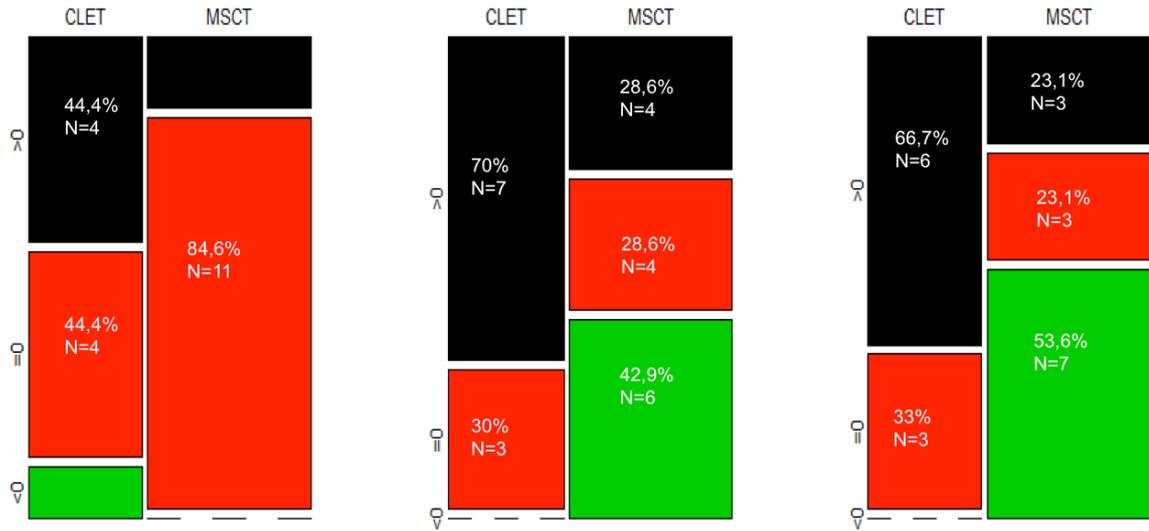
Para descartar que el grado de colaboración en la MICV del paciente pudiera influir en los resultados, ésta se cuantificó, como ya se ha explicado en metodología. Aunque ya se han reportado anteriormente los resultados de MCIV para la córnea central, es realmente en el análisis del limbo donde más se ponía a prueba la colaboración del paciente, ya que duraba más tiempo y requería que dirigiera la mirada a diferentes posiciones.

Como se aprecia en la Figura 43 no se encontraron diferencias entre los grupos de tratamiento ni entre las visitas con respecto a la colaboración del paciente durante la MCIV.

La valoración realizada permite establecer que cuando se comparó la colaboración de los pacientes entre las visitas inicial y la de los 12 meses, ésta mejoró en 7 pacientes del grupo CLET y no empeoró ningún paciente; pero en el caso de MSCT, la colaboración empeoró en 6 pacientes. Cuando esta comparación se realizó entre los 6 y los 12 meses, el grado de colaboración, no empeoró en ningún paciente en CLET y, de hecho, mejoró en 6; en el grupo MSCT, esta colaboración fue peor en 7 pacientes. Sin embargo, ninguna de estas diferencias fueron estadísticamente significativas (Figura 43).

Figura 43. Análisis de la colaboración de los pacientes en ambos grupos de tratamiento, en cada visita.

Colaboración visita 6 meses -inicial Colaboración visita 12 meses-inicial Colaboración visita 12-6 meses



CLET: trasplante de epitelio limbar cultivado/MSCT: trasplante de células madre mesenquimales.

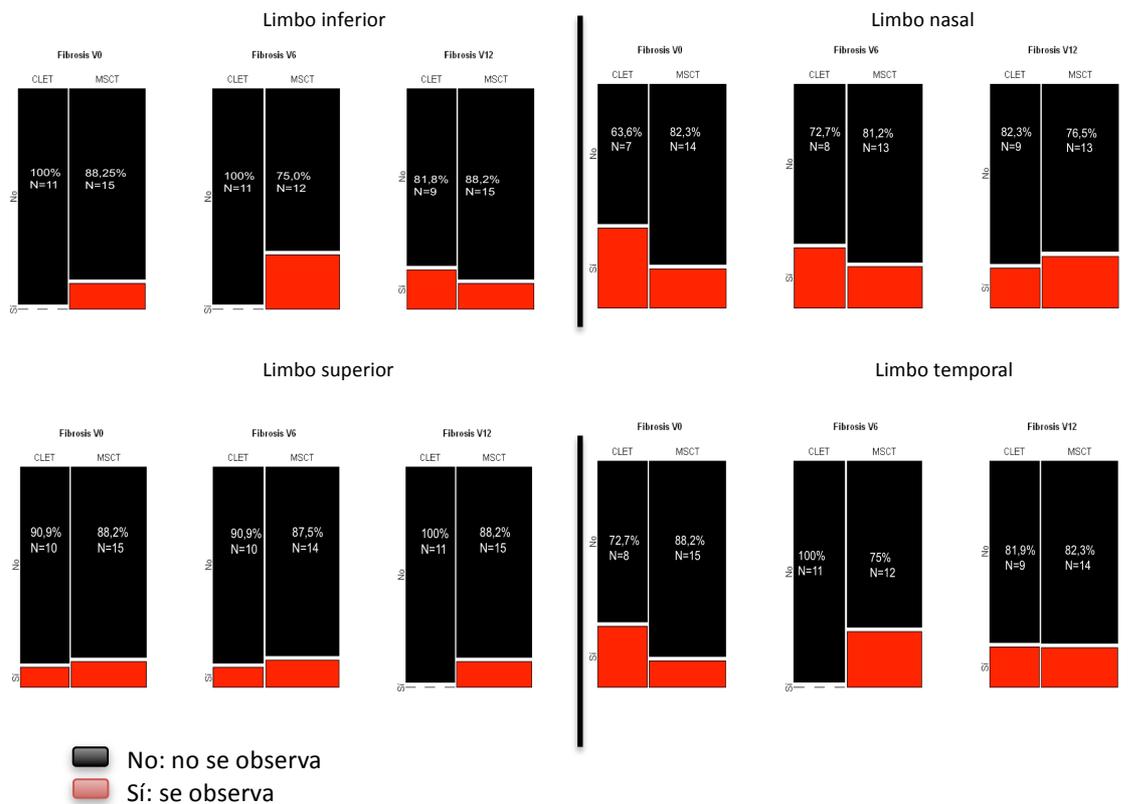
- >0: mejor
- =0: igual
- <0: peor

6.2.2. Evaluación de los diferentes parámetros en el nicho limbar

Área de fibrosis

La distribución de la presencia de fibrosis en cada uno de los cuatro cuadrantes del nicho limbar se encuentra reflejada en la Figura 44.

Figura 44. Presencia de fibrosis en cada uno de los cuatro cuadrantes limbares evaluado por microscopía confocal in vivo. V0: visita inicial; V6: visita 6 meses; V12: visita 12 meses

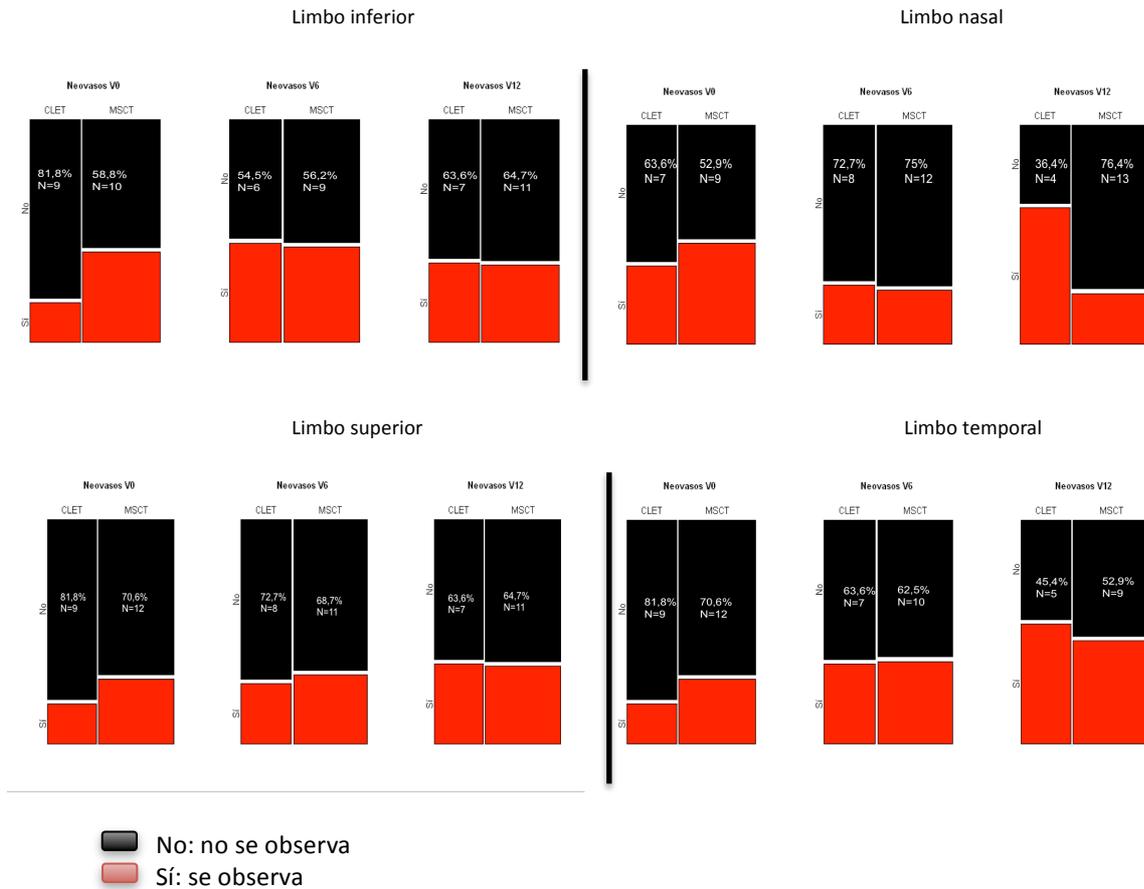


No existieron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, CLET o MSCT, en ninguno de los 4 cuadrantes, en ninguna de las 3 visitas evaluadas.

Neovasos

La información sobre de la presencia de neovasos en cada una de las áreas del nicho limbar está presente en la Figura 45.

Figura 45. Presencia de neovasos en cada uno de los cuatro cuadrantes limbares evaluado por microscopía confocal in vivo. V0: visita inicial; V6: visita 6 meses; V12: visita 12 meses

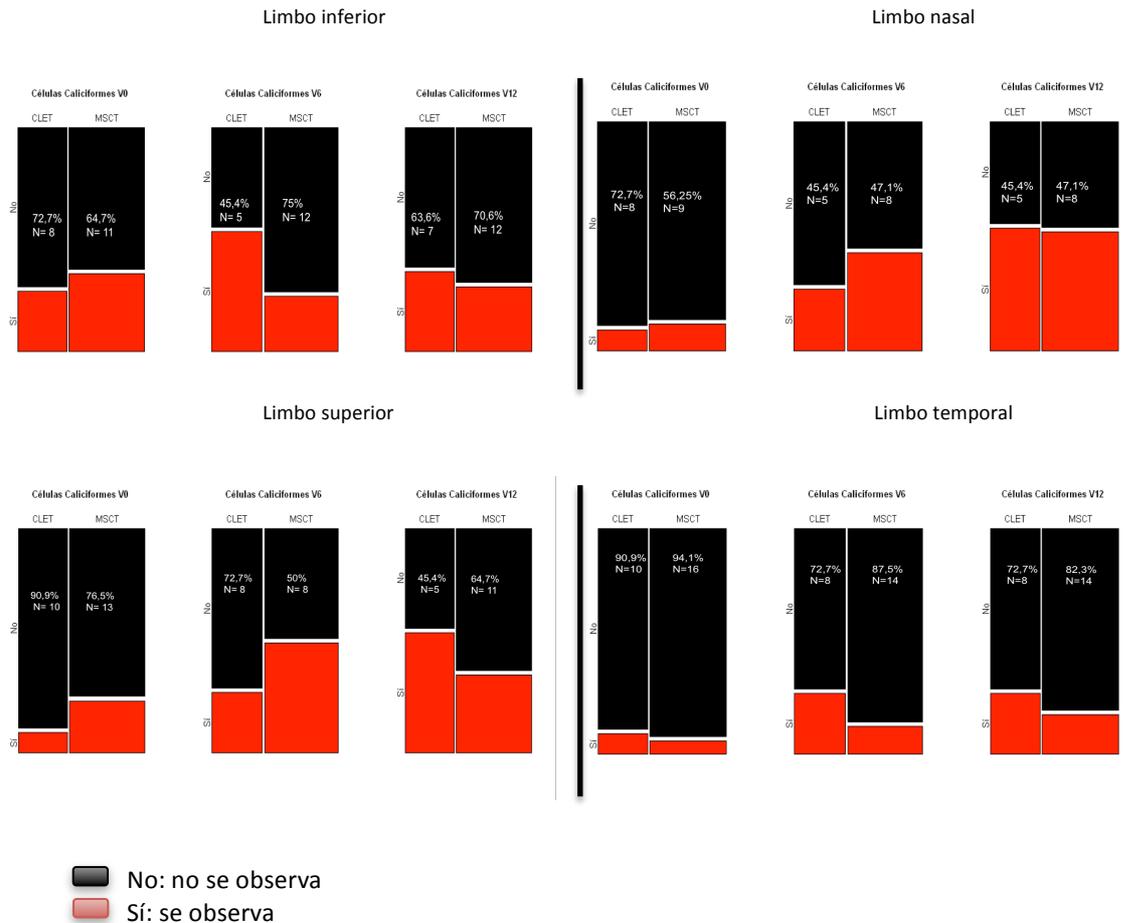


No se hallaron diferencias estadísticamente significativas ni entre los grupos de tratamiento ni entre visitas en ninguna zona limbar.

Células caliciformes

La distribución de las células caliciformes en cada uno de los cuatro cuadrantes del nicho limbar se encuentra reflejada en la Figura 46.

Figura 46. Presencia de células caliciformes en cada uno de los cuatro cuadrantes limbares evaluado por microscopía confocal in vivo. V0: visita inicial; V6: visita 6 meses; V12: visita 12 meses

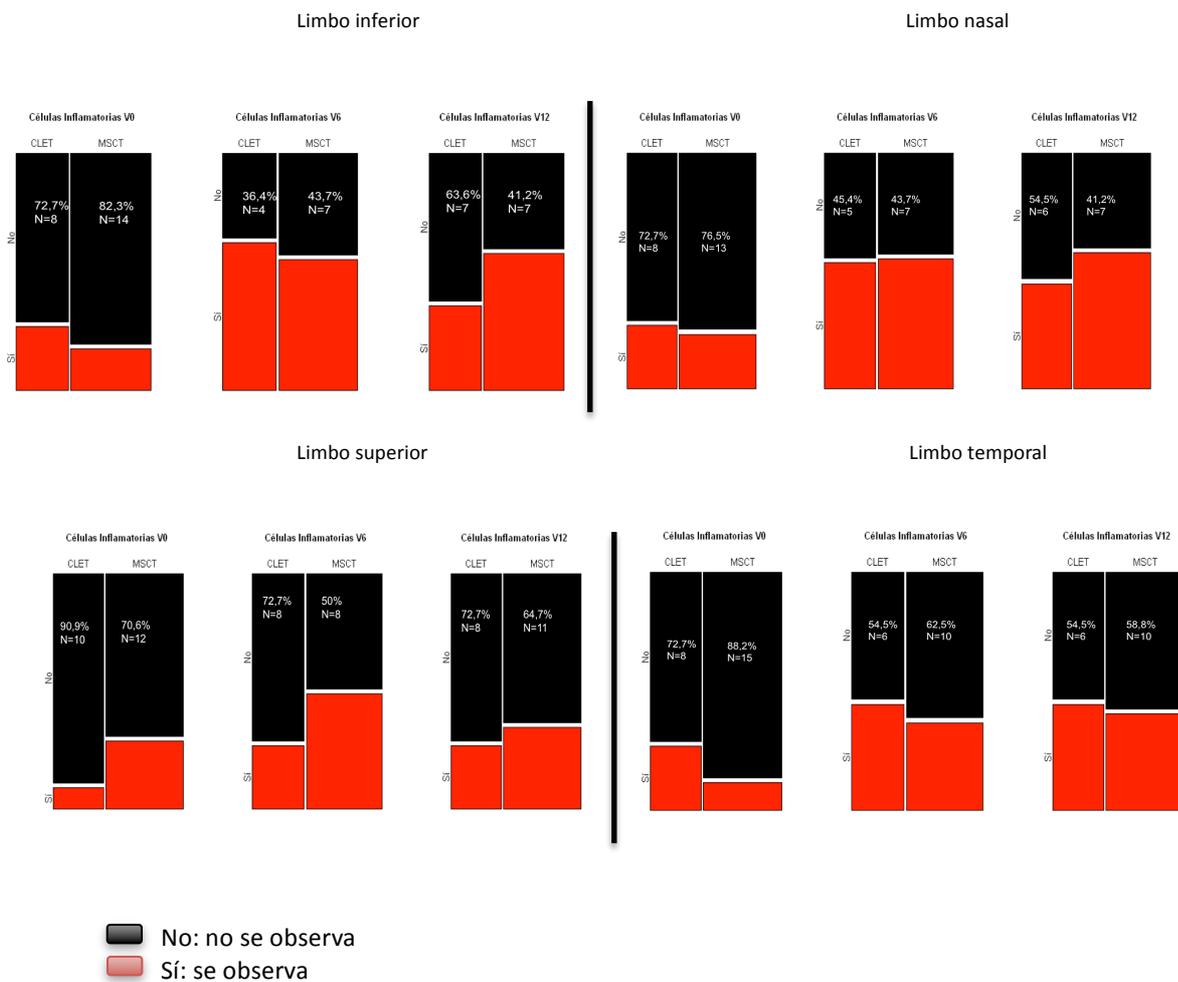


No se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, CLET o MSCT, en ninguno de los 4 cuadrantes, en ninguna de las 3 visitas evaluadas.

Células inflamatorias

La existencia de células inflamatorias en cada una de las zonas de limbo se puede ver en la Figura 47.

Figura 47. Presencia de células inflamatorias en cada uno de los cuatro cuadrantes limbares evaluado por microscopía confocal in vivo. V0: visita inicial; V6: visita 6 meses; V12: visita 12 meses

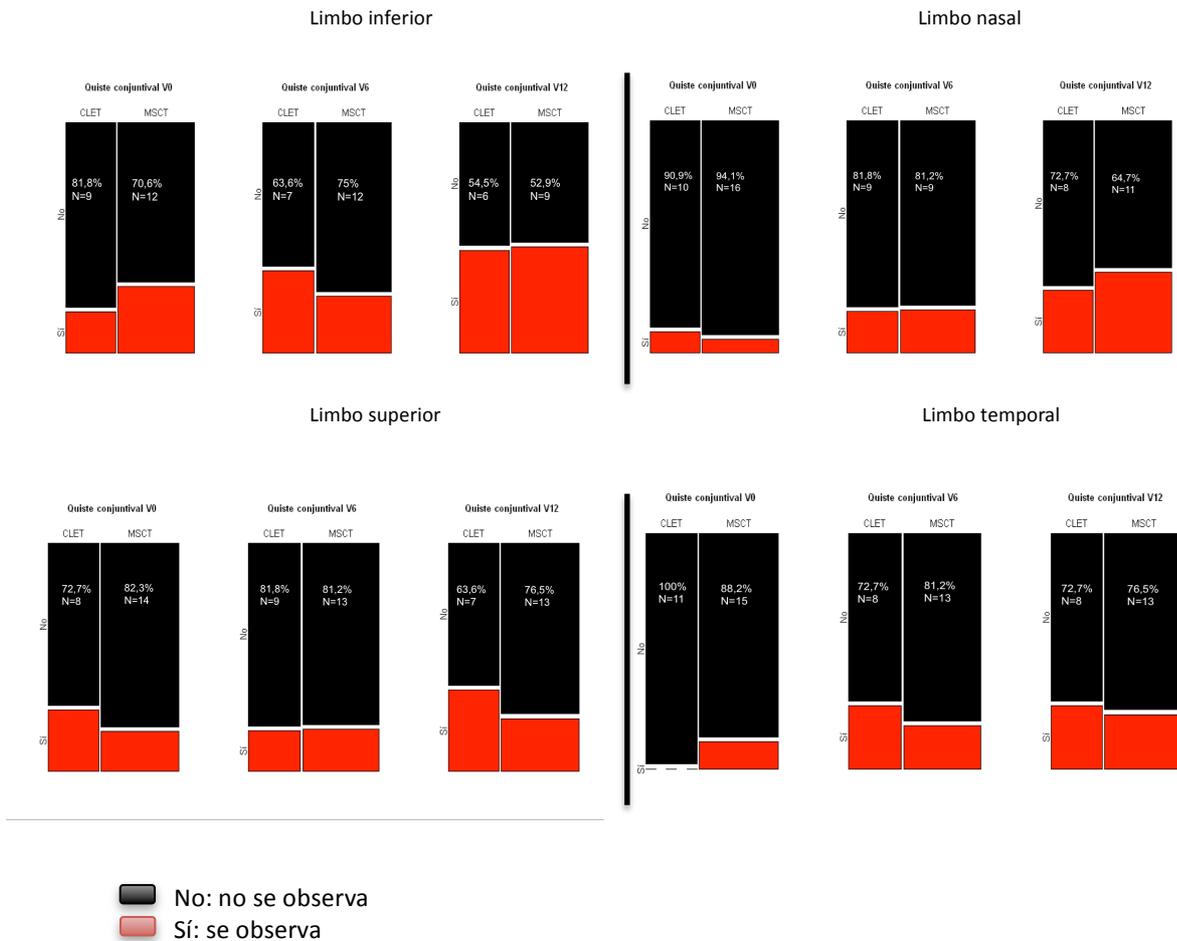


No se valoraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las visitas de ninguno de los grupos de tratamiento en ninguna zona limbar.

Quistes conjuntivales

La distribución de la presencia de los quistes conjuntivales todos los cuadrantes del nicho limbar está valorada en la Figura 48.

Figura 48. Presencia de quistes conjuntivales en cada uno de los cuatro cuadrantes limbares evaluado por microscopía confocal in vivo. V0: visita inicial; V6: visita 6 meses; V12: visita 12 meses

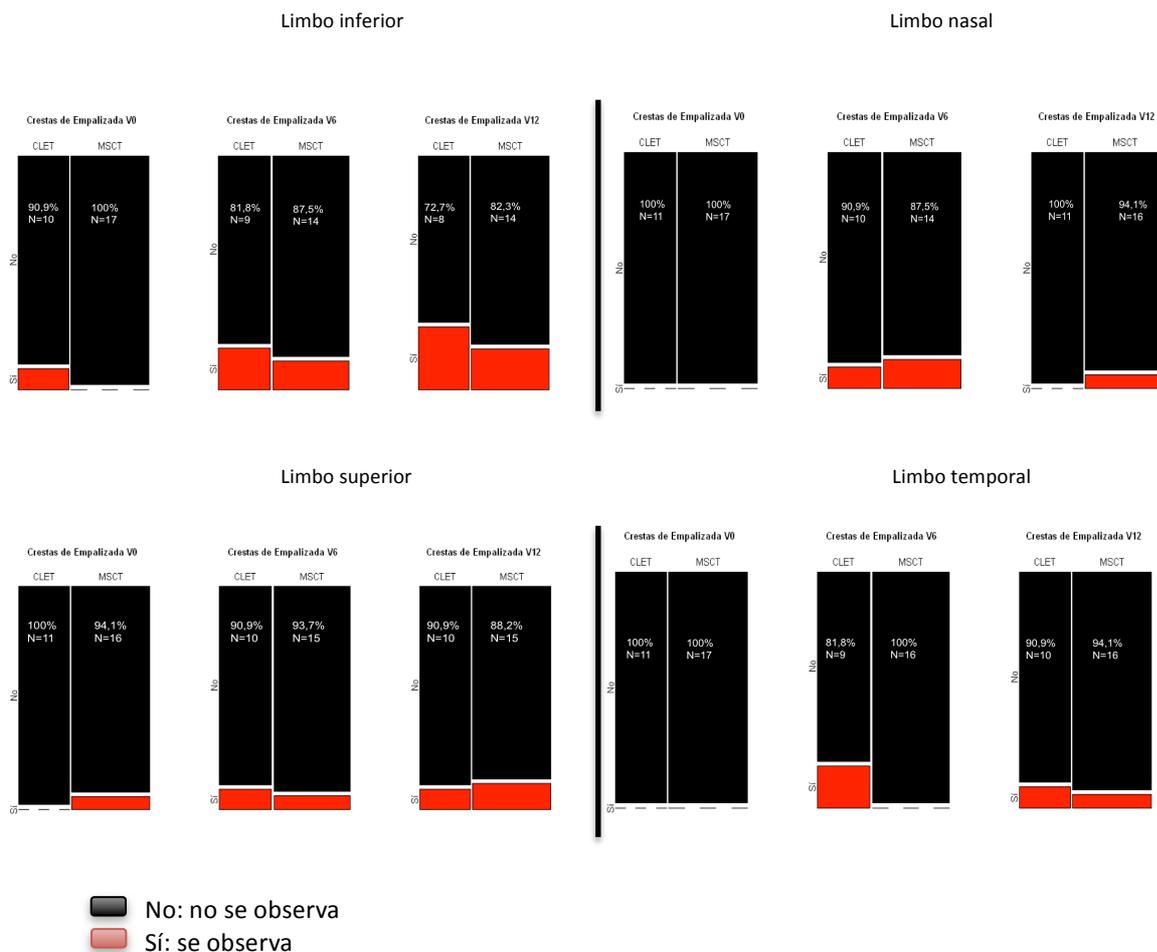


No se encontraron diferencias ni entre grupos de tratamiento ni entre visitas en ninguno de los cuadrantes limbares.

Crestas de empalizada/criptas limbares

La información sobre de la presencia de crestas de empalizada en cada uno de los cuatro cuadrantes del nicho limbar se encuentra reflejada en la Figura 49.

Figura 49. Presencia de crestas de empalizada en cada uno de los cuatro cuadrantes limbares evaluado por microscopía confocal in vivo. V0: visita inicial; V6: visita 6 meses; V12: visita 12 meses



No existieron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, CLET o MSCT, en ninguno de los 4 cuadrantes, en ninguna de las 3 visitas evaluadas.

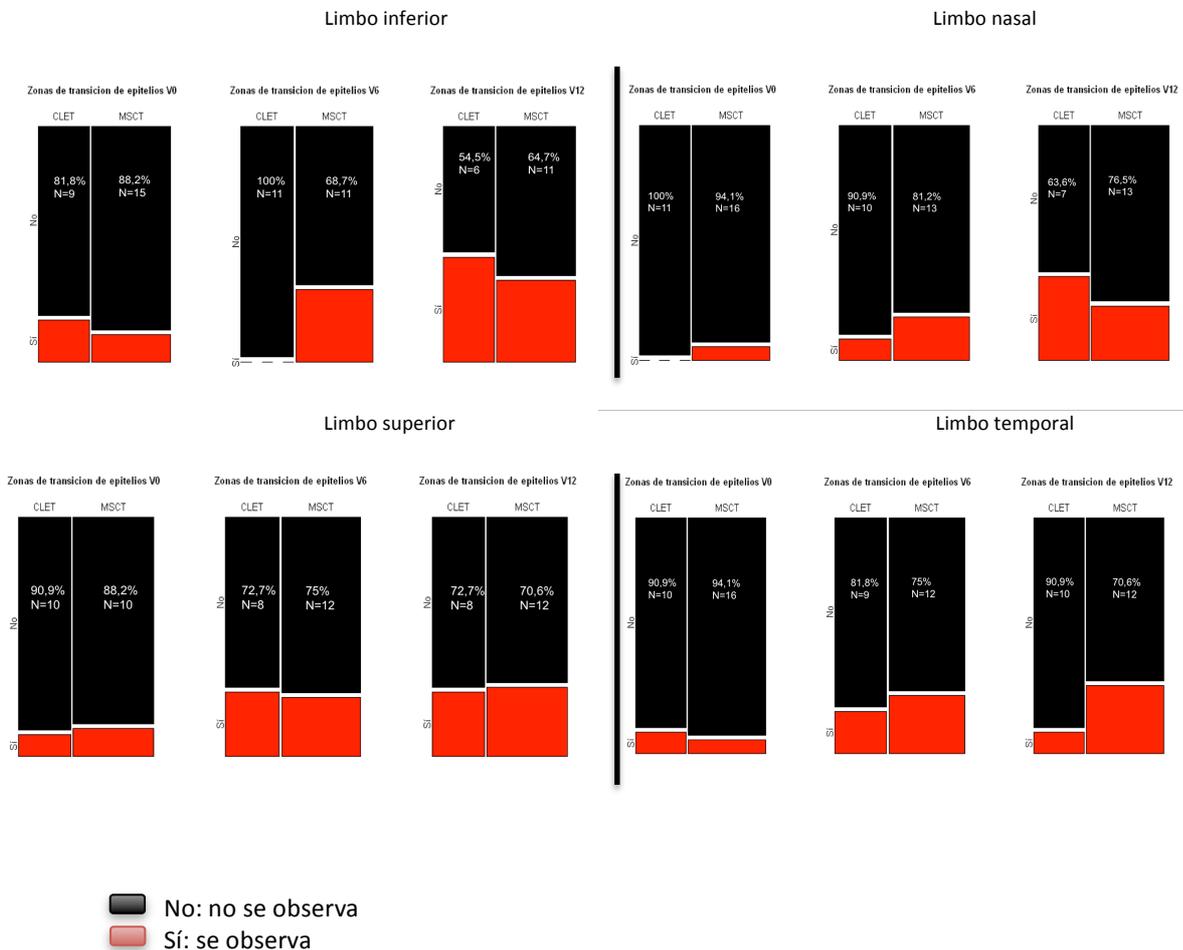
Sin embargo, se puede observar que en el número de pacientes que presenta esta característica varía ligeramente, en uno o en dos pacientes en alguna de las visitas. El cambio más relevante, aunque, no estadísticamente significativo, fue en la zona inferior, donde sí se detectó el aumento de las crestas de empalizada

en tres pacientes que pertenecían al grupo MSCT (Nº 10, 20 y 21) desde la visita de inicio hasta la visita de los 12 meses. La colaboración en estos casos fue buena. Dos de ellos fueron un éxito completo y el tercero un éxito parcial.

Zonas de células claras y oscuras

La distribución de estas zonas de transición de epitelios en cada uno de los cuatro cuadrantes del nicho limbar se puede observar en la Figura 50.

Figura 50. Presencia de zonas de transición de epitelios en cada uno de los cuatro cuadrantes limbares evaluado por microscopía confocal in vivo. V0: visita inicial; V6: visita 6 meses; V12: visita 12 meses



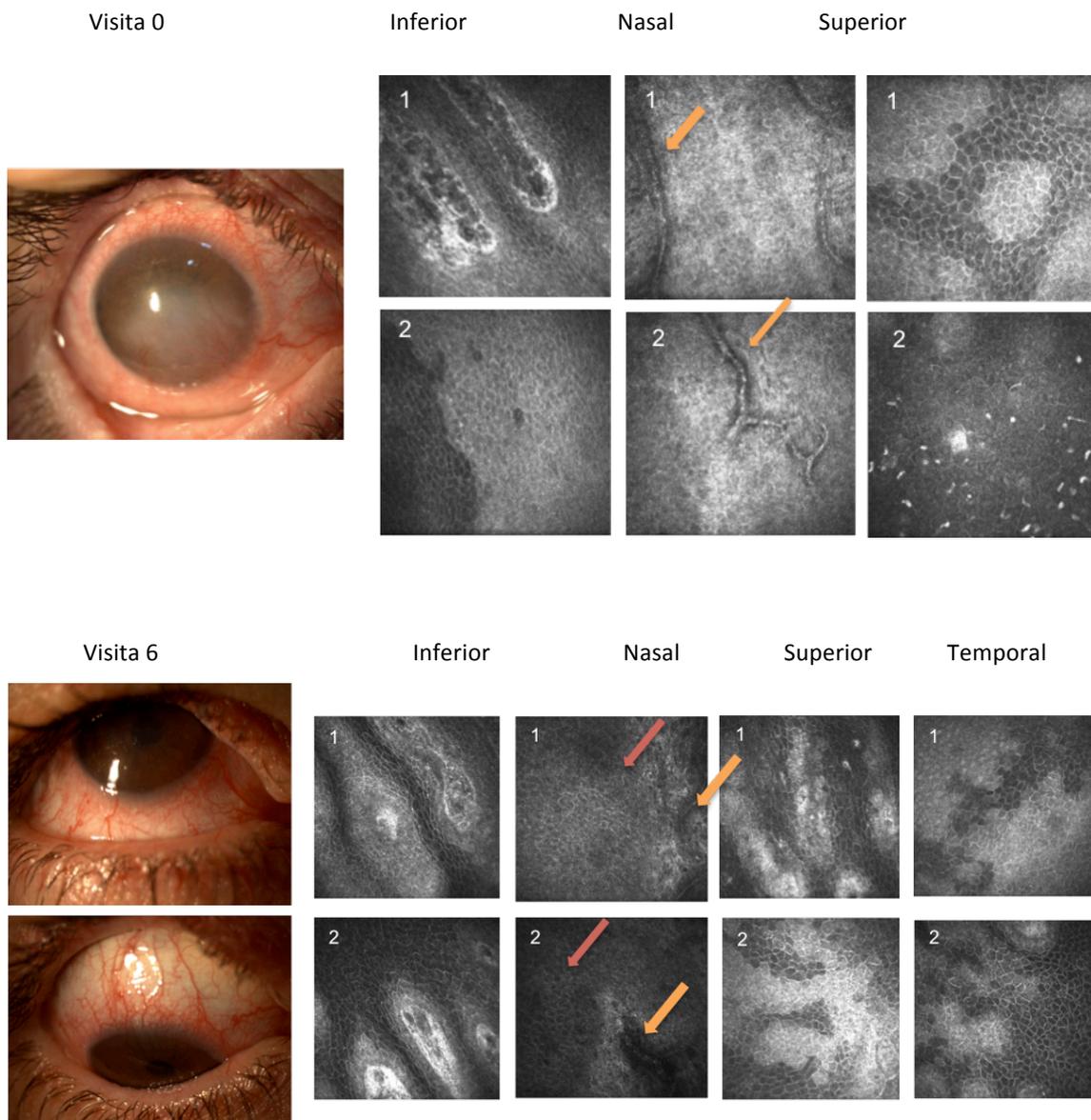
No se hallaron diferencias estadísticamente significativas ni entre grupos de tratamiento ni entre visitas en ninguna zona limbar.

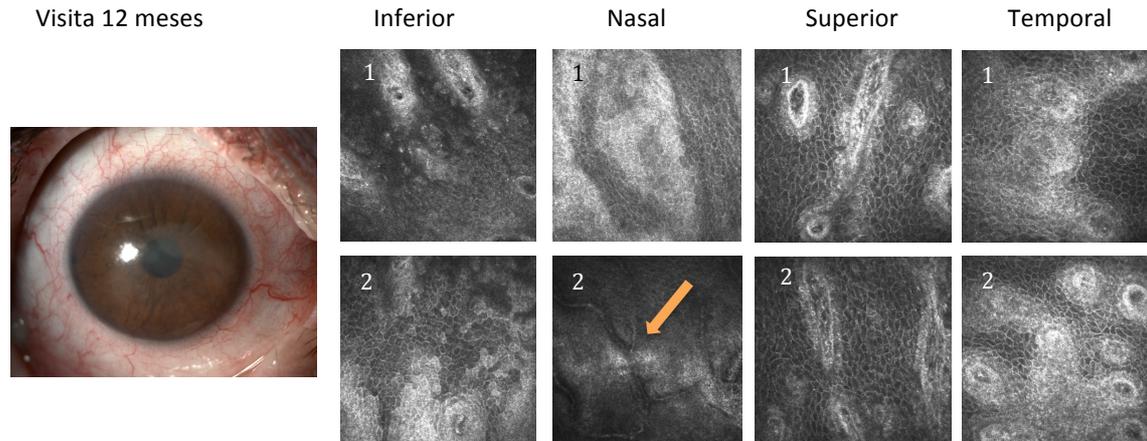
En cuanto a la **metaplasia escamosa** no fue detectada en los cuadrantes inferior y nasal, mientras que dos casos del grupo CLET si la mostraron en la visita basal, uno en el área superior y otro en un cuadrante temporal.

Con respecto a las **células de Langerhans**, que también fueron evaluadas, no se detectaron en ningún caso en la zona inferior. En el área nasal se detectaron en un solo paciente del grupo MSCT en todas las visitas: en el cuadrante superior se observaron en un paciente del grupo MSCT en la visita 6; y en un paciente en el grupo CLET en la visita 12; por último en la zona temporal en ambos grupos se hallaron en un paciente en la visita de los 6 meses.

Por último, estos resultados finales de la zona limbar se ilustran con dos ejemplos que recibieron cada uno de los dos tipos de trasplante celular, uno en cada uno de sus dos ojos. (Figuras 51 y 52).

Figura 51. Paciente N°10 que recibió un trasplante del limbo cultivado (CLET) en su ojo derecho y uno de células mesenquimales (MSCT) en su ojo izquierdo. Análisis con microscopía confocal in vivo (MCIV) de la zona limbar del ojo derecho. El análisis con MCIV de la córnea central y el resto de sus características puede consultarse en las figuras 41 y 42.





Paciente mujer de 44 años (paciente Nº 10) que muestra un fallo corneal bilateral debido a la deficiencia de células madre límbicas causada por un síndrome de Stevens-Johnson de 20 años de duración (perteneciente al grupo etiológico 2: enfermedades inflamatorias inmunológicas). Las imágenes de MCIV de la zona limbar permiten ver en la visita basal (visita 0), crestas de empalizada en la zona inferior y zonas de transición de epitelios en las zonas inferior y superior; en la zona nasal se detectaron neovasos (flecha naranja) y en la zona superior se valoraron lo que parecen células inflamatorias (estructuras redondas hiperfluorescentes); no pudieron obtenerse imágenes de calidad de la zona temporal. En la visita 6 se identificaron de nuevo crestas de empalizada en la zona inferior y lo que parecen restos de crestas de empalizada en zona superior, en las zonas superior y temporal aparecen zonas de transición de epitelios, en la zona nasal se aprecia epitelio corneal (flecha roja) y neovasos (flecha naranja). En la visita 12 se identificaron crestas de empalizada en zonas inferior y superior; en zona temporal aparecen proyecciones estromales; en la zona nasal se aprecia una zona de transición de epitelios y neovasos (flecha naranja). Imágenes de córnea central figuras 41 y 42.

Figura 52. Paciente N°8 que recibió un trasplante de células mesenquimales (MSCT) en su ojo derecho. Análisis con MCIV de la córnea central del ojo derecho.

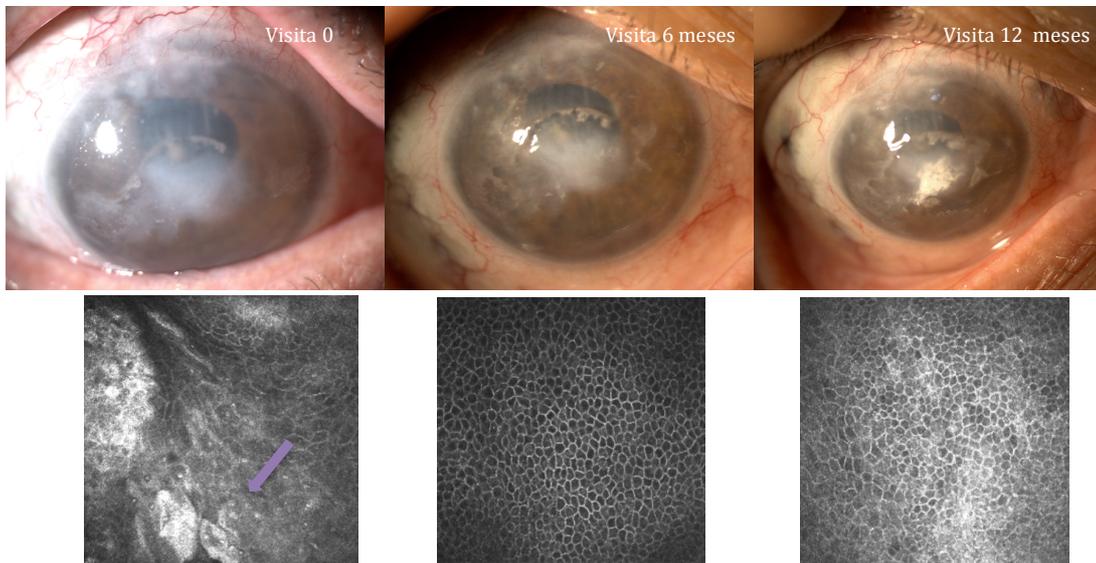
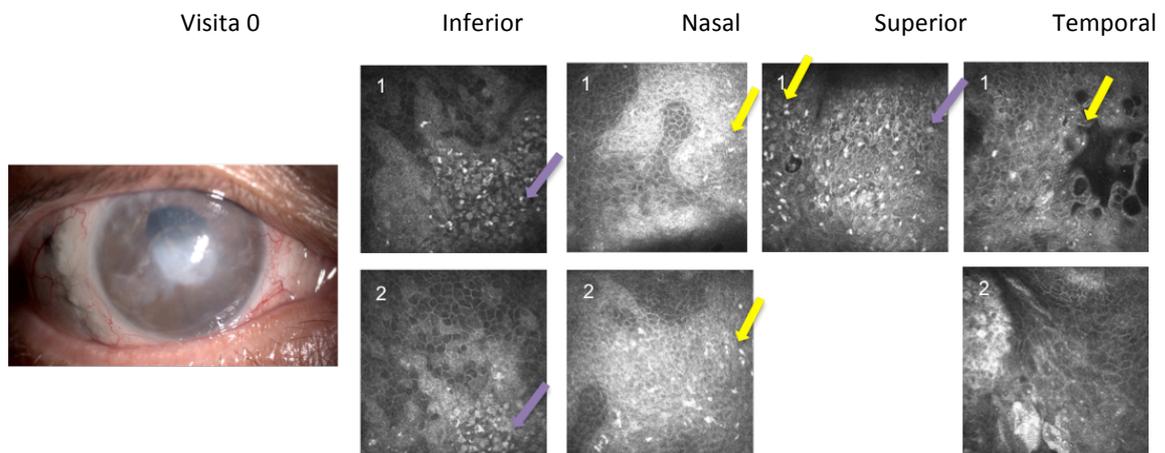
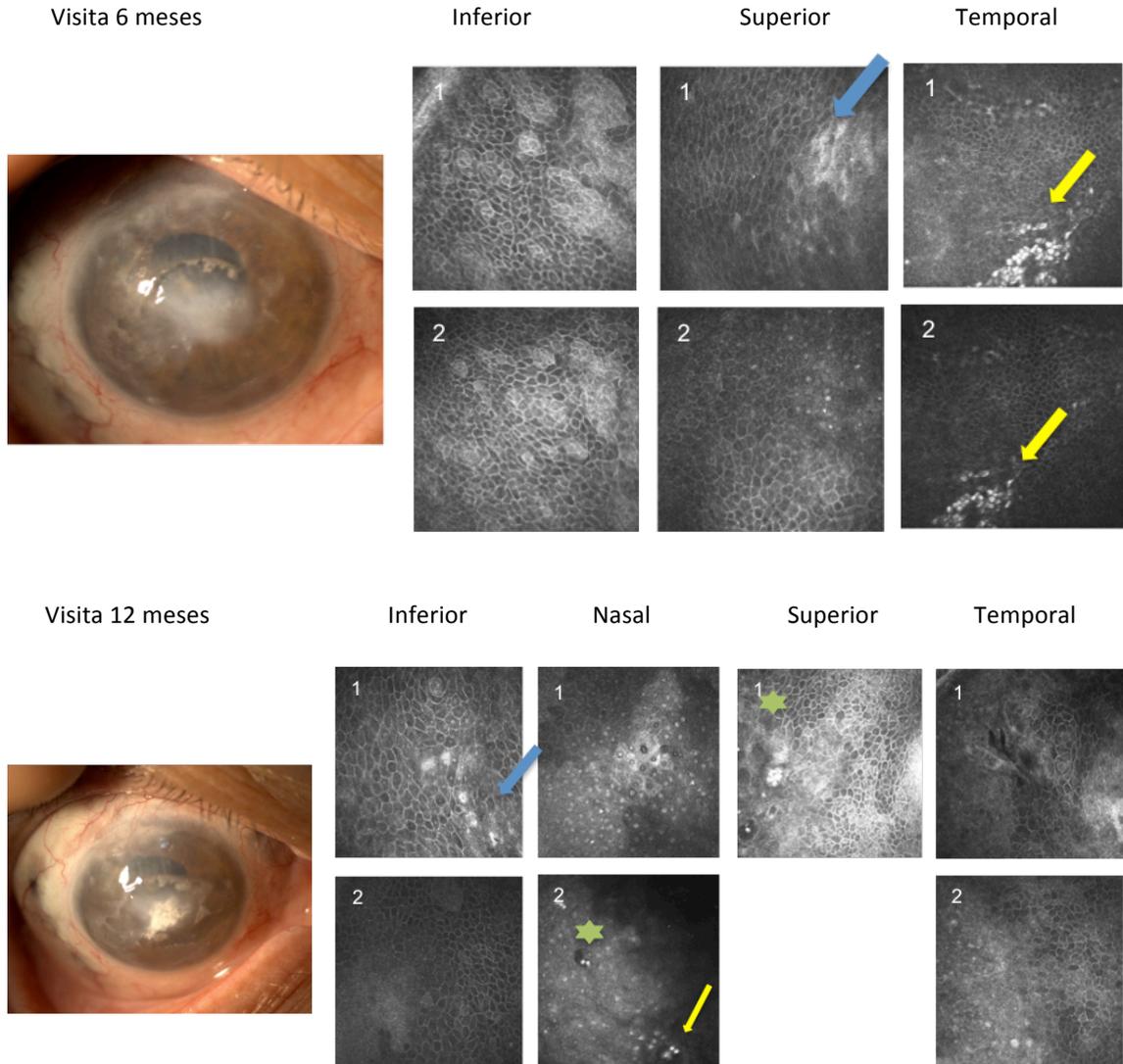


Figura 52. Paciente N°8 que recibió un trasplante de células mesenquimales (MSCT) en su ojo derecho. Análisis con MCIV de la zona limbar del ojo derecho.





Paciente varón de 72 años (paciente nº8) pseudofáquico que muestra fallo corneal unilateral en OD debido a cirugías múltiples por desprendimiento de retina (perteneciente al grupo 3: otras causas no inflamatorias) y con queratopatía en banda. Las imágenes de MCIV del epitelio corneal basal muestran un fenotipo epitelial mixto antes de la cirugía (visita inicio) con células caliciformes (flecha morada) y corneal a los 6 meses y 12 meses. En el análisis de la zona limbar: en la zona inferior presentó una zona de transición de epitelios junto a una zona de células caliciformes (flecha morada), en zona nasal se valoraron zonas de transición de epitelios junto a algunas células inflamatorias (flecha amarilla), en área superior se determinaron células inflamatorias (flecha amarilla) y alguna célula caliciforme (flecha morada) y en zona temporal se mostraron células inflamatorias (flecha amarilla) y lo que parece zona de transición de epitelios. En la visita 6 se aprecia en área inferior una zona de transición de epitelios, en el cuadrante nasal no se pudieron adquirir imágenes de calidad, en el área superior se detectaron células en descamación (flecha azul) y lo que parece una zona de transición de epitelios y en la zona temporal se valoró una zona de transición de epitelios, células inflamatorias (flecha amarilla) y epitelio corneal. Y en la visita 12 en la zona inferior se valoraron zonas de transición de epitelios junto a una zona de células en descamación (flecha azul), en área nasal se encontraron zonas de transición de epitelios y una zona con algún quiste (estrella verde) y alguna célula inflamatoria (flecha amarilla). En la zona superior se valoraron algún quiste (estrella verde) junto a una zona de transición de epitelios y en el cuadrante temporal se encontraron zonas de transición de epitelios.

En la figura 51 se puede ver imágenes de MCIV de un paciente que recibió trasplante de limbo cultivado, en el que se hallaron, previamente a la cirugía, crestas de empalizada en el cuadrante inferior con resultado de éxito total. En la figura 52 se pueden apreciar las imágenes de un paciente que recibió trasplante de células mesenquimales, en el cual, no se detectaron crestas de empalizada en ningún cuadrante previo a la cirugía con resultado de éxito total. En resumen, no se han observado cambios morfológicos en el nicho limbar que puedan explicar el porqué unos trasplantes son exitosos y otros no. Por lo tanto, se cumple la segunda parte de la hipótesis de nuestro trabajo de esta tesis doctoral que establecía que el resultado final de este tipo de trasplantes celulares no podrían explicarse en base a una mejora anatómica del nicho limbar.

Discusión

7. Discusión

El presente trabajo de investigación ha demostrado la veracidad de la doble hipótesis establecida. Por un lado, el MSCT resultó tan bien tolerado e igual de efectivo que el CLET y, de hecho, fue ligeramente superior en algunos aspectos. Además, se ha podido constatar que el daño objetivado en el nicho limbar antes de llevar a cabo los trasplantes no ha mejorado, independientemente del resultado final del trasplante o del tipo celular empleado.

Para llegar a este ensayo, se partió del estudio previo llevado a cabo en nuestra Institución y publicado en 2015,¹⁰ el cual, estableció las bases para la metodología del presente ensayo clínico. Las conclusiones de este trabajo fueron que CLET logró un éxito en el 80% de los 20 casos trasplantados a los 1 y 2 años y en el 75% a los 3 años, sin diferencias estadísticas entre los CLET autólogos y los CLET alogénicos. Mediante MCIV se concluyó que un 80% de los casos mejoraron su estatus epitelial previo. En dicho trabajo, ya se discutieron ampliamente la metodología, clasificaciones empleadas y los hallazgos comparados con otros resultados publicados, siendo similares o, incluso, superiores a lo publicado hasta el momento. Por esta razón, no se incidirá en la discusión de la metodología y resultados que el presente ensayo y nuestra publicación de 2015 tienen en común.¹⁰

Por lo que respecta a este ensayo, no existen estudios clínicos publicados en los que se hayan realizado MSCT a nivel de la superficie ocular en el ser humano, siendo este el primer ensayo clínico reportado.

Por ello, la comparación de nuestros resultados con otros publicados usando células mesenquimales para reconstruir el epitelio corneal, es lógicamente, imposible. Aún así, y en general, los porcentajes de éxito comparados con otras series en las que se realizaba CLET, son similares.

Se puede establecer, a pesar de estas dificultades, que nuestros hallazgos, con respecto a las alteraciones encontradas en pacientes diagnosticados de SIL, tanto en córnea central como en limbo, son similares a lo reportado por otros autores.

Discusión sobre el fenotipo epitelio corneal central, mediante MCIV, en pacientes con SIL que van a ser sometidos a CLET o MSCT

Se realizó una revisión de las publicaciones científicas en las que los pacientes con SIL eran estudiados mediante MCIV. Los autores ya plantean la necesidad de una prueba fiable y objetiva para la evaluación del tejido corneal,¹³⁰ y algunos de ellos estudian la córnea mediante MCIV tanto antes como después de la cirugía de trasplante de células madre.^{13,73,131,132}

En la valoración que se planteó para los pacientes del presente ensayo, se tuvo en cuenta el fenotipo presente en el centro de la córnea evaluado mediante MCIV^{84,117} y, de hecho, ha sido la variable objetiva principal de este ensayo. Dicho fenotipo podía responder a tres categorías: corneal, conjuntival o mixto.

El fenotipo epitelial corneal, definido ya por varios autores,^{85,87,89,119,121,129,133-136} es el que debe de existir en condiciones normales y es el siguiente: en la capa más externa, se observan las células en patrón poligonal, con citoplasma brillante, con borde blanco hiperreflectante y núcleo con halo negro perinuclear de gran densidad, con un tamaño aproximado de 50 μm de diámetro y aproximadamente 5 μm de grosor, con una densidad de 600-1200 células/ mm^2 ; estas células que se encuentran en proceso de descamación. En la capa celular epitelial intermedia se aprecia un patrón de células negras, con borde blanco hiperreflectante de gran densidad, de tamaño inferior a las células superficiales, en torno a unas 30 μm , pero con forma muy regular y con una densidad en torno a 5.000 células/ mm^2 en zona central y unas 5.500 células/ mm^2 en la periferia. A medida que se profundiza en el epitelio, se aprecia un aumento de densidad celular con un patrón similar al epitelio intermedio.

El fenotipo epitelial conjuntival viene principalmente definido por la presencia de células caliciformes, ya que éstas células han de encontrarse en la conjuntiva normal y nunca residen en el epitelio corneal normal. Estas células son redondas o de forma irregular, muy juntas con un diámetro celular $>20 \mu\text{m}$, de tamaño irregular y una relación núcleo/citoplasma grande, presentando un citoplasma oscuro y núcleo brillante, hiperreflectante.

El fenotipo epitelial mixto que viene definido por la presencia simultánea de los epiteliales descritos. Estas características de los tres patrones posibles de fenotipo

epitelial de la población celular de la superficie ocular están resumidas anteriormente en la tabla 3 y han sido descritas en otras publicaciones.^{85,87,89,119,121,129,133-136}

Algunos autores describen los cambios celulares en el SIL, con células epiteliales corneales de bordes peor definidos y núcleos prominentes con aumento de su tamaño. Estos cambios son progresivos y se manifiestan en capas más profundas en etapas más avanzadas. En las últimas fases, este epitelio mostraría metaplasia y se hallaría neovascularización en las mismas zonas, así como la presencia de células caliciformes.¹³⁷

Previamente a la cirugía, la distribución de los fenotipos conjuntival, corneal o mixto en la córnea central no presentó diferencias, lo que aseguró que este aspecto no influyera en el resultado final de éxito o fracaso por esta variable.

En esta visita basal, se encontró un fenotipo mixto mayor en MSCT frente a CLET, aunque sin significación estadística frente a un marcado fenotipo conjuntival en ambos grupos (32% N=9). Ya fue comentado por Dua y colaboradores en el año 2009 que su grupo de pacientes evaluados con diagnóstico de SIL presentaban un epitelio conjuntival en el 62,5% de los casos, con diferentes etiologías.¹¹⁶ También se ha determinado la presencia de este fenotipo en pacientes con aniridia,⁸⁴ una causa importante del SIL primario. Como puede verse en el análisis se tuvo en cuenta el fenotipo corneal y mixto como ya han determinado otros autores como Araújo y colaboradores en su estudio de 2013, evaluando mediante MCIV a 13 pacientes diagnosticados de SIL, donde establecieron la presencia de fenotipo conjuntival en el 76,9% de sus casos.¹¹⁷

Como ya hemos establecido que la presencia de células caliciformes confirma la presencia de fenotipo conjuntival, se establece directamente en otras publicaciones la presencia de esta variable, como en el estudio de Dua y colaboradores del año 2000 donde hallaron células caliciformes, aunque no ofrecen porcentajes.¹¹⁶ También Wang y colaboradores, en su revisión del año 2011, valoraron la presencia de células caliciformes, mediante MCIV, en pacientes diagnosticados de SIL por causticación como grandes células hiporefectantes.¹²⁴ Shortt y colaboradores también encontraron correlación entre los hallazgos en citología de impresión corneal y MCIV con respecto a las células caliciformes en pacientes con aniridia. Antes de la cirugía, 6 de 8 ojos evaluados mediante MCIV mostraron una fina capa de células hiper-reflectivas sin

límites identificables y un paciente presentó fenotipo mixto.⁸⁴ Araújo, en el estudio de 2013, encontró un 69,2% de células caliciformes en pacientes diagnosticados de SIL,¹¹⁷ Miri y colaboradores en el año 2012, en su estudio de 23 ojos afectados de SIL parcial o total encontraron células caliciformes en patrón de roseta en 6 (34,8%) pacientes.¹²¹

Evaluando las publicaciones, se halla información interesante sobre el comportamiento del epitelio corneal y su regeneración. Por ejemplo, en el estudio de Dua y colaboradores del año 2009, en el que detectaron células epiteliales corneales en pacientes con SIL total, se planteó la posibilidad de que por un lado existan nichos no detectados o bien que exista una zona central corneal capaz de mantener la población del epitelio.¹¹⁶ Esta suposición sobre las células madre ha sido hipotetizada también por otros autores.^{86,99}

Aunque no se ha evaluado en nuestro estudio, en otros sí se ha tenido en cuenta, la presencia de cambios en el plexo nervioso en pacientes con SIL¹²³ y en pacientes diagnosticados de síndrome de ojo seco, encontrando diversos hallazgos inespecíficos.¹²²

También se han encontrado alteraciones celulares como la disminución de la densidad celular corneal^{123,124} en la zona central y limbar relacionada directamente con la gravedad del SIL,¹³⁸ alteraciones en el grosor corneal¹³⁹ y ausencia de definición de las células, tanto de epitelio conjuntival como corneal.¹²¹

Por último, algunas publicaciones evalúan la metaplasia escamosa mediante MCIV, correlacionado los hallazgos con los encontrados en citología corneal,¹²⁶ debatiéndose que técnica, MCIV o citología es más sensible para detectar esta alteración corneal.¹¹⁷

Discusión sobre la descripción del nicho limbar mediante MICV, analizando su posible relación con el fenotipo epitelial descrito en la córnea

En los pacientes con SIL, como ya se ha comentado, se produce una destrucción de las empalizadas de Vogt y de hecho, ya en el año 1999, Schwab y colaboradores observaban la necesidad de encontrar un sustituto del nicho limbar destruido en estas situaciones.¹⁴⁰

En los pacientes del presente ensayo se detectaron crestas de empalizada en la visita basal en el grupo CLET en un paciente en limbo inferior y en un paciente de

MSCT en limbo superior, obteniéndose porcentajes del 100% de ausencia de esta estructura en el resto de zonas en ambos grupos de tratamiento.

En condiciones normales, se han detectado empalizadas de Vogt principalmente en las zonas limbares superior e inferior,^{90,136,141} identificadas como estructuras lineales hiperreflectivas con espacio acelular interno, que corresponden con las crestas de empalizada. En la zona interna, se aprecian columnas de células epiteliales y ocasionalmente puede valorarse la existencia de estructuras ovaladas al final de las empalizadas que se denominan proyecciones estromales.^{86,87,90,118,128,136,142}

Hay que precisar que algunos autores han declarado que, en ocasiones, no es posible tomar imágenes de las crestas y criptas límbicas, incluso en ausencia de patología, corneal o conjuntival.¹⁴³ En nuestro estudio, se estableció una variable sobre la colaboración del paciente para documentar la calidad dudosa de algunas imágenes y las dificultades para su adquisición; y aunque se sospechaba que la colaboración del paciente sería peor en la visita inicial, no pudo demostrarse estadísticamente este hecho, pero se ratifican las dificultades de la investigadora para obtener imágenes valorables de algunos pacientes.

Patel y colaboradores, en su estudio del año 2006, al evaluar el limbo inferior de 50 pacientes sanos, encontraron las estructuras anteriormente mencionadas así como los hallazgos descritos por Kobayashi¹¹⁸ donde valoraron la variabilidad en la morfología limbar, y como la pigmentación determina la hiperreflectividad de las imágenes y, además, describieron una disminución de estructuras de empalizada y de células epiteliales con el aumento de edad del sujeto.¹¹⁸

En nuestro estudio, aunque no hubo diferencias significativas, se estableció un porcentaje de crestas de empalizada previamente al tratamiento mayor en las zonas inferiores y superiores frente a los cuadrantes nasal y temporal. Como ya se ha comentado, había más crestas de empalizada en el limbo inferior en los casos que iban a sufrir CLET y más en la zona superior en los casos que iban a sufrir MSCT.

Shortt y colaboradores, en su estudio del año 2007, evaluaron mediante MCIV, los 4 cuadrantes limbares de 10 sujetos sanos y 8 pacientes con pérdida de células madre de limbo, por diferentes patologías. Hallaron criptas en el limbo en superior e inferior en todos los individuos sanos, pero no se encontraron en ninguno de los pacientes afectados de patología, encontrando, además epitelio adelgazado y

neovasos.⁶¹ Nubile y colaboradores en el año 2012 evaluaron a 17 pacientes diagnosticados de SIL y establecieron la ausencia de crestas de empalizada así como cambios morfológicos en las células.⁸⁶ En el estudio dirigido por Deng y colaboradores realizado en el año 2012 objetivaron en 39 ojos diagnosticados de SIL con diferentes etiologías, la desaparición de empalizadas de Vogt en las zonas afectadas, ausencia de fibras nerviosas, aumento en el tamaño y morfología celular determinada por el grado de la enfermedad y cambios metaplásicos.⁸⁴ Hong y colaboradores, en el estudio del año 2011, evaluaron 23 pacientes con SIL debido a causticaciones mediante MCIV, en los que realizaron KLAL; no se hallaron crestas de empalizada previamente a la cirugía y sí neovasos, así como algunas zonas de epitelio conjuntival definido por células poligonales con núcleo pequeño, fibrosis e irregularidad en las fibras de colágeno; también existían células inflamatorias y caliciformes, lo que indicaba la presencia de conjuntivalización corneal, quistes conjuntivales y neovascularización. Todo ello estaba en consonancia con el estudio de Dua, en pacientes con SIL, donde encontraron los mismos hallazgos en el limbo y la córnea.^{116,125} Estos estudios confirmaron también una disminución importante de crestas de empalizada en sus pacientes afectados por SIL.

Lagali y colaboradores, en el año 2013, estudiaron las empalizadas de Vogt, de 20 ojos con aniridia y 17 ojos considerados normales.¹⁴⁴ Tomaron imágenes con MCIV en zonas superior e inferior, zonas de transición y plexo nervioso. Se determinó la existencia o no de empalizadas de Vogt morfológicamente intactas en un región límbica con los hallazgos de células basales epiteliales, al menos dos estructuras de cresta empalizada y al menos una proyección del estroma focal y la aparición de epitelio conjuntival y corneal, células caliciformes e inflamatorias. Establecieron las características ya mencionadas en las empalizadas de pacientes normales. Según su baremo, determinaron un paciente con morfología normal y córnea transparente, mientras que en 5 de 12 ojos que tenían crestas de empalizadas y en 20 ojos, no las hallaron. En los pacientes con grados más avanzados de aniridia, se detectó un empeoramiento de la estructura limbar, ya que también parecía verse afectada por la edad.¹⁴⁵

Muchos autores han establecido que, debido a la edad, puede disminuir el éxito de encontrar empalizadas de Vogt en sujetos sanos,^{118,142,144} lo cual induce a pensar que estas dificultades también aumentarían en los ojos afectados de SIL.

Discusión sobre los cambios producidos en el epitelio del centro de la córnea al final del período de evaluación

Es habitual, como ya está reportado, que los pacientes trasplantados presenten diferentes hallazgos, evolución y reacción frente a los tratamientos, principalmente motivado por la etiología, el grado y la intensidad del SIL previo.^{146,147}

Como ya se comentó en los resultados, el cambio en el fenotipo epitelial en la córnea central no fue significativamente diferente entre CLET y MSCT ni a los 6 meses ni a los 12 meses. En la visita de 6 meses, ambos grupos de tratamiento mejoraron a un fenotipo epitelial corneal por encima del 49%, hecho que, se mantuvo a los 12 meses, sin presentar diferencias entre ambos grupos. Se pudo observar por MCIV un patrón de células negras con borde blanco hiperreflectante, con gran densidad, similar a lo encontrado en pacientes intervenidos de KLAL por otros autores.⁷³

Otros investigadores ya han comentado la presencia de entidades como células caliciformes que ratifican el diagnóstico de SIL, así como otras variables como pueden ser células inflamatorias, quistes conjuntivales y neovascularización.⁷³

Los resultados de éxito global en el presente ensayo clínico en torno al 70% en ambos grupos de tratamiento en tras 6 y 12 meses, requerían la mejoría del fenotipo en el centro de la córnea en los pacientes evaluados. Debe tenerse en cuenta que los porcentajes de fenotipo corneal son inferiores a los éxitos obtenidos porque también se consideró éxito completo a un fenotipo conjuntival que mejoraba a mixto, siempre que se cumplieran, además, los criterios clínicos. Además, se consideró también un éxito parcial si, a pesar de no mejorar el fenotipo epitelial en el centro corneal, el paciente mejoraba clínicamente de manera evidente. Con lo cual, la presencia de un epitelio conjuntival en el centro corneal se considera siempre o un fracaso o un éxito parcial si es que el resto de parámetros clínicos mejoraba. Pero nunca se consideró un éxito completo a un caso que terminaba con fenotipo epitelial conjuntival en el centro corneal.

En el año 2014, Shortt y colaboradores realizaron un estudio en pacientes con SIL en el que se establecieron un protocolo de evaluación según diversos signos; basándose en otros proyectos, así como la experiencia de los investigadores, teniendo en cuenta: opacidad corneal, neovascularización, irregularidad y defecto epitelial según gravedad, realización de fotografías de lámpara de hendidura y con tinción, y el

análisis de un experto externo. En la MCIV determinaron si existían células epiteliales, lo que se interpretó, en su ausencia, como úlcera o cicatriz. Y consideraron que el epitelio era normal tanto en fenotipo conjuntival como corneal, una o dos células de espesor con núcleos pero sin uniones intercelulares, epitelio estratificado con límites claros. Se asignaron puntuaciones a los pacientes según este análisis. La AV mejoró en el 79% de pacientes a los 6 meses y en el 71% al año. Esta escala, en el análisis de la clínica, permite obtener, según los investigadores, valores numéricos susceptibles de cuantificar. Determinaron que la MCIV y la citología por impresión corneal son complementarias. En sus grupos de pacientes hubo una regresión de los síntomas clínicos a los 2 años.¹⁴⁸ Esta planificación que se muestra es muy interesante para estandarizar todos los estudios relacionados con estas cirugías de la superficie ocular y es, de hecho, similar a la seguida en nuestro estudio pues el protocolo que hemos desarrollado ha sido una modificación personal del que estos autores utilizaron en su publicación de 2008.⁸⁴

En el año 2015, Pedrotti y colaboradores, realizaron un estudio en pacientes sometidos a CLET autólogo tras un año de la cirugía y evaluaron córnea central encontrando un 46,2% con fenotipo corneal y un 30,8% con fenotipo mixto.¹³¹

Mastropasqua y colaboradores, en el año 2016, realizaron CLET en 6 pacientes, hallando en tres pacientes un fenotipo corneal, en dos pacientes un fenotipo mixto y en un paciente un fenotipo conjuntival; en ninguno de ellos, a pesar de ser exitosos, se observó ningún signo de mejora en la estructura limbar, analizada por MCIV.¹³²

Discusión de la posible modificación microscópica del nicho limbar evaluada por MCIV a los 6 y 12 meses tras un trasplante de células madre y su relación con el fenotipo corneal

Existen pocas publicaciones que analicen el nicho limbar mediante MCIV tras técnicas quirúrgicas, incluyendo trasplante de células madre cultivadas.

Nuestro trabajo demuestra de forma objetiva que, independientemente del resultado del trasplante o del tipo celular trasplantado, no se consigue la reestructuración de las estructuras del nicho limbar sano.

En nuestro grupo de investigación, Ramírez y colaboradores en el año 2015, ya establecieron, mediante MCIV, que las zonas intervenidas para la obtención de la biopsia limbar en el ojo contralateral sano de aquellos casos que iban a recibir un CLET autólogo, no conseguían regenerarse tras la técnica, teniendo en cuenta, además que se partía de un nicho celular normal.¹³

Aunque los datos no son estadísticamente significativos si hemos encontrado tres casos en el grupo MSCT donde existían, mediante MCIV, crestas de empalizada tras el trasplante, que no se habían constatado anteriormente, lo cual, podría considerarse una notable mejoría del nicho. Dado que se trata de situaciones muy graves y sin otras alternativas terapéuticas, consideramos que este hecho podría tener relevancia clínica. Debe insistirse en el hecho de que, en algunos pacientes, la obtención de imágenes fue difícil, siendo imposible en algunos casos evaluar todos los cuadrantes. La mayor parte de los pacientes, tras la cirugía, mejoraron el estado de la superficie ocular y la sintomatología, lo cual, favoreció la realización de la prueba, a pesar de que la colaboración de estos pacientes concretos no fue mala, no deja de ser una exploración difícil y muy dependiente del paciente. No se puede excluir con certeza, por ello, que esas crestas de empalizada encontradas tras el trasplante hubieran existido ya previamente y que, sencillamente, no se lograron encontrar con la MCIV.

Aún así, es improbable, pues la colaboración de estos tres pacientes según nuestra clasificación, fue de 2-3, en todas las visitas y la calidad de las imágenes mejoró de la visita basal a las visitas de los 6 y 12 meses.

Tsai y colaboradores, en su estudio del año 2000, tras realizar el trasplante autólogo CLET en 6 pacientes, establecen recuperación del limbo dañado en pacientes

con SIL parcial, aunque no especifican cómo lo evalúan. Pero determinan que obtuvieron: la reepitelización completa de la superficie corneal entre 2-4 días después del trasplante en los 6 ojos que recibieron trasplantes. Alrededor de un mes después, la superficie ocular estaba cubierta de epitelio corneal, y mejoró la claridad de la córnea. En 5 de los 6 ojos que recibieron trasplantes (83%), la AV media mejoró de 20/112 a 20/45. En un paciente con quemadura química que tenía opacificación total de la córnea, la AV mejoró desde la capacidad de contar dedos a 40 cm a 20/200; ningún paciente tuvo neovascularización o inflamación recurrente en el área trasplantada durante el período de seguimiento.¹⁴⁹

En el año 2015, Pedrotti y colaboradores realizaron un estudio en pacientes sometidos a CLET autólogo tras un año de la cirugía y, a pesar de encontrar fenotipo corneal en un 46,2% y mixto en un 30,8% no hallaron empalizadas de Vogt en ningún paciente.¹³¹

Mastropasqua y colaboradores, en el año 2016, establecieron que en su grupo de 6 pacientes que recibieron CLET, no hallaron empalizadas de Vogt tras el trasplante en ningún cuadrante, a pesar de encontrar en tres pacientes un fenotipo corneal.¹³²

Otros autores han determinado también la regeneración parcial o total de la córnea central, en al menos el 50% de los pacientes intervenidos, pero han descrito una ausencia total de empalizadas de Vogt en estos pacientes tras los tratamientos regeneradores.^{132,133}

Estos estudios están en consonancia con nuestros hallazgos sobre la ausencia de las empalizadas de Vogt en pacientes trasplantados independientemente del fenotipo epitelial encontrado en la córnea central

Dados los resultados obtenidos, se concluye que al menos en nuestro trabajo, no existe relación entre el éxito o fracaso de la reconstrucción del epitelio corneal central y la situación estructural del nicho limbar ya que no hemos hallado nuevas crestas de empalizada en pacientes considerados éxito y, por supuesto, tampoco en los considerados como fracaso.

Debido a la ausencia de esta regeneración de las empalizadas de Vogt, algunos autores se han planteado, la posibilidad de que exista un nicho de células madre en la córnea central,⁶⁸ como se ha descrito en otros mamíferos,¹⁵⁰ o en la córnea periférica cercana del limbo,⁸⁶ siempre que exista estabilidad de la superficie ocular. Esta

Tesis doctoral: "Estudio mediante microscopía confocal del nicho limbar en pacientes con síndrome de insuficiencia límica sometidos a trasplante de células madre"

explicación podría interpretar como estas células madre trasplantadas serían capaces de regenerar el epitelio corneal situándose estratégicamente en dichos nichos y ejerciendo su función de células madre desde allí. Naturalmente, esto no deja de ser una hipótesis que aún no se ha abordado, hasta donde sabemos.

Discusión del análisis de las variables clínicas evaluadas estableciendo la relación con el resultado de éxito o fracaso del trasplante

Para valorar los resultados de nuestro estudio es necesario poder establecer comparaciones con trabajos similares. Al no existir publicaciones sobre trasplantes de células madre limbares cultivadas frente a mesenquimales en humanos, la discusión se realizará comparando datos con los trasplantes en los que se utilizan células limbares o CLET. El hecho de que, en general, los resultados entre CLET y MSCT hayan sido similares, facilita esta discusión.

El parámetro más importante definido por los investigadores es la tasa de éxito. Esta valoración depende de diferentes variables según los casos. Como se explica más adelante, los parámetros más utilizados en la bibliografía son la transparencia corneal, la ausencia de defecto epitelial y la agudeza visual. Posteriormente, se evalúan los pros y contras de usar estas variables, pero en definitiva, la última consideración es el juicio subjetivo del investigador, basándose en toda la información recogida.¹⁰

El éxito general de todos los trasplantes celulares realizados en nuestro ensayo después de 6 meses fue del 75% (21 de 28 casos: 13 éxitos completos, 8 éxitos parciales). Después de 12 meses, la tasa de éxito fue del 82,6% (19 de 23) 15 éxitos completos, 4 éxitos parciales. Los resultados arrojan cierta ventaja en los trasplantes MSCT aunque sin significancia estadística. Con respecto a CLET, nuestros resultados son similares a lo recogido por otros grupos y dentro de la media, utilizando ambos grupos. Para explicar estos porcentajes debe tenerse en cuenta, tanto el tipo de muestra incluida como la gravedad de los casos, grupo etiológico, control de complicaciones, etc.

No hemos podido relacionar nuestros resultados obtenidos con los grupos etiológicos ni de severidad del SIL, como se explica más adelante, dado el tamaño muestral y la baja tasa de fracaso. Pero en nuestro estudio sí se incluyen, como en muchas investigaciones, un mayor número de causticaciones.

La tasa de éxito varía enormemente en los trabajos revisados que incluyen pacientes CLET. Nuestro porcentaje es superior al reportado por algunos autores,¹⁵¹⁻¹⁵⁵ aunque la mayoría de trabajos publicados presentan valores entre 70-100%,^{91,94,130,140,156-163} y en algunos estudios con índices entre el 10-12%.¹⁶⁴ Cuando los porcentajes disminuyen con respecto al primer grupo mencionado, los autores argumentan que sus muestras contienen un gran número de pacientes graves. En algunos casos se han establecido diferencias entre los grupos de gravedad como en la serie publicada por Pauklin y colaboradores, en la cual, la superficie ocular se restauró con éxito en el 83,3% de SIL parcial y en el 63,3% de SIL total.¹⁴⁷ En el análisis realizado se valoró también la existencia de éxito parcial, en pacientes que no habían tenido una recuperación completa pero que han mejorado en una o varias de las variables medidas. Esta recuperación parcial ronda porcentajes del 10-15%⁹¹ en la bibliografía publicada, aunque muchos autores no tienen en cuenta esta clasificación. En el estudio de Ramírez y colaboradores, establecimos una tasa de éxito del 80% con similares resultados entre CLET autólogo y CLET alogénico, en los primeros dos años.¹⁰

Con respecto a los datos puramente demográficos, los pacientes incluidos en el ensayo, tanto en un grupo como en otro, no presentaron diferencias estadísticamente significativas en sexo, edad u ojo intervenido. Debe establecerse que se realizaron más trasplantes MSCT debido a una pérdida de producto limbar en más casos (tabla 6).

Como en la mayor parte de las publicaciones, el grupo de causticaciones es el más numeroso, al igual que en nuestro estudio.⁹¹ De hecho, hay varias publicaciones que sólo incluyen este grupo diagnóstico.^{6,152,155,157,165} En nuestro análisis no se han podido establecer diferencias entre los grupos etiológicos ni tampoco en relación con los grupos de tratamiento. Otros autores han establecido que las patologías de base inmune presentan peores resultados,^{94,166} y mejores en causticaciones. En el trabajo de Subramanian y colaboradores en el que analizaron sólo pacientes que habían sufrido causticación establecen peores resultados en pacientes con quemadura por álcali frente a los otros grupos, aunque no de forma significativa.¹⁶⁷ Shin Ha, en su estudio del año 2005, recomienda estas cirugías en pacientes con causticación.¹⁵² En el ensayo clínico fase IV de Zakaria y colaboradores, al contrario que en trabajos anteriores, se hallaron peores efectos en causticaciones (coherente al ser éste un grupo más

numeroso de pacientes, 38%) al comparar con patologías como aniridia, queratitis o iatrogénicos.¹⁵¹

Otro dato a tener en cuenta que puede determinar el éxito o fracaso es el grado de gravedad. Como ya se explicó en la introducción existen diferentes clasificaciones; el problema es que esta forma de evaluar no está estandarizada; así pues, es decisión del investigador determinar la gravedad del caso. Nuestro análisis no detectó diferencias entre grupos de afectación ni tampoco en relación con los grupos de tratamiento; sin embargo una afectación total, en otras publicaciones, provoca peores datos finales,¹⁵⁶ como ya comentaron Burcu y colaboradores en su seguimiento de casi tres años en pacientes con causticación química, donde obtuvieron peores resultados en estos pacientes independientemente del tipo de tratamiento.¹⁵⁵ En el trabajo de Tsai con 6 pacientes sometidos a CLET autólogo, lograron una reepitelización completa de la córnea en muy poco tiempo, en el primer mes, explicable porque el SIL era parcial en 4 casos.¹⁴⁹ Sangwan determinó éxito en el 12% de pacientes con un grado severo de SIL.¹⁶⁴ Sin embargo Daya y colaboradores establecen éxito en el 70% de los pacientes de su estudio diagnosticados de casos graves.¹⁵⁹ Dadas las consecuencias de estos tratamientos en estos pacientes con un daño total, Shin Ha recomienda esta cirugía sólo en SIL parcial.¹⁵² En el estudio de Rama y colaboradores el 64,6% presentaban unos datos de éxito en pacientes con SIL total en un 97,3% de causticaciones, logrando la transparencia corneal con éxito en el 76,6% y éxito parcial en el 13,1%, con estabilidad de hasta 10 años de evolución en algunos pacientes. Establecen que la gravedad inicial es determinante para las conclusiones finales aunque obviamente obtuvieron buenos resultados en este tipo de pacientes⁹¹ al igual que Pauklin.¹⁴⁷ En el estudio retrospectivo de Vazirani, entre 2001-2011, al no obtener los efectos esperados, observan que en ojos con SIL parcial, no se produce la regeneración del epitelio corneal esperada; establecen por ello, que pueden existir barreras moleculares o físicas que impiden la migración de células sanas a zonas enfermas y la diferenciación de las células madre, lo que haría necesaria la extirpación del pannus corneal.¹⁶⁸ La mayor parte de los investigadores están de acuerdo en que la ausencia de éxito es debido a la inclusión de pacientes con casos muy graves de SIL,^{154,155} con presencia de complicaciones ya antes de los trasplantes⁹¹ y/o a la falta de control de factores como la inflamación previa.^{94,159}

Evaluación de la variable AV en los pacientes sometidos a CLET o MSCT

La AV como variable para medir la eficacia del tratamiento es algo controvertido, dado que la reepitelización no puede conseguir la transparencia corneal de todas las capas de la córnea, sino solo del estroma más anterior; aún así es un indicador muy utilizado en todas las publicaciones, algo erróneo en nuestra opinión. Solo se podría esperar una mejoría visual en pacientes cuya opacidad corneal sea anterior y modificable al mejorar el estado epitelial y que, además, no tengan otra patología que cause disminución visual, como catarata, glaucoma avanzado o patología retiniana previa. Obviamente, estos casos no van a mejorar su visión salvo que se hagan procedimientos quirúrgicos dirigidos a ello tras CLET o MSCT. Es por ello que, ya en el estudio anteriormente realizado por nuestro equipo,¹⁰ establecimos una clasificación pronóstica en función del número de cirugías que preveíamos necesarias para mejorar visión (tabla 3). Al paciente se le informaba también de esta situación en la visita de inicio para que no tuviera falsas esperanzas de mejorar su visión con CLET o MSCT en casos en los que, por ejemplo, ya se preveía que necesitaría posteriormente un trasplante de córnea por opacidad estromal total.

En nuestro estudio no encontramos diferencias significativas en la AV a lo largo de las visitas, aunque se observó una leve mejoría. La propuesta general de los investigadores es realizar el trasplante de células madre y posteriormente, una vez controlada la inflamación, y en aquellos casos de opacidad más allá del estroma anterior, una queratoplastia^{153,158,160,169,170} en función de la afectación corneal; también pueden realizarse cirugías como queratectomía fototerapéutica o cirugía de catarata o glaucoma,¹⁴⁷ que proporcionan en muchos casos una mejor AV.¹²² Se establece que la recuperación visual se basa en que el espesor corneal total esté transparente,¹⁶² incluyendo siempre un estroma sano.⁹¹ Otros autores establecen, sin embargo, que la mejora de AV depende directamente de la recuperación de la superficie ocular.¹⁴⁷ Otro elemento que se relaciona con la AV es la severidad del caso, que a medida que ésta aumenta se produce una disminución de la AV, lógicamente.¹⁵⁵ Los porcentajes de mejora de AV en los diferentes estudios difieren mucho, lo que puede explicarse por la propia variabilidad de los estudios y el uso de otras técnicas quirúrgicas tras el trasplante que tengan como objetivo mejorar este parámetro. La mejoría en los valores de AV que observamos en la bibliografía varían desde el 83% de

Tesis doctoral: "Estudio mediante microscopía confocal del nicho limbar en pacientes con síndrome de insuficiencia límica sometidos a trasplante de células madre"

Tsai y colaboradores¹⁴⁹ hasta el 40% de Daya y colaboradores¹⁵⁹ o los valores publicados por Sangwan, donde realizó un estudio con 15 pacientes realizando queratoplastia posterior al trasplante celular en 14 de ellos, obteniendo un porcentaje del 87% de pacientes con una AV 20/200 y un 53% con una AV de 20/60.¹⁶⁹ En otros trabajos ya establecen que no se produce una mejora de AV tras el tratamiento, incluso en pacientes considerados como éxito.^{151,171}

Para aquellos investigadores que incluyeron cirugías coadyuvantes, se plantean la elección de una cirugía como el trasplante de células madre expandidas y la queratoplastia simultánea, o bien separar ambas cirugías. Basu y colaboradores han realizado trabajos en esta línea, obteniendo datos de supervivencia del injerto del 80,6%, cuando se realizaron las dos cirugías separadas mientras que si se hacían las dos cirugías en una misma sesión, la supervivencia era del 25-13%, lo que explica, según estos autores, un mayor riesgo de fracaso en la técnica conjunta.¹⁶⁵ Otros autores, entre los que nos encontramos, también defienden esta línea de actuación;¹⁷² aduciendo que parece lógico controlar la inflamación antes de someter al paciente a una queratoplastia, evitando así el riesgo de rechazo.¹⁵³

Evaluación de la superficie ocular tras CLET o MSCT

Existen varios indicadores que establecen la recuperación de la superficie ocular, pero no en todas las investigaciones se utilizan los mismos parámetros y con la misma valoración. Como ya se ha comentado una estandarización de los protocolos permitiría una comparación mucho más ajustada.

La opacidad corneal puede venir definida por alteraciones a nivel del epitelio corneal o del estroma. Se utiliza en muchas publicaciones como indicador, aunque presenta similares problemas de valoración que la AV si el paciente tiene una afectación estromal completa. En nuestro trabajo, la opacidad corneal, evaluada en el estroma anterior, disminuye a lo largo de las visitas, sobre todo en el grupo MSCT. Los estudios publicados presentan diferencias importantes en esta variable, con porcentajes como el 73% de Koizumi y colaboradores, que coincide con la recuperación de la AV¹⁷³ o como el 35% publicado por Tsubota¹⁷⁰. Otros autores, entre ellos Basu, han determinado que hay una relación directa entre la AV y la opacidad corneal como, por otra parte, parece lógico.¹⁶⁵

La curación de los defectos epiteliales persistentes es un indicador de la regeneración corneal normal tras el trasplante en muchas publicaciones.^{158,159,173} Y así se considera en este trabajo de manera que no podría haber habido un éxito si había defecto epitelial persistente. La reepitelización corneal conseguida con fenotipo corneal se considera un indicador de éxito,^{147,149,151,157,162,164,170} desde el 71%^{130,156,172} de Schawb hasta el 100% de otros autores.^{68,130,152} Tsubota y colaboradores establecieron el hallazgo de epitelización corneal en el 31,4% de sus pacientes, eso les hizo establecer la viabilidad de las células trasplantadas y que sólo encontraron, mediante marcador, células de donante en un paciente.¹⁷⁰ La manera más correcta para evaluar esta característica es determinar el fenotipo encontrado en la córnea; que puede realizarse de forma no invasiva y rápida mediante el MCIV;¹⁵⁴ otros autores han usado marcadores celulares o mediante citología de impresión corneal.^{68,147,152,160,161} Ya se comentó que este método necesita de la extracción de las células poniendo así en riesgo el tejido regenerado.¹⁵¹ Cuando se utilizan marcadores moleculares, es fundamental poder correlacionar estos datos con los hallazgos clínicos.¹⁶¹

Limitaciones de este trabajo

Consideraciones prácticas del uso de la MCIV en este tipo de estudios

La realización de la MCIV conlleva una serie de dificultades que complican la adquisición de imágenes de buena calidad y la colaboración de los pacientes disminuye a causa de las molestias provocadas por la exploración. Aún así, es la única técnica que existe hoy en día para visualizar estas estructuras a nivel microscópico *in vivo*.

Además debe tenerse en cuenta con respecto al análisis limbar mediante MCIV que hay un 10-20% de individuos donde no son visibles las crestas de empalizada,¹⁷⁵ especialmente en sujetos no pigmentados.

Podría considerarse una limitación más el hecho de que la toma de imágenes precisa de contacto directo con la córnea, utilizando anestésico y gel o el uso de una lente de contacto, lo cual, podría inducir alteraciones en la capa superficial del epitelio corneal.^{120,128,141,176}

Para la realización de esta prueba se requiere de aprendizaje técnico, debido a las características del propio aparato, siendo éste, muy diferente a otros métodos

Tesis doctoral: "Estudio mediante microscopía confocal del nicho limbar en pacientes con síndrome de insuficiencia límica sometidos a trasplante de células madre"

diagnósticos, sin indicadores de fiabilidad excepto la propia exploración y sus hallazgos, además de un tiempo largo de adquisición de imágenes.^{86,121} Estas imágenes deben interpretarse tras su obtención; es un análisis que se basa en la morfología de las diferentes estructuras y la diferenciación entre blancos y negros, por lo que requiere de una gran experiencia, además de depender de la reflexión de la luz por parte de las distintas capas.^{83,86,120,143,177-179}

Otro factor a tener en cuenta es que, durante las sucesivas exploraciones, existe dificultad para evaluar el mismo punto de la córnea o limbo, así como la obtención de imágenes de todas las zonas de estudio, tanto en limbo como en córnea.^{121,180} Asimismo, estas imágenes deben ser reproducibles y de alta calidad, sin problemas de enfoque.^{133,134} Pero mientras se realiza la adquisición de imágenes se producen movimientos respiratorios, pulso y movimientos oculares involuntarios que afectan a la secuencia de exploración completa.^{86,87,133,143,181}

Otros factores que deben tenerse en cuenta son la retrodispersión de la luz,⁸⁶ que se ve afectada presumiblemente por la edad, el sexo, la hora de exploración¹⁷⁶ y la opacidad de la córnea¹¹⁷ y la presencia de haze corneal que provoca alteración en la dispersión de la luz y da lugar a problemas en la obtención y análisis de las imágenes.^{117,182}

Además, aunque esta técnica utiliza algoritmos automatizados de segmentación que permiten un control cuantitativo y morfológico de la córnea¹⁸³ pero su uso resulta muy difícil en pacientes con alteraciones severas de la superficie ocular.

Debe tenerse en cuenta que los hallazgos obtenidos en MCIV deben correlacionarse con las imágenes clínicas. Esta técnica es pues complementaria al resto de pruebas para asegurar el diagnóstico y el control evolutivo.

A pesar de todo lo expuesto, la técnica MCIV proporciona una información muy valiosa sobre las diferentes capas de la córnea y la estructura del limbo, imposibles de obtener de otra manera y permitiendo una evaluación rápida y mínimamente invasiva. Y, aunque no haya sido objeto de nuestro estudio, permite un diagnóstico *in situ* de patologías corneales de gravedad.

Algunos autores como Chan y colaboradores de acuerdo con nuestro criterio, establecen que la MCIV podría ser usado como herramienta de clasificación de la gravedad del SIL, sobre todo en la detección de los cambios iniciales, el futuro

pronóstico de la enfermedad y posiblemente la viabilidad de los tratamientos regeneradores,¹³⁸ o bien permitir el análisis de las zonas limbares y centrales en la evaluación de tratamientos ya realizados.^{131,132}

No debe olvidarse que permite un análisis objetivo de la presencia de fenotipo corneal o de estructuras como las crestas de empalizada que es fundamental para estandarizar los estudios de estas características.

Dificultades en la comparación de los estudios de trasplante de células madre cultivadas

Al realizar la investigación de los estudios de células madre cultivadas no pudo realizarse la comparación deseada, debido a múltiples causas, como las diferencias en los criterios de inclusión de pacientes,^{68,154,162} el tamaño de la muestra,^{157,172} el grado de afectación del SIL, la medida de la deficiencia de células madre,¹⁸⁴ o la etiología del SIL, que condiciona la respuesta al tratamiento.^{25,28,162,166,185} Existen situaciones como por ejemplo, los casos de Stevens-Johnson o aniridia, en los que no presentan una afectación grave de la superficie ocular por el SIL, sino que también existe una peor calidad en sus células y una peor evolución tras tratamientos regeneradores debido a las características inherentes a la enfermedad.^{148,163} Otros factores limitantes a tener en cuenta son la afectación ocular previa, la fuente de tejido y su manejo,^{10,184} las sustancias de soporte,¹⁵⁴ la técnica quirúrgica,^{25,28} los criterios de evaluación y valoración,^{10,25,28,148,184} el manejo pre y postoperatorio^{25,28,68,151} y el tiempo de seguimiento.^{157,172}

Ya se ha mencionado que la valoración del éxito o fracaso es muy heterogénea; en algunos estudios establecen como éxito la estabilidad de la superficie ocular por la ausencia de vascularización, conjuntivalización o ulceraciones;⁹⁹ en otros, este éxito viene determinado por la mejora de AV, lo cual, no siempre se corresponde con la mejoría clínica o bien no se mencionan dicho parámetro,^{146,184} que en muchas ocasiones está determinado por la propia etiología y la afectación sobre este parámetro tan utilizado;¹⁴⁸ además la AV en muchas ocasiones se mejora con queratoplastia o múltiples cirugías, estableciéndose una gran diferencia con respecto a estudios que no realizan estas técnicas.¹⁵⁷ La presencia de cicatrización profunda provocada por el SIL no se soluciona únicamente con la regeneración del epitelio corneal. Por lo tanto, el

Tesis doctoral: "Estudio mediante microscopía confocal del nicho limbar en pacientes con síndrome de insuficiencia límica sometidos a trasplante de células madre"

parámetro AV no es un indicador fiable a priori del éxito clínico o quirúrgico, como ya se ha mencionado.¹⁵¹

La ausencia de marcador de células madre también presenta problemas, tanto para identificarlas antes como después del tratamiento, y no permite determinar el origen de las mismas,^{99,100,186} lo cual, respondería a preguntas sobre la evolución de las células una vez trasplantadas. A la hora de abordar dichos tratamientos, debería establecerse cómo se comportan las células trasplantadas, o formando una reserva o dispersas en la superficie corneal y sufriendo una diferenciación con el paso del tiempo.

Otra cuestión problemática viene determinada por la falta de protocolos estandarizados para la producción, manejo y evaluación de la viabilidad de los implantes.^{27,28,100,151,186,187}

Es fundamental instaurar un método objetivo para clasificar la gravedad del SIL y cuantificar el número de células madre requeridas en cada caso para la restauración de la superficie ocular, lo cual, permitirá predecir el resultado de la evolución del paciente y por tanto mejorar técnicas y sustratos adecuándolos a los casos concretos.¹⁶³

Estudio de las limitaciones del estudio CLET versus MSCT

Todos los estudios de esta naturaleza presentan limitaciones que de hecho la mayoría de autores comentan en sus publicaciones.

El hecho de haber eliminado en nuestro estudio la citología corneal como método diagnóstico del epitelio existente en el centro de la córnea, medida también adoptada por otros grupos de trabajo,¹⁵¹ presenta el problema de no poder establecer correlaciones con la MCIV. Aunque las técnicas de citología y MCIV son complementarias, según algunos estudios.^{86,177} Pero no permiten determinar, por sí solas, si el epitelio corneal evaluado es producto del trasplante realizado.⁸⁴

La correlación de los resultados se complica cuando participan diferentes investigadores realizando la evaluación de la superficie ocular aunque en nuestro estudio, todos fueron analizados por el mismo investigador.¹⁴⁸

Podría criticarse que en nuestro estudio no se han investigado las células dendríticas, que aparecen con inflamación,^{73,116,120,177} así como las células de

Langerhans, que aumenta en procesos inflamatorios.^{188,189} Estas células se han analizados en estudios de Síndrome de Ojo Seco que analizan plexo nervioso subasal y estroma corneal, dando lugar a hallazgos como menor densidad y número de fibras, así como mayor tortuosidad nerviosa;^{122,126,177} y también los cambios producidos por envejecimiento fisiológico.¹⁹⁰ En nuestro estudio las metas planteadas pretendían analizar mediante MCIV la presencia de los fenotipos corneal, mixto y conjuntival en córnea central así como la estructura del nicho limbar, por lo que un análisis de otros parámetros habría complicado la exploración y no nos habría proporcionado la información necesaria para culminar el estudio.

Tesis doctoral: "Estudio mediante microscopía confocal del nicho limbar en pacientes con síndrome de insuficiencia límbica sometidos a trasplante de células madre"

Conclusiones

8. Conclusiones

1. Los fenotipos epiteliales en el centro corneal, analizados por microscopía confocal in vivo (MCIV) de los casos de síndrome de insuficiencia limbar (SIL) que han sido sometidos a terapia celular, bien de origen ocular (CLET) o extraocular (MSCT), presentaron un fenotipo epitelial en el centro de la córnea preferentemente conjuntival y, en menor proporción, mixto. No existieron diferencias de partida en este sentido entre ambos grupos.
2. El nicho limbar, lugar donde residen las células madre epiteliales de la córnea, estaba profundamente alterado en la visita de inicio en todos los casos. Tampoco se observaron diferencias significativas entre los pacientes que recibiría más tarde uno u otro tipo de trasplante celular.
3. Como consecuencia de la experiencia adquirida en el manejo e interpretación de la técnica que ha permitido extraer estas dos primeras conclusiones, se puede concluir que la determinación del fenotipo epitelial en el centro de la córnea mediante MCIV es el signo clínico más objetivo tanto para diagnosticar un SIL como para valorar el éxito de este tipo de terapias celulares, incluso teniendo en cuenta sus limitaciones. Igualmente, la misma técnica aplicada al nicho limbar aporta el diagnóstico definitivo de alteración morfológica de este nicho celular.
4. En este ensayo clínico de prueba de concepto, las células madre mesenquimales de médula ósea alogénicas, tipo celular trasplantado en el denominado MSCT, han resultado tan bien toleradas y eficaces como las células epiteliales limbares cuyo trasplante se ha denominado CLET. Naturalmente, se necesitarán ensayos con mayor número de pacientes en cada una de las patologías responsables de SIL para establecer esta afirmación con absoluta rotundidad.
5. Según los hallazgos obtenidos a través de la MCIV, no es posible recomponer el nicho limbar con los tratamientos de trasplante celulares que, sin embargo, si logran mejorar el fenotipo epitelial en el centro corneal. Con ello, se descarta la posibilidad de que la terapia celular aplicada a la superficie ocular tenga éxito a través de una mejoría morfológica del nicho limbar. Y así, se deberá abordar el

mecanismo de acción de esta terapias a nivel corneal analizando otras posibilidades, ya que a día de hoy, aún se desconoce.

Tesis doctoral: "Estudio mediante microscopía confocal del nicho limbar en pacientes con síndrome de insuficiencia límbica sometidos a trasplante de células madre"

Bibliografía

9. Bibliografía

1. Menzel-Severing J. Emerging techniques to treat limbal epithelial stem cell deficiency. *Discov Med* 2011;11:57–64.
2. Li W, Hayashida Y, Chen YT, Tseng SC. Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell Res* 2007;17:26–36.
3. Liang L, Sheha H, Li J, Tseng SC. Limbal stem cell transplantation: new progresses and challenges. *Eye Lond* 2009;23:1946–1953.
4. Dua HS, Azuara-Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv Ophthalmol* 2000;44:415–425.
5. Torres J, Fernández I, Quadrado MJ, et al. Limbal transplantation: multicenter retrospective case series analysis. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2008;83:417–422.
6. Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, et al. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 1997;349:990–993.
7. López-Paniagua M, Nieto-Miguel T, de la Mata A, et al. Consecutive expansion of limbal epithelial stem cells from a single limbal biopsy. *Curr Eye Res* 2013;38:537–549.
8. López-Paniagua M, Nieto-Miguel T, de la Mata A, et al. Comparison of functional limbal epithelial stem cell isolation methods. *Exp Eye Res* 2016;146:83–94.
9. López-Paniagua M, Nieto-Miguel T, de la Mata A, et al. Successful Consecutive Expansion of Limbal Explants Using a biosafe culture medium under feeder layer-free conditions. *Curr Eye Res* 2016;2:1–11.
10. Ramírez B, Sánchez A, Herreras JM, et al. Stem Cell therapy for corneal epithelium regeneration following good manufacturing and clinical procedures. *Biomed Res Int*. 2015;2015:408495. doi: 10.1155/2015/408495.
11. Nieto-Miguel T, Galindo S, Reinoso R, et al. In vitro simulation of corneal epithelium microenvironment induces a corneal epithelial-like cell phenotype from human adipose tissue mesenchymal stem cells. *Curr Eye Res* 2013;38:933–944.
12. Galindo S, Herreras JM, López-Paniagua M, et al. Regenerative effect of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in experimental corneal failure due to limbal stem cell niche damage. *Stem Cells* 2016.
13. Ramírez BE, Victoria DA, Murillo GM, et al. In vivo confocal microscopy assessment of the corneoscleral limbal stem cell niche before and after biopsy for cultivated limbal

- epithelial transplantation to restore corneal epithelium. *Histol Histopathol* 2015;30:183–192.
14. de la Mata A, Nieto-Miguel T, López-Paniagua M, et al. Chitosan–gelatin biopolymers as carrier substrata for limbal epithelial stem cells. *J Mater Sci Mater Med* 2013;24:2819–2829.
15. Benítez del Castillo J, M Durán de la Colina J, Rodríguez Ares MT. LXXX Ponencia oficial de la sociedad española de oftalmología. 2004.
16. Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. *The Cornea*. Elsevier Mosby. Philadelphia;2010.
17. Alzubaidi R, Sharif MS, Qahwaji R, et al. In vivo confocal microscopic corneal images in health and disease with an emphasis on extracting features and visual signatures for corneal diseases: a review study. *Br J Ophthalmol* 2016;100:41-55.
18. Tseng SC. Concept and application of limbal stem cells. *Eye Lond Engl* 1989;3:141–157.
19. DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg* 2011;37:588–598.
20. Mayer WJ, Irschick UM, Moser P, et al. Characterization of antigen-presenting cells in fresh and cultured human corneas using novel dendritic cell markers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:4459–4467.
21. Villa C, J S. La córnea. Parte I. Estructura, función y anatomía microscópica. *Gaceta Óptica*. nº 454.
22. Duke-Elder S, Wybar KC. *Anatomy of the visual system*. St Louis: Mosby; 1961.
23. Dua HS, Faraj LA, Said DG, et al. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology* 2013;120:1778–1785.
24. Reinoso R, Martín-Sanz R, Martino M, et al. Topographical distribution and characterization of epithelial cells and intraepithelial lymphocytes in the human ocular mucosa. *Mucosal Immunol* 2012;5:455–467.
25. Di Girolamo N, Bosch M, Zamora K, et al. A contact lens-based technique for expansion and transplantation of autologous epithelial progenitors for ocular surface reconstruction. *Transplantation* 2009;87:1571–1578.
26. Sangwan VS. Limbal stem cells in health and disease. *Biosci Rep* 2001;21:385–405.
27. Ahmad S, Osei-Bempong C, Dana R, Jurkunas U. The culture and transplantation of

Tesis doctoral: "Estudio mediante microscopía confocal del nicho limbar en pacientes con síndrome de insuficiencia límbica sometidos a trasplante de células madre"

human limbal stem cells. *J Cell Physiol* 2010;225:15–19.

28. Shortt AJ, Tuft SJ, Daniels JT. Corneal stem cells in the eye clinic. *Br Med Bull* 2011;100:209–225.
29. Di Girolamo N. Stem cells of the human cornea. *Br Med Bull* 2011;100:191-207.
30. Li P, An L, Reif R, et al. In vivo microstructural and microvascular imaging of the human corneo-scleral limbus using optical coherence tomography. *Biomed Opt Express* 2011;2:3109–3118.
31. Thoft RA, Friend J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983;24:1442–1443.
32. Fernández A, Moreno J, Prósper F, et al. [Regeneration of the ocular surface: stem cells and reconstructive techniques]. *Sist Sanit Navar* 2008;31:53–69.
33. Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashammakhi N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med* 2008;2:169–183.
34. Amabile G, Meissner A. Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends Mol Med* 2009;Feb;15:59-68.
35. Thomson, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell line derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145–1147.
36. O'Sullivan F, Clynes M. Limbal stem cells, a review of their identification and culture for clinical use. *Cytotechnology* 2007;53:101–106.
37. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 1997;88:287–298.
38. Secker GA, Daniels JT. Limbal epithelial stem cells of the cornea. *Stem Cell Rev* 2008;4:159–168.
39. Prósper JJ, GJ Herreros G, Rábago R, Luquin J, Moreno JE, RP Redondo. Trasplante celular y terapia regenerativa con células madre. 2006;29:219–234.
40. Ebrahimi M, Taghi-Abadi E, Baharvand H. Limbal stem cells in review. *J Ophthalmic Vis Res* 2009;4:40–58.
41. Tseng SC, Chen SY, Shen YC, et al. Critical appraisal of ex vivo expansion of human limbal epithelial stem cells. *Curr Mol Med* 2010;10:841–850.
42. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007;25:2739–2749.

43. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 1974;2:83–92.
44. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976;4:267–274.
45. Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, et al. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Dev Camb Engl* 2001;128:5181–5188.
46. Kotton DN, Fine A. Derivation of lung epithelium from bone marrow cells. *Cytotherapy* 2003;5:169–173.
47. Spees JL, Olson SD, Ylostalo J, et al. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:2397–2402.
48. Morigi M, Benigni A, Remuzzi G, Imberti B. The regenerative potential of stem cells in acute renal failure. *Cell Transplant* 2006;15 Suppl 1:S111-117.
49. Morigi M, Imberti B, Zoja C, et al. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol JASN* 2004;15:1794–1804.
50. Okamoto R, Yajima T, Yamazaki M, et al. Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat Med* 2002;8:1011–1017.
51. Arnhold S, Absenger Y, Klein H, et al. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells rescue photoreceptor cells in the dystrophic retina of the rhodopsin knockout mouse. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245:414–422.
52. Jackson L, Jones DR, Scotting P, Sottile V. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *J Postgrad Med* 2007;53:121–127.
53. Liu Z-J, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2009;106:984–991.
54. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007;110:3499–3506.
55. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 2003;75:389–397.

Tesis doctoral: "Estudio mediante microscopía confocal del nicho limbar en pacientes con síndrome de insuficiencia límbica sometidos a trasplante de células madre"

56. Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005;21:605–631.
57. Davanger M, Evensen A. Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature* 1971;229:560–561.
58. Ordonez P, Di Girolamo N. Limbal epithelial stem cells: role of the niche microenvironment. *Stem Cells* 2012;30:100–107.
59. Lawrenson JG, Ruskell GL. The structure of corpuscular nerve endings in the limbal conjunctiva of the human eye. *J Anat* 1991;177:75–84.
60. Gipson IK. The epithelial basement membrane zone of the limbus. *Eye* 1989;3:132–140.
61. Shortt AJ, Secker GA, Munro PM, et al. Characterization of the limbal epithelial stem cell niche: novel imaging techniques permit in vivo observation and targeted biopsy of limbal epithelial stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio* 2007;25:1402–1409.
62. Goldberg MF, Bron AJ. Limbal palisades of Vogt. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1982;80:155–171.
63. Bizheva K, Hutchings N, Sorbara L, et al. In vivo volumetric imaging of the human corneo-scleral limbus with spectral domain OCT. *Biomed Opt Express* 2011;2:1794–1802.
64. Vantrappen L, Geboes K, Missotten L, et al. Lymphocytes and Langerhans cells in the normal human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985;26:220–225.
65. Erickson AC, Couchman JR. Still more complexity in mammalian basement membranes. *J Histochem Cytochem* 2000;48:1291–1306.
66. Li G-G, Zhu Y-T, Xie H-T, et al. Mesenchymal stem cells derived from human limbal niche cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53:5686–5697.
67. Jirsova K, Dudakova L, Kalasova S, et al. The OV-TL 12/30 clone of anti-cytokeratin 7 antibody as a new marker of corneal conjunctivalization in patients with limbal stem cell deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:5892–5898.
68. Kolli S, Ahmad S, Lako M, Figueiredo F. Successful clinical implementation of corneal epithelial stem cell therapy for treatment of unilateral limbal stem cell deficiency. *Stem Cells* 2010;28:597–610.
69. Health Quality Ontario. Limbal stem cell transplantation: an evidence-based analysis. *Ont Health Technol Assess Ser*; 2008;8:1-58.

70. Merle H, Gérard M, Schrage N. [Ocular burns]. *J Fr Ophtalmol* 2008;31:723–734.
71. Cavanagh HD, Jester JV, Essepian J, et al. Confocal microscopy of the living eye. *CLAO J* 1990;16:65–73.
72. Garcia I, Etxebarria J, Boto-de-Los-Bueis A, et al. Comparative study of limbal stem cell deficiency diagnosis methods: detection of MUC5AC mRNA and goblet cells in corneal epithelium. *Ophthalmology* 2012;119:923–929.
73. Hong J, Zheng T, Xu J, et al. Assessment of limbus and central cornea in patients with keratolimbal allograft transplantation using in vivo laser scanning confocal microscopy: an observational study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011;249:701–708.
74. Holland, Mannis. Ocular surface disease. Medical and surgical management. Springer. Sacramento.2002.
75. Le QH, Wang WT, Hong JX, et al. An in vivo confocal microscopy and impression cytology analysis of goblet cells in patients with chemical burns. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:1397–1400.
76. López-García JS, Rivas L, García-Lozano I. [Corneal epithelium squamous metaplasia determination as diagnostic factor in limbal deficiency]. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2006;81:281–288.
77. Calonge M, Diebold Y, Sáez V, et al. Impression cytology of the ocular surface: a review. *Exp Eye Res* 2004;78:457–472.
78. Catanese M, Popovici C, Proust H, et al. Fluorescent in situ hybridization (FISH) on corneal impression cytology specimens (CICS): study of epithelial cell survival after keratoplasty. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:1009–1013.
79. Poli M, Janin H, Justin V, et al. Keratin 13 immunostaining in corneal impression cytology for the diagnosis of limbal stem cell deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:9411–9415.
80. Kojima T, Matsumoto Y, Dogru M, Tsubota K. The application of in vivo laser scanning confocal microscopy as a tool of conjunctival in vivo cytology in the diagnosis of dry eye ocular surface disease. *Mol Vis* 2010;16:2457–2464.
81. Inatomi T, Spurr-Michaud S, Tisdale AS, Gipson IK. Human corneal and conjunctival epithelia express MUC1 mucin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:1818–1827.
82. Inatomi T, Spurr-Michaud S, Tisdale AS, et al. Expression of secretory mucin genes

Tesis doctoral: "Estudio mediante microscopía confocal del nicho limbar en pacientes con síndrome de insuficiencia límbica sometidos a trasplante de células madre"

- by human conjunctival epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1684–1692.
83. García I, Etxebarria J, Merayo-Llodes J, et al. Novel molecular diagnostic system of limbal stem cell deficiency based on MUC5AC transcript detection in corneal epithelium by PCR-Reverse Dot Blot. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:5643–5652.
84. Shortt AJ, Secker GA, Rajan MS, et al. Ex vivo expansion and transplantation of limbal epithelial stem cells. *Ophthalmology* 2008;115:1989–1997.
85. Heidelberg Engineering. Heidelberg Retina Tomograph II Operating Instructions Software Version 1.2 Revision 1.2-3E. <https://www.heidelbergengineering.com>. Art. No. 97 051-003; 2005.
86. Nubile M, Lanzini M, Miri A, et al. In vivo confocal microscopy in diagnosis of limbal stem cell deficiency. *Am J Ophthalmol* 2013;155:220–232.
87. Jalbert I, Stapleton F, Papas E, et al. In vivo confocal microscopy of the human cornea. *Br J Ophthalmol* 2003;87:225–236.
88. Javaloy J, Vidal MT, Ruiz-Moreno JM, Alió JL. [Confocal microscopy of the cornea in photorefractive surgery]. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2005;80:497–509.
89. Baudouin C. Contribution in vivo confocal microscopy in exploring the ocular surface. *J Fr Ophthalmol.*; 31(3):308-16
90. Takahashi N, Chikama T-I, Yanai R, Nishida T. Structures of the corneal limbus detected by laser-scanning confocal biomicroscopy as related to the palisades of Vogt detected by slit-lamp microscopy. *Jpn J Ophthalmol* 2009;53:199–203.
91. Rama P, Matuska S, Paganoni G, et al. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Engl J Med* 2010;363:147–155.
92. Dua HS, Miri A, Said DG. Contemporary limbal stem cell transplantation - a review. *Clin Experiment Ophthalmol* 2010;38:104–117.
93. Bakhtiari P, Djalilian A. Update on limbal stem cell transplantation. *Middle East Afr J Ophthalmol* 2010;17:9–14.
94. Miri A, Al-Deiri B, Dua HS. Long-term outcomes of autolimbal and allolimbal transplants. *Ophthalmology* 2010;117:1207–1213.
95. Yavuz B, Bozdağ Pehlivan S, Unlü N. An overview on dry eye treatment: approaches for cyclosporin a delivery. *ScientificWorldJournal* 2012;2012:194848.
96. Fahmy AM, Hardten DR. Treating ocular surface disease: new agents in development. *Clin Ophthalmol Auckl NZ* 2011;5:465–472.

97. Kaštelan S, Tomić M, Salopek-Rabatić J, Novak B. Diagnostic procedures and management of dry eye. *BioMed Res Int* 2013;2013:309723.
98. Anitua E, Sanchez M, Merayo-Llodes J, et al. Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates proliferation and migration of primary keratocytes and conjunctival fibroblasts and inhibits and reverts TGF-beta1-Induced myodifferentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:6066–6073.
99. O’Callaghan AR, Daniels JT. Concise review: limbal epithelial stem cell therapy: controversies and challenges. *Stem Cells*. 2011;29:1923–1932.
100. Burman S, Sangwan V. Cultivated limbal stem cell transplantation for ocular surface reconstruction. *Clin Ophthalmol Auckl NZ* 2008;2:489–502.
101. He H, Yiu SC. Stem cell-based therapy for treating limbal stem cells deficiency: A review of different strategies. *Saudi J Ophthalmol* 2014;28:188–194.
102. Atallah MR, Palioura S, Perez VL, Amescua G. Limbal stem cell transplantation: current perspectives. *Clin Ophthalmol Auckl NZ* 2016;10:593–602.
103. Utheim TP. Concise review: transplantation of cultured oral mucosal epithelial cells for treating limbal stem cell deficiency-current status and future perspectives. *Stem Cells Dayt Ohio* 2015;33:1685–1695.
104. Blazejewska EA, Schlötzer-Schrehardt U, Zenkel M, et al. Corneal limbal microenvironment can induce transdifferentiation of hair follicle stem cells into corneal epithelial-like cells. *Stem Cells*. 2009;27:642–652.
105. Reza HM, Ng B-Y, Gimeno FL, et al. Umbilical cord lining stem cells as a novel and promising source for ocular surface regeneration. *Stem Cell Rev* 2011;7:935–947.
106. Ahmad S, Stewart R, Yung S, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into corneal epithelial-like cells by in vitro replication of the corneal epithelial stem cell niche. *Stem Cells*. 2007;25:1145–1155.
107. Orozco L, Munar A, Soler R, et al. Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study. *Transplantation* 2013;95:1535–1541.
108. Orozco L, Soler R, Morera C, et al. Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: a pilot study. *Transplantation* 2011;92:822–828.
109. Vega A, Martín-Ferrero MA, Del Canto F, et al. Treatment of knee osteoarthritis with allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells: a randomized controlled trial.

Tesis doctoral: "Estudio mediante microscopía confocal del nicho limbar en pacientes con síndrome de insuficiencia límbica sometidos a trasplante de células madre"

Transplantation 2015;99:1681–1690.

110. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315–317.

111. Nieto-Miguel T, Calonge M, de la Mata A, et al. A comparison of stem cell-related gene expression in the progenitor-rich limbal epithelium and the differentiating central corneal epithelium. *Mol Vis* 2011;17:2102–2117.

112. Schiffman RM, Christianson MD, Jacobsen G, et al. Reliability and validity of the Ocular Surface Disease Index. *Arch Ophthalmol Chic Ill* 1960 2000;118:615–621.

113. Mangione CM, Lee PP, Gutierrez PR, et al. Development of the 25-item National Eye Institute Visual Function Questionnaire. *Arch Ophthalmol Chic Ill* 1960 2001;119:1050–1058.

114. Efron N. Grading scales for contact lens complications. *Ophthal Physiol Opt* 1998;18:182–186.

115. Bron AJ, Evans VE, Smith JA. Grading of corneal and conjunctival staining in the context of other dry eye tests. *Cornea* 2003;22:640–650.

116. Dua HS, Miri A, Alomar T, et al. The role of limbal stem cells in corneal epithelial maintenance: testing the dogma. *Ophthalmology* 2009;116:856–863.

117. Araújo AL de, Ricardo JR da S, Sakai VN, et al. Impression cytology and in vivo confocal microscopy in corneas with total limbal stem cell deficiency. *Arq Bras Oftalmol* 2013;76:305–308.

118. Patel DV, Sherwin T, McGhee CNJ. Laser scanning in vivo confocal microscopy of the normal human corneoscleral limbus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:2823–2827.

119. Guthoff RF, Zhivov A, Stachs O. In vivo confocal microscopy, an inner vision of the cornea - a major review. *Clin Exp Ophthalmol* 2009;37:100–117.

120. Mastropasqua L, Nubile M, Lanzini M, et al. Epithelial dendritic cell distribution in normal and inflamed human cornea: in vivo confocal microscopy study. *Am J Ophthalmol* 2006;142:736–744.

121. Miri A, Alomar T, Nubile M, et al. In vivo confocal microscopic findings in patients with limbal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol* 2012;96:523–529.

122. Benítez del Castillo JM, Wasfy MAS, Fernandez C, Garcia-Sanchez J. An in vivo

confocal masked study on corneal epithelium and subbasal nerves in patients with dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:3030–3035.

123. Wakamatsu TH, Sato EA, Matsumoto Y, et al. Conjunctival in vivo confocal scanning laser microscopy in patients with Sjögren syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:144–150.

124. Wang Y, Le Q, Zhao F, et al. Application of in vivo laser scanning confocal microscopy for evaluation of ocular surface diseases: lessons learned from pterygium, meibomian gland disease, and chemical burns. *Cornea* 2011;30 Suppl 1:S25-28.

125. Deng SX, Sejpal KD, Tang Q, et al. Characterization of limbal stem cell deficiency by in vivo laser scanning confocal microscopy: a microstructural approach. *Arch Ophthalmol Chic Ill 1960* 2012;130:440–445.

126. Villani E, Baudouin C, Efron N, et al. In vivo confocal microscopy of the ocular surface: from bench to bedside. *Curr Eye Res* 2014;39:213–231.

127. Chidambaranathan GP, Mathews S, Panigrahi AK, et al. In vivo confocal microscopic analysis of limbal stroma in patients with limbal stem cell deficiency. *Cornea* 2015;34:1478–1486.

128. Kobayashi A, Sugiyama K. In vivo corneal confocal microscopic findings of palisades of Vogt and its underlying limbal stroma. *Cornea* 2005;24:435–437.

129. Romano AC, Espana EM, Yoo SH, et al. Different cell sizes in human limbal and central corneal basal epithelia measured by confocal microscopy and flow cytometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:5125–5129.

130. Schwab IR, Reyes M, Isseroff RR. Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease. *Cornea* 2000;19:421–426.

131. Pedrotti E, Passilongo M, Fasolo A, et al. In vivo confocal microscopy 1 Year after autologous cultured limbal stem cell grafts. *Ophthalmology* 2015;122:1660–1668.

132. Mastropasqua L, Calienno R, Lanzini M, et al. In vivo confocal microscopy of the sclerocorneal limbus after limbal stem cell transplantation: Looking for limbal architecture modifications and cytological phenotype correlations. *Mol Vis* 2016;22:748–760.

133. Vanathi M, Tandon R, Sharma N, et al. In-vivo slit scanning confocal microscopy of normal corneas in Indian eyes. *Indian J Ophthalmol* 2003;51:225–230.

134. Tavakoli M, Hossain P, Malik RA. Clinical applications of corneal confocal

Tesis doctoral: "Estudio mediante microscopía confocal del nicho limbar en pacientes con síndrome de insuficiencia límbica sometidos a trasplante de células madre"

- microscopy. *Clin Ophthalmol Auckl NZ* 2008;2:435–445.
135. Dhaliwal JS, Kaufman SC, Chiou AG. Current applications of clinical confocal microscopy. *Curr Opin Ophthalmol* 2007;18:300–307.
136. Takács L, Tóth E, Berta A, Vereb G. Stem cells of the adult cornea: from cytometric markers to therapeutic applications. *J Int Soc Anal Cytol* 2009;75:54–66.
137. Sejpal K, Bakhtiari P, Deng SX. Presentation, diagnosis and management of limbal stem cell deficiency. *Middle East Afr J Ophthalmol* 2013;20:5-10.
138. Chan EH, Chen L, Rao JY, et al. Limbal basal cell density decreases in Limbal Stem cell deficiency. *Am J Ophtalmol* 2015;160:678-684.
139. Chan EH, Chen L, Yu F, Deng SX. Epithelial thinning in limbal stem cell deficiency. *Am J Ophtalmol* 2015;160:669–677.
140. Schwab IR. Cultured corneal epithelia for ocular surface disease. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1999;97:891–986.
141. Lathrop KL, Gupta D, Kagemann L, et al. Optical coherence tomography as a rapid, accurate, noncontact method of visualizing the palisades of Vogt. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53:1381–1387.
142. Zheng T, Xu J. Age-related changes of human limbus on in vivo confocal microscopy. *Cornea* 2008;27:782–786.
143. Goldberg MF. In vivo confocal microscopy and diagnosis of limbal stem cell deficiency. photographing the palisades of vogt and limbal stem cells. *Am J Ophthalmol* 2013;156:205–206.
144. Lagali N, Edén U, Utheim TP, et al. In vivo morphology of the limbal palisades of Vogt correlates with progressive stem cell deficiency in aniridia-related keratopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:5333–5342.
145. Le Q, Deng SX, Xu J. In vivo confocal microscopy of congenital aniridia-associated keratopathy. *Eye Lond Engl* 2013;27:763–766.
146. Miri A, Mathew M, Dua HS. Quality of life after limbal transplants. *Ophthalmology* 2010;117:638, 638–643.
147. Pauklin M, Fuchsluger TA, Westekemper H, et al. Midterm results of cultivated autologous and allogeneic limbal epithelial transplantation in limbal stem cell deficiency. *Research Projects in Dry Eye Syndrome. Dev Ophthalmol. Basel, Karger;* 2010.

148. Shortt AJ, Bunce C, Levis HJ, et al. Three-year outcomes of cultured limbal epithelial allografts in aniridia and Stevens-Johnson syndrome evaluated using the Clinical Outcome Assessment in Surgical Trials assessment tool. *Stem Cells Transl Med* 2014;3:265–275.
149. Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med* 2000;343:86–93.
150. Majo F, Rochat A, Nicolas M, et al. Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature* 2008;456:250–254.
151. Zakaria N, Possemiers T, Dhubhghaill SN, et al. Results of a phase I/II clinical trial: standardized, non-xenogenic, cultivated limbal stem cell transplantation. *J Transl Med* 2014;12:58.
152. Ha HS, Song KY, Kim JC. Ultrastructural analysis of in vivo expanded corneal epithelium on amniotic membrane. *J Korean Med Sci* 2006;21:544–549.
153. Shimazaki J, Aiba M, Goto E, et al. Transplantation of human limbal epithelium cultivated on amniotic membrane for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2002;109:1285–1290.
154. Pathak M, Cholidis S, Haug K, et al. Clinical transplantation of ex vivo expanded autologous limbal epithelial cells using a culture medium with human serum as single supplement: a retrospective case series. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 2013;91:769–775.
155. Burcu A, Yalniz-Akkaya Z, Ozdemir MF, et al. Surgical rehabilitation following ocular chemical injury. *Cutan Ocul Toxicol* 2014;33:42–48.
156. Prabhasawat P, Ekpo P, Uiprasertkul M, et al. Efficacy of cultivated corneal epithelial stem cells for ocular surface reconstruction. *Clin Ophthalmol Auckl NZ* 2012;6:1483–1492.
157. Sangwan VS, Basu S, Vemuganti GK, et al. Clinical outcomes of xeno-free autologous cultivated limbal epithelial transplantation: a 10-year study. *Br J Ophthalmol* 2011;95:1525–1529.
158. Sangwan VS, Matalia HP, Vemuganti GK, et al. Clinical outcome of autologous cultivated limbal epithelium transplantation. *Indian J Ophthalmol* 2006;54:29–34.
159. Daya SM, Watson A, Sharpe JR, et al. Outcomes and DNA analysis of ex vivo expanded stem cell allograft for ocular surface reconstruction. *Ophthalmology* 2005;112:470–477.

Tesis doctoral: "Estudio mediante microscopía confocal del nicho limbar en pacientes con síndrome de insuficiencia límbica sometidos a trasplante de células madre"

160. Rama P, Bonini S, Lambiase A, et al. Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation* 2001;72:1478–1485.
161. Colabelli Gisoldi RAM, Pocobelli A, Villani CM, et al. Evaluation of molecular markers in corneal regeneration by means of autologous cultures of limbal cells and keratoplasty. *Cornea* 2010;29:715–722.
162. Pellegrini G, Rama P, De Luca M. Vision from the right stem. *Trends Mol Med* 2011;17:1–7.
163. Ramachandran C, Basu S, Sangwan VS, Balasubramanian D. Concise review: the coming of age of stem cell treatment for corneal surface damage. *Stem Cells Transl Med* 2014;3:1160–1168.
164. Sangwan VS, Vemuganti GK, Singh S, Balasubramanian D. Successful reconstruction of damaged ocular outer surface in humans using limbal and conjunctival stem cell culture methods. *Biosci Rep* 2003;23:169–174.
165. Basu S, Mohamed A, Chaurasia S, et al. Clinical outcomes of penetrating keratoplasty after autologous cultivated limbal epithelial transplantation for ocular surface burns. *Am J Ophthalmol* 2011;152:917–924.e1.
166. Shimazaki J, Higa K, Morito F, et al. Factors influencing outcomes in cultivated limbal epithelial transplantation for chronic cicatricial ocular surface disorders. *Am J Ophthalmol* 2007;143:945–953.
167. Subramaniam SV, Sejpal K, Fatima A, et al. Coculture of autologous limbal and conjunctival epithelial cells to treat severe ocular surface disorders: long-term survival analysis. *Indian J Ophthalmol* 2013;61:202–207.
168. Vazirani J, Basu S, Kenia H, et al. Unilateral partial limbal stem cell deficiency: contralateral versus ipsilateral autologous cultivated limbal epithelial transplantation. *Am J Ophthalmol* 2014;157:584-590–2.
169. Sangwan VS, Matalia HP, Vemuganti GK, et al. Early results of penetrating keratoplasty after cultivated limbal epithelium transplantation. *Arch Ophthalmol Chic Ill 1960* 2005;123:334–340.
170. Tsubota K, Satake Y, Kaido M, et al. Treatment of severe ocular-surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 1999;340:1697–1703.
171. Queiroz AG, Barbosa MM, Santos MS, Barreiro TP, Gomes JÁ. Assessment of

- surgical outcomes of limbal transplantation using simple limbal epithelial transplantation technique in patients with total unilateral limbal deficiency. *Arq Bras Oftalmol* 2016;79:116–118.
172. Basu S, Fernandez MM, Das S, et al. Clinical outcomes of xeno-free allogeneic cultivated limbal epithelial transplantation for bilateral limbal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol* 2012;96:1504–1509.
173. Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, et al. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* 2001;108:1569–1574.
174. Dua HS, Azuara-Blanco A. Autologous limbal transplantation in patients with unilateral corneal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol* 2000;84:273–278.
175. Townsend WM. The limbal palisades of Vogt. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1991;89:721–756.
176. Hillenaar T, Cals RHH, Eilers PHC, et al. Normative database for corneal backscatter analysis by in vivo confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:7274–7281.
177. Labbé A, Alalwani H, Van Went C, et al. The relationship between subbasal nerve morphology and corneal sensation in ocular surface disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53:4926–4931.
178. Kaufman SC, Musch DC, Belin MW, et al. Confocal microscopy: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* 2004;111:396–406.
179. Erie JC, McLaren JW, Patel SV. Confocal microscopy in ophthalmology. *Am J Ophthalmol* 2009;148:639–646.
180. Triolo G, Ferrari G, Doglioni C, Rama P. In vivo confocal microscopy in Goldenhar syndrome: a case report. *BMC Ophthalmol* 2013;13:55.
181. Al Farhan HM, Al Otaibi WM, Al Razqan HM, Al Harqan AA. Assessment of central corneal thickness and corneal endothelial morphology using ultrasound pachymetry, non-contact specular microscopy, and Confoscan 4 confocal microscopy. *BMC Ophthalmol* 2013;13:73. doi: 10.1186/1471-2415-13-73
182. McLaren JW, Bourne WM, Patel SV. Standardization of corneal haze measurement in confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:5610–5616.
183. Jullien Bullet. A reproducible automated segmentation algorithm for corneal epithelium cell images from in vivo laser scanning confocal microscopy. *Acta*

Tesis doctoral: "Estudio mediante microscopía confocal del nicho limbar en pacientes con síndrome de insuficiencia límbica sometidos a trasplante de células madre"

Ophthalmol 2014;92:312-316.

184. Chew HF. Limbal stem cell disease: Treatment and advances in technology. Saudi J Ophthalmol 2011;25:213–218.

185. Pellegrini G, Rama P, Di Rocco A, et al. Concise review: hurdles in a successful example of limbal stem cell-based regenerative medicine. Stem Cells. 2014;32:26–34.

186. Shaharuddin B, Ahmad S, Meeson A, Ali S. Concise review: immunological properties of ocular surface and importance of limbal stem cells for transplantation. Stem Cells Transl Med 2013;2:614–624.

187. Kolli S, Lako M, Figueiredo F, et al. Loss of corneal epithelial stem cell properties in outgrowths from human limbal explants cultured on intact amniotic membrane. Regen Med 2008;3:329–342.

188. Zhivov A, Stave J, Vollmar B, Guthoff R. In vivo confocal microscopic evaluation of Langerhans cell density and distribution in the normal human corneal epithelium. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Albrecht Von Graefes Arch Für Klin Exp Ophthalmol 2005;243:1056–1061.

189. Qi X, Xie L, Cheng J, et al. Characteristics of immune rejection after allogeneic cultivated limbal epithelial transplantation. Ophthalmology 2013;120:931–936.

190. Niederer RL, Perumal D, Sherwin T, McGhee CNJ. Age-related differences in the normal human cornea: a laser scanning in vivo confocal microscopy study. Br J Ophthalmol 2007;91:1165–1169.



FECHA: 31 de enero de 2011

ASUNTO: Orden SAS/2377/2010, de 7 de septiembre, por la que se aprueba la convocatoria correspondiente al año 2010 de concesión de ayudas para el fomento de la investigación clínica independiente

REMITENTE:

JEFE DE AREA DE LA UNIDAD DE SUBVENCIONES PARA LA INVESTIGACION

DIRECCION GENERAL DE FARMACIA Y PRODUCTOS SANITARIOS

DESTINATARIO: Universidad de Valladolid

Plaza de Santa Cruz 8
47002 Valladolid



CC: Margarita Calonge Cano

TÍTULO: EC10-256 Terapias avanzadas para la reconstrucción de la superficie ocular. Trasplante alogénico de células madre epiteliales limbares (TACM-EL) frente a mesenquimales de médula ósea (TACM-MO): ensayo clínico randomizado y doble-enmascarado

Como continuación de la resolución del Ministerio de Sanidad y Política Social por la que se ha aprobado la relación definitiva de resultados de la convocatoria 2010 de acuerdo con lo establecido por la Orden SAS/2377/2010, de 7 de septiembre, por la que se aprueba la convocatoria correspondiente al año 2010 de concesión de ayudas para el fomento de la investigación clínica independiente le comunicamos lo siguiente:

- El plazo de ejecución de las ayudas es de un año de duración y comprenderá desde el 1 de enero de 2011 al 31 de diciembre de 2011.
- Las partidas presupuestarias concedidas para este proyecto son las siguientes:

Gastos de personal	0,00 €
Gastos de equipamiento	0,00 €
Gastos de material inventariable	0,00 €
Gastos de material fungible	53.100,00 €
Subcontratación (CRO)	30.245,00 €
Seguro	10.000,00 €
Adquisición/fabricación MI	140.155,00 €





Gastos autorizaciones administrativas	3.000,00 €
Gastos de publicación/difusión	5.000,00 €
Otros gastos	0,00 €
Viajes y dietas	3.500,00 €
Subcontrataciones derivadas	0,00 €
Gastos generales	0,00 €
Costes indirectos	5.000,00 €
Total concedido	250.000,00 €

- La documentación justificativa final del proyecto se llevará a cabo a través de la presentación de cuenta justificativa con aportación de informe de auditor, que los beneficiarios deberán remitir en un plazo no superior a SEIS meses desde la finalización del plazo de ejecución. Las memorias finales científicas y económicas se presentarán a la Unidad de Subvenciones para la Investigación de la Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios, Paseo del Prado 18-20 28014 Madrid. El incumplimiento de las obligaciones de reembolso dará lugar a la revocación del préstamo y al reintegro del importe percibido más los correspondientes intereses de demora.

LA JEFE DE AREA DE LA
UNIDAD DE SUBVENCIONES
PARA LA INVESTIGACIÓN



Fdo. Natividad Calvente Cestafe



COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

ÁREA DE SALUD VALLADOLID – ESTE (CEIC-VA-ESTE-HCUV)

Valladolid a 20 de Diciembre de 2012

En la reunión del CEIC del Área de Valladolid – Este de 20 de Diciembre de 2012, se procedió a la evaluación de una modificación relevante del siguiente Ensayo Clínico del cual vosotros sois el CEIC de Referencia.

Código en el Hospital Clínico Universitario CASVE 11-108

TERAPIAS AVANZADAS PARA LA RECONSTRUCCIÓN DE LA SUPERFICIE OCULAR. TRASPLANTE ALOGÉNICO DE CÉLULAS MADRE EPITELIALES LIMBARES (TACMLE) FRENTE A MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA (TACM-MO): ENSAYO CLÍNICO RANDOMIZADO Y DOBLE-ENMASCARADO.

Enmienda Relevante 2, de 1 de Diciembre de 2012.

Protocolo Versión 3, de 1 de diciembre de 2012.

Hoja de información al paciente y consentimiento informado, versión 02 de fecha 1 de diciembre de 2012.

A continuación señalo los acuerdos del citado El CEIC del ÁREA DE SALUD VALLADOLID – ESTE en relación a dicho Ensayo Clínico

Se aprueban las modificaciones.

Un cordial saludo.

F. Javier Álvarez

Prof. F. Javier Álvarez.

Secretario

CEIC Área de Valladolid – Este (CEIC-VA-ESTE-HCUV)

Farmacología

Facultad de Medicina,

Universidad de Valladolid,

c/ Ramón y Cajal 7,

47005 Valladolid

alvarez@med.uva.es

jalvarezgo@saludcastillayleon.es

tel: 983 423077





**COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA
HOSPITAL CLINICO UNIVERSITARIO DE VALLADOLID**

Dr. Francisco Javier Álvarez González, Secretario Técnico del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (Área de Salud de Valladolid Este).

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del promotor IOBA, para que se realice el ensayo clínico titulado:

“TERAPIAS AVANZADAS PARA LA RECONSTRUCCIÓN DE LA SUPERFICIE OCULAR. TRASPLANTE ALOGÉNICO DE CÉLULAS MADRE EPITELIALES LIMBARES (TACM-LE) FRENTE A MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA (TACM-MO): ENSAYO CLÍNICO RANDOMIZADO Y DOBLE-ENMASCARADO”.

Código de protocolo: IOBA-05-2010

Nº EudraCT: 2010-023535-42

Versión: 1

Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado: versión española 1 (18/Abril/2011)

y considera que:

El ensayo se plantea siguiendo los requisitos del Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero y las normas que lo desarrollan y su realización es pertinente.

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, teniendo en cuenta los beneficios esperados.

El seguro o la garantía financiera previstos son adecuados.

El procedimiento para obtener el consentimiento informado, incluyendo la hoja de información para los sujetos y el plan de reclutamiento de sujetos previstos son adecuados, así como las compensaciones previstas para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el ensayo.

La capacidad del investigador y sus colaboradores y las instalaciones y medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.

Por tanto, este CEIC como comité único implicado en la evaluación del citado ensayo clínico, **ACEPTA** que dicho ensayo clínico sea realizado en el IOBA de Valladolid por los investigadores principales que se relacionan a continuación.



IOBA – Dra Margarita Calonge Cano

Lo que firmo en Valladolid, a 28 de abril de 2011

F. Javier Álvarez

Dr. F. Javier Álvarez.
Secretario Técnico
CEIC Hospital Clínico Universitario de Valladolid
Farmacología
Facultad de Medicina,
Universidad de Valladolid,
c/ Ramón y Cajal 7,
47005 Valladolid
alvarez@med.uva.es
jalvarezgo@saludcastillayleon.es
tel: 983 423077

Nº REF: DICTAMEN CEIC HCUV-CASVE-11-108-28-ABRIL-2011



SUBDIRECCIÓN GENERAL
DE MEDICAMENTOS
DE USO HUMANO

REFERENCIA: MUH/CLIN

FECHA: 17/06/2011

ASUNTO: RESOLUCION DE AUTORIZACIÓN DE ENSAYO CLINICO

DESTINATARIO:

Trial Form Support
D^a Nurla Bordas
c/ Consell de Cent 334-336 4^opl
08009 Barcelona
España

Adjunto se remite la resolución sobre el ensayo clínico titulado "Terapias avanzadas para la reconstrucción de la superficie ocular. Trasplante alogénico de células madre epiteliales limbares (TACM-LE) frente a mesenquimales de médula ósea (TACM-MO): ensayo clínico randomizado y doble-enmascarado", N^o EudraCT "2010-023535-42".

El promotor o solicitante nombrado por éste deberá remitir la información pertinente o solicitar autorización a la AEMPS- según proceda y de acuerdo con lo que establece el Real Decreto 223/2004, de las modificaciones relevantes a la documentación del ensayo, informes de seguimiento, sospechas de reacciones adversas graves e inesperadas, finalización del ensayo y demás circunstancias que establezca la legislación vigente.

CÓRREO ELECTRÓNICO

aeceaem@aemps.es

C/ CAMPEZO, 1
28022 MADRID
TEL: 91 8225174 / 5215
FAX: 91 8225076



DIRECCION DE LA
AGENCIA ESPAÑOLA
DE MEDICAMENTOS Y
PRODUCTOS SANITARIOS

Fecha: 17/06/2011

Referencia: MUH/CLIN

RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DEL ENSAYO CLINICO Nº EudraCT 2010-023535-42

**DESTINATARIO: Universidad de Valladolid. Unidad de Terapias Avanzadas IOBA/IBGM
Dra. Margarita Calonge Cano
Edificio IOBA, Campus Universitario Miguel Delibes
Paseo de Belén, 17
47011 Valladolid**

Vista la solicitud formulada por Trial Form Support para la realización del ensayo clínico número EudraCT 2010-023535-42 titulado "Terapias avanzadas para la reconstrucción de la superficie ocular. Trasplante alogénico de células madre epiteliales limbares (TACM-LE) frente a mesenquimales de médula ósea (TACM-MO): ensayo clínico randomizado y doble-enmascarado", código de protocolo del promotor IOBA-05-2010, cuyo promotor es Universidad de Valladolid. Unidad Terapias Avanzadas IOBA/IBGM se emite resolución a tenor de los siguientes

ANTECEDENTES DE HECHO

PRIMERO: Con fecha 22/11/2010 presenta solicitud de autorización de ensayo clínico.

SEGUNDO: Con fecha 02/12/2010 se solicita que subsanen la documentación inicial y el 28/12/2010 se envía validación de la misma.

TERCERO: Con fecha 10/03/2011 se han solicitado aclaraciones que han sido respondidas de forma satisfactoria el 31/03/2011.

CUARTO: A la solicitud de ensayo se acompaña solicitud de calificación del medicamento células progenitoras del limbo esclerocorneal como producto en fase de investigación clínica.

A estos antecedentes de hechos le son de aplicación los siguientes:

FUNDAMENTOS DE DERECHO:

Único. Son de aplicación al presente procedimiento la Ley 30/1992, de 26 de noviembre, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común, modificada por la Ley 4/1999, de 13 de enero; la Ley 12/2000, de 29 de diciembre de medidas fiscales, administrativas y de orden social; Ley 29/2006, de 26 de julio, de Garantías y Uso Racional de Medicamentos y Productos Sanitarios; el Real Decreto 223/2004 de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos; el Real Decreto 520/1999, de 26 de marzo, por el que se aprueba el Estatuto de la Agencia Española del Medicamento, y demás normas aplicables,

MINISTERIO
DE SANIDAD,
POLÍTICA SOCIAL E
IGUALDAD
Agencia española de
medicamentos y
productos sanitarios



DIRECCION DE LA
AGENCIA ESPAÑOLA
DE MEDICAMENTOS Y
PRODUCTOS SANITARIOS

Así, del expediente se deduce que se cumplen los requisitos establecidos para su autorización de acuerdo con el del Real Decreto 223/2004.

Asimismo, el artículo 24 del Real Decreto 223/2004, establece que cuando se autorice un ensayo con medicamentos en investigación, se hará constar en la autorización del mismo la calificación de dicho medicamento como producto en fase de investigación clínica.

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

1º.- AUTORIZAR la realización de este ensayo clínico número EudraCT 2010-023535-42,

2º.- CALIFICAR el medicamento células progenitoras del limbo esclerocorneal como producto en fase de investigación clínica, asignándole el nº de PEI 09-137 con la indicación: Insuficiencia límbica severa unilateral.

Observaciones:

El solicitante deberá presentar el protocolo o protocolos que se seguirán para la detección de virus en el sobrenadante del cultivo al final de la etapa de expansión, tal como se menciona en el punto 3 de la respuesta a la aclaración de calidad.

Contra esta Resolución, que pone fin a la vía administrativa, puede interponerse potestativamente Recurso de Reposición ante el/la Director/a de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios en el plazo de un mes, conforme a lo dispuesto en el artículo 116 de la Ley 30/1992, de 26 de noviembre, de Régimen Jurídico de las Administraciones públicas y del Procedimiento Administrativo Común, o interponerse Recurso Contencioso-Administrativo ante el Juzgado Central de lo Contencioso-Administrativo de Madrid, en el plazo de dos meses a contar desde el día siguiente a la recepción de la presente notificación, conforme a lo dispuesto en la Ley Reguladora de la Jurisdicción Contencioso-Administrativa de 13 de julio de 1998, y sin perjuicio de cualquier otro recurso que pudiera interponerse.

LA DIRECTORA DE LA AGENCIA ESPAÑOLA
DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS

am agencia española de
medicamentos y
productos sanitarios
Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad

D.ª. Belén Crespo Sánchez-Eznarriaga

MINISTERIO
DE SANIDAD,
POLÍTICA SOCIAL E
IGUALDAD
Agencia española de
medicamentos y
productos sanitarios

ClinicalTrials.gov Protocol and Results Registration System (PRS) Receipt
Release Date: 01/07/2015

Safety Study of Stem Cell Transplant to Treat Limbus Insufficiency Syndrome

This study has been completed.

Sponsor:	Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada
Collaborators:	University of Valladolid University of Valladolid Centro en Red de Medicina Regenerativa de Castilla y Leon Red de Terapia Celular
Information provided by (Responsible Party):	Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada
ClinicalTrials.gov Identifier:	NCT01562002

► Purpose

The purpose of the study is to determine whether allogenic bone marrow stem cell transplant is safe and effective in the treatment of limbus insufficiency syndrome versus allogenic limbus stem cell transplant.

Condition	Intervention	Phase
Limbus Corneae Insufficiency Syndrome	Procedure/Surgery: Stem Cell with Amniotic Membrane Transplant	Phase 1/ Phase 2

Study Type: Interventional

Study Design: Treatment, Parallel Assignment, Double Blind (Subject, Investigator), Randomized, Safety/Efficacy Study

Official Title: Advanced Therapy for Ocular Surface Reconstruction. Allogenic Limbus Epithelial Stem-cell Transplant vs Bone Marrow Mesenchymal Stem-cell Transplant in Limbus Insufficiency Syndrome. Double-masked Randomized Trial

Further study details as provided by Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada:

Primary Outcome Measure:

- Viability and safety of mesenchymal stem cell transplant [Time Frame: 1 Year] [Designated as safety issue: Yes]
Absence of cell metaplasia with phenotype different to corneal or conjunctival as expected, confirmed by corneal impression cytology and in vivo confocal laser ophthalmoscopy

Secondary Outcome Measures:

- Absence of complications in pre and peri surgical implantation [Time Frame: 1 Week] [Designated as safety issue: Yes]
Correct handling and implantation of stem cell with amniotic membrane transplant following an 4 step classification.

- Improvement of 2 lines in Best Corrected Visual Acuity [Time Frame: 12 month] [Designated as safety issue: No]
Improvement in visual acuity compared to baseline values before transplant

Enrollment: 27

Study Start Date: March 2012

Primary Completion Date: December 2014

Study Completion Date: December 2014

Arms	Assigned Interventions
Experimental: Bone Marrow mesenchymal stem cell Allogenic Bone Marrow mesenchymal stem cell in amniotic membrane transplant	Procedure/Surgery: Stem Cell with Amniotic Membrane Transplant Single stem cell expansion in amniotic membrane transplant
Active Comparator: Allogenic limbal stem cell Transplant Stem Cell with Amniotic Membrane Transplant	Procedure/Surgery: Stem Cell with Amniotic Membrane Transplant Single stem cell expansion in amniotic membrane transplant

► Eligibility

Ages Eligible for Study: 18 Years and older

Genders Eligible for Study: Both

Accepts Healthy Volunteers: No

Criteria

Inclusion Criteria:

- Male or Female older than 18 years.
- Signed Informed consent
- Negative pregnancy test at inclusion for any potential childbearing female.
- Compromise of contraceptive method during all trial for any potential childbearing female.
- Diagnosis of Ocular Surface Failure due to Limbus Insufficiency Syndrome, based in any of the published characteristics as corneal surface neovascularization, loss of corneal transparency, epithelial irregularities, history of punctate keratitis, erosions or repetitive ulcers and presence of symptoms and confirmed by the presence of epithelial phenotype cells assessed with conjunctival impression cytology.
- Availability for all the scheduled visits during the study

Exclusion Criteria:

- Uncontrolled systemic disease (e.g. hypertension or diabetes) or any disease that under medical decision might put the patient at risk during the surgery or follow-up examinations or may cause any hazard in data analysis.
- Active ocular infection in any eye. If the infection can be cured, inclusion can be considered after 30 days of inactive infection since its end.
- Alterations in lid statics / dynamics or any other pathology (e.g. severe dry eye syndrome) except the one that originated the Limbus Insufficiency that under medical opinion might alter the results. Any of these must be corrected 3 months prior to patient inclusion, before reconsidering rescreening.
- Limbus insufficiency syndrome which has not been previously treated with all medical (not surgical) procedures available.
- No availability for all scheduled visits during the study.
- Any other circumstance under investigator's opinion that prevents patient inclusion even though normal inclusion and exclusion criteria are met.

► Contacts and Locations

Locations

Spain

IOBA

Valladolid, Valladolid, Spain, 47011

Investigators

Principal Investigator:

Margarita Calonge, MD, PhD

IOBA

 **More Information**

Responsible Party: Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada

Study ID Numbers: IOBA-05-2010

Health Authority: Spain: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Estudio: Ensayo Clínico Fase I-II. "Terapias avanzadas para la reconstrucción de la superficie ocular. Trasplante alogénico de células madre epiteliales limbares (TACM-LE) frente a mesenquimales de médula ósea (TACM-MO): ensayo clínico randomizado y doble-enmascarado"

Nº de estudio: IOBA-005-2010

Coordinador: IOBA (Instituto de Oftalmobiología Aplicada)

Se le ha invitado a participar en un ensayo clínico coordinado por el IOBA para pacientes que padecen Síndrome de insuficiencia límbica (SIL). El SIL engloba todas las causas de ceguera corneal debidas a un fallo de la regeneración normal de la superficie del ojo por fracaso de las células madre de la capa superficial (epitelio) de la córnea, que se encuentran en el limbo esclero-corneal (zona circular límite entre la córnea transparente y las capas opacas circundantes)

El paciente que llega a esta situación se enfrenta a una disminución seria de la visión, acompañada de dificultad para soportar la luz (fotofobia) y episodios repetidos de dolor intenso. Ello se debe a una inflamación crónica de la superficie ocular, pues la capa superficial de la cornea ya no puede regenerarse al ritmo rápido necesario en condiciones normales (5-7 días). Esto genera que se ulcera con frecuencia. La conjuntiva (membrana translúcida que recubre la parte blanca de la superficie del ojo 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 vasos sanguíneos que, aunque necesarios para la cicatrización, conllevan también la pérdida irreversible de la transparencia corneal y por ello de la visión.

Este formulario de consentimiento describe el estudio y su papel en él. El investigador responderá todas las preguntas que tenga referentes al estudio y sus procedimientos. Por favor, lea atentamente este formulario y realice todas las preguntas que tenga sobre la información que contiene.

1. OBJETIVO DEL ESTUDIO

El objetivo de este estudio clínico es demostrar la seguridad del trasplante de células madre mesenquimales de médula ósea procesadas (MSV) y de carácter alogénico (es decir, procedente de otro individuo) crecidas sobre membrana amniótica (ésta se utiliza habitualmente en Oftalmología para varios procesos y su uso está plenamente autorizado), previamente preparadas en una Unidad de Procesamiento Celular acreditada y siguiendo "normas de buenas prácticas de fabricación", como medida para restaurar la ceguera corneal debida al fracaso de las células madres epiteliales de la córnea, patología denominada Síndrome de Insuficiencia Límbica (SIL).

El tratamiento control es el trasplante de células madre epiteliales de la córnea, extraídas de un limbo sano procedente de cadáver (alogénico), crecidas igualmente sobre una membrana amniótica y en la misma Unidad de Procesamiento Celular.

Al ser el donante otro ser humano (trasplante alogénico), es preciso prevenir el rechazo. Para ello es necesario emplear ciertos medicamentos inmunomoduladores por vía oral a dosis bajas, y aproximadamente durante un año. El fármaco a elegir dependerá de las características del paciente. En cualquier caso, y en términos generales, estos productos son exhaustivamente controlados mediante análisis de sangre y orina cada dos meses, por lo que los efectos secundarios, entre los que pueden encontrarse alteraciones hepáticas y renales, hipertensión arterial, y ojo seco son escasos.

La finalidad de este procedimiento es recuperar la normalidad del epitelio corneal y, como consecuencia, en muchas ocasiones se podrá también recuperar visión. Esto no será posible solo con esta cirugía si además tuviera las capas mas profundas de la corea afectadas, en cuyo caso requerirá, posteriormente, un trasplante de córnea.

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

En ocasiones, la falta de transparencia impide ver el estado de la retina y nervio óptico previo a la cirugía, por lo que el resultado de la cirugía no puede garantizarse.

Se realizará un solo procedimiento quirúrgico, que se llevará a cabo cuando exista crecimiento suficiente de las células madre, momento en el que se procederá a la cirugía de trasplante de limbo expandido o células mesenquimales de médula ósea en el ojo enfermo.

A juicio del investigador, en los siguientes casos podría repetirse la cirugía:

- Pacientes que pierdan el trasplante en la primera semana.
- Pacientes a los que se decida re-intervenir a partir de los 6 meses si se juzga que no ha habido eficacia y que esa falta de eficacia está poniendo en riesgo la viabilidad de la córnea afectada, con riesgo de infección secundaria y, por ello, de pérdida de la córnea.

La anestesia será siempre local, nunca general, salvo excepciones a juicio del especialista en anestesia.

Se le está pidiendo que participe en un ensayo clínico que está diseñado como unicéntrico, aleatorizado (la asignación del tratamiento es al azar) y enmascarado (ni el paciente ni los investigadores evaluadores conocerán que tipo celular habrá recibido, únicamente lo conocerán los investigadores de la Unidad de Procesamiento Celular que, en ningún caso, tienen contacto con el paciente ni participan en su evaluación). Se plantea la realización de trasplantes alogénicos de células madre oculares (limbares o epiteliales de córnea) o extraoculares (mesenquimales de médula ósea), previamente expandidas y siguiendo exclusivamente normas de buenas práctica de fabricación.

2. DURACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DEL SUJETO

El estudio finalizará cuando el último paciente incluido finalice 1 año de seguimiento, en los que se les realizará un mínimo de 8 visitas programadas de estudio. Cuando todos los pacientes tengan 1 año de seguimiento, se recogerán los datos existentes hasta ese momento para realizar el estudio estadístico y posterior divulgación científica.

3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Para que se considere su inclusión en el estudio, deberá cumplir por lo menos los siguientes requisitos:

- Varón o mujer mayor de 18 años que entiendan y firmen el consentimiento informado.
- Diagnóstico de SIL mediante los criterios clínicos establecidos publicados.
- Haber entendido y firmado el consentimiento informado del estudio y de las técnicas diagnósticas y quirúrgicas que se precisen.
- Capacidad para seguir todas las instrucciones y completar las visitas programadas.

4. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Usted NO podrá participar en el estudio en caso de que se presente cualquiera de las siguientes circunstancias:

- Mujeres en periodo de lactancia.
- Mujeres en edad fértil con prueba de embarazo en orina positiva en la primera visita, o que deseen quedarse embarazadas durante el transcurso del estudio. Además, las mujeres en edad fértil deberán comprometerse a usar un método anticonceptivo eficaz durante toda la duración del estudio.
- Enfermedad sistémica descontrolada (por ej. hipertensión o diabetes) o cualquier enfermedad que, a juicio del anestesiólogo responsable de las evaluaciones preoperatorias o del médico oftalmólogo, pudiera poner en riesgo al paciente o la interpretación de los resultados.
- Infección ocular activa en cualquiera de los dos ojos, diferente a la que pudiera ser causa de la indicación para el trasplante de células madre propuesto en este estudio. Si se trata de un proceso erradicable, se podrá considerar su inclusión 30 días mínimo tras su curación.
- Alteraciones de la estática o dinámica palpebral o cualquier otra patología (por ej. síndrome de ojo seco) a excepción de la que ha originado el SIL en cualquiera de los dos ojos que, a juicio del oftalmólogo,

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

podieran interferir con un resultado satisfactorio. Estas deben corregirse al menos 3 meses antes de la inclusión del paciente, pudiendo volver a considerarse su inclusión.

- SIL que no haya sido tratado antes con todos los medios médicos (no quirúrgicos) disponibles.
- Alteraciones cognitivas que pudieran interferir con el cumplimiento del estudio.
- A juicio del investigador principal, en alguna otra circunstancia no recogida en este apartado que desaconseje su participación en este estudio.

Usted podrá retirarse del estudio siempre que lo desee.

5. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

A – Visita de inclusión

En su primera visita de estudio se le examinará para garantizar su participación en el estudio y se recogerá información sobre usted:

- Se hablará con usted sobre el estudio, y se le pedirá que firme este formulario de consentimiento antes de iniciar su participación en este estudio del cual se le dará una copia.
- Se le preguntará sobre su actual estado de salud, sus antecedentes médicos e historia ocular (incluyendo antecedentes de lesiones, enfermedades y cirugía). También se le harán algunas preguntas sobre los medicamentos que pueda estar tomando (tanto prescritos como sin prescripción médica).
- Si usted es una mujer en edad fértil se le hará una prueba de embarazo en orina que deberá resultar negativa para poder incluirse en el estudio. En caso contrario no se continuará con la visita.
- Se le pedirá que cumplimente 2 cuestionarios sobre sus síntomas oculares.
- Se le someterá a los siguientes exámenes oculares (todos indoloros) en ambos ojos a menos que se indique de otra manera:
 - Prueba de agudeza visual.
 - Se medirá la presión ocular.
 - Examen ocular minucioso de la parte anterior y posterior de su ojo (la exploración de la parte posterior de su ojo necesita gotas oftálmicas para dilatar su pupila).
 - Fotografías de la parte anterior de ambos ojos.
 - Tinciones corneales y conjuntivales con 2 tipos de colorantes usados en la práctica oftalmológica habitual y que no presentan posibilidad de riesgo alguno.
 - Medición de la producción de lágrima, mediante la inserción en los fondos de saco inferiores de tiras estandarizadas del test de la lágrima de Schirmer.
 - Citología por impresión corneal, que consiste en la aplicación de un papel filtro sobre la córnea del ojo enfermo previa la colocación de gotas de anestésico.
 - Microscopía confocal en ambos ojos, que consiste en la visualización de las estructuras microscópicas de la córnea (células, nervios etc.).

B- Día del trasplante de células expandidas

- El procedimiento será llevado a cabo en un quirófano del IOBA, siguiendo las normas establecidas para intervenciones quirúrgicas oftalmológicas.
- La anestesia será loco-regional, salvo que se indique de otra manera por el especialista en anestesia..
- Se le preparará la superficie ocular dejándola limpia para poder recibir el trasplante de membrana amniótica (especie de telilla) donde se encuentran sembradas las células madres.
- Se le colocaran puntos de sutura para mantener en su sitio la membrana.
- Se le administrará gotas de antibióticos y antiinflamatorios y por último se le colocará una lente de contacto.
- Será evaluado a las 24 horas y a los 7 días, según esquema de visita.

C- Visita de seguimiento post cirugía (D1)

- Se le preguntará sobre su estado de salud ocular (ojo) desde su última visita.
- Se le someterá a los siguientes exámenes oculares en ambos ojos:

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

- Examen ocular minucioso de la parte anterior.
- Se le teñirá ambos ojos con colorantes vitales
- Se le tomaran fotos de ambos ojos.

D- Visitas de Seguimiento (Días 7,14, 21 y Meses 1, 2, 3, 4, 5, 8 y 10)

Usted acudirá al IOBA transcurridos 1 y 7,14, 21 días y después de 1, 2 y 3 meses del procedimiento. En estas visitas se someterá a los siguientes procedimientos:

- Se le preguntará sobre su estado de salud ocular (ojo) desde su última visita.
- Se le pedirá que rellene dos cuestionarios sobre su visión (sólo al mes 1)
- Se le someterá a los siguientes exámenes oculares en ambos ojos:
 - Prueba de agudeza visual
 - Examen ocular minucioso de la parte anterior.
 - Se le teñirá ambos ojos con colorantes vitales.
 - Se le tomaran fotos de ambos ojos.
 - Se le realizará microscopía confocal de la cornea de ambos ojos en los meses 3, 6 y 12, a criterio del investigador principal.

E- Visita de Seguimiento Mes 6, 12

Durante esta visita:

- Se le preguntará sobre su estado de salud en general y ocular (ojo) desde su última visita
- Se le pedirá que rellene dos cuestionarios sobre su visión.
- Se le someterá a los siguientes exámenes oculares en ambos ojos:
 - Prueba de agudeza visual.
 - Se medirá la presión ocular.
 - Examen ocular minucioso de la parte anterior y posterior de su ojo (la exploración de la parte posterior de su ojo puede necesitar gotas oftálmicas para dilatar su pupila).
 - Se le teñirá ambos ojos con colorantes vitales.
 - Se le realizará citología de impresión conjuntival del ojo donde se realizó el trasplante.
 - Medición de la producción de lágrima, mediante la inserción en los fondos de saco inferiores de tiras estandarizadas del test de la lágrima de Schirmer.
 - Se le realizará microscopía confocal de la cornea de ambos ojos. Esta prueba se llevará cabo siempre y cuando, a juicio del investigador, no se vea afectado el desarrollo celular del implante.
 - Se le tomaran fotos de ambos ojos.

F- Visitas sin programar

Si usted, o su medico del estudio cree necesario realizar otra visita, entre visitas programadas, se programará otra cita con usted. Si su medico lo estima necesario podrá precisar pruebas adicionales.

G- Sus Responsabilidades

Usted deberá acudir todas las visitas del estudio y avisar al centro, tan pronto como pueda, si por cualquier motivo no pudiera acudir a alguna de estas visitas. Se le pedirá que comunique cualquier cambio en su medicación (con o sin prescripción médica) y comunicar a su médico cualquier cambio que usted experimente. Deberá responder a todas las preguntas de los cuestionarios sinceramente. Y por último deberá notificar al médico encargado del estudio cualquier urgencia o ingreso hospitalario no programado.

6. RIESGOS Y MOLESTIAS RAZONABLEMENTE PREVISIBLES PARA PARTICIPANTE

Riesgos del Estudio

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

La realización de esta cirugía pudiera suponer una mejoría sustancial de la sintomatología del paciente, y en algunos casos, de la agudeza visual y de la calidad de la visión, dependiendo los resultados del estado de otras estructuras del globo ocular, como son la retina y el nervio óptico.

En la anestesia loco-regional, el anestésico se inyecta en las estructuras perioculares. Puede haber complicaciones en el momento de la inyección como son la hemorragia retrobulbar, oclusión de la arteria central de la retina, lesión del nervio óptico, perforación ocular, depresión cardiorespiratoria y reacción tóxico-alérgica. También puede desarrollarse una diplopía como complicación tardía.

El trasplante de limbo alogénico y de células mesenquimales expandidas es un procedimiento quirúrgico en el que podrían existir complicaciones durante la misma como son, fundamentalmente, la perforación ocular, circunstancia que obliga a modificar el curso normal de la cirugía.

Otras complicaciones que pueden aparecer en el postoperatorio son: endoftalmítis, dehiscencias de sutura, fracaso primario del injerto, infección postoperatoria de la córnea, glaucoma, diplopía (por la anestesia retrobulbar), ptosis; la mayoría de las cuales precisan de otro procedimiento quirúrgico para su resolución.

Al ser el donante en ambas situaciones otro ser humano, es preciso prevenir el rechazo. Para ello es necesario emplear ciertos medicamentos por vía sistémica durante aproximadamente un año. El fármaco a elegir dependerá de las características del paciente. En cualquier caso, y en términos generales, estos productos pueden ocasionar inmunosupresión, alteraciones hepáticas o alteraciones renales, entre otras. Estas complicaciones son poco frecuentes, y en la mayoría de los casos se previenen mediante la monitorización periódica del paciente.

Si usted tiene alguna pregunta o preocupación sobre cualquiera de estos riesgos, por favor consulte a su médico.

7. CONFIDENCIALIDAD

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

8. FOTOGRAFÍAS

Durante el estudio pueden realizarse fotografías de sus ojos. Si usted no quiere que se le hagan estas fotografías, no podrá participar en el estudio.

El IOBA puede utilizar las fotografías que se han tomado para evaluar los resultados del estudio y/o para investigación general, enseñanza u objetivos informativos. Como las fotografías forman parte de los datos del estudio, también estarán disponibles para su revisión por parte de las agencias sanitarias reguladoras (como la europea EMA o la española AEMPS). El IOBA será el propietario de los derechos de autor de las fotografías.

Por favor, señale **una** casilla:

- Si, autorizo que me fotografíen los ojos. El IOBA también tiene mi permiso para utilizar estas fotografías en publicaciones científicas y en congresos nacionales e internacionales.
- Si, autorizo que me fotografíen los ojos. Sin embargo NO autorizo a que se utilicen estas fotografías en publicaciones científicas y en congresos nacionales e internacionales.
- No autorizo a que me fotografíen los ojos. He decidido no participar en el estudio.

9. COMPENSACIÓN AL TRATAMIENTO MÉDICO

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

Si Usted experimenta una reacción adversa y/o complicación como resultado directo del trasplante realizados en este estudio, el IOBA será responsable económico de los costes de los tratamientos médico y quirúrgico habituales proporcionados como resultado de dicho daño. El tratamiento apropiado estará disponible si se requiere. El promotor no dará ninguna otra compensación.

En cumplimiento con la normativa vigente en España (R.D. 223/2004 de 6 Febrero de 2004) art. 8 acerca del seguro de Ensayos Clínicos, el promotor (IOBA Fundación General de la Universidad de Valladolid) tiene concertado un seguro con HDI HANNOVER INTERNATIONAL (ESPAÑA) SEGUROS Y REASEGUROS S.A, número de póliza 130/001/007053 que cubre los daños que su salud pudiera sufrir como consecuencia de su participación en el mismo. En cuanto a la responsabilidad y en general acerca del seguro, se seguirá lo establecido en el art. 8 del R.D. 223/2004 de 6 Febrero de 2004.

10. COMPENSACIÓN

El paciente no tendrá que pagar nada por cualquiera de las visitas realizadas durante el estudio.

Usted no recibirá ninguna compensación económica por participar en este estudio.

11. PERSONA DE CONTACTO

Se le anima a que consulte con su medico del estudio cualquier duda sobre este estudio o este formulario de consentimiento, y debe recibir respuestas satisfactorias a todas sus preguntas. Si durante el estudio experimenta alguna lesión relacionada con la investigación o si tiene alguna pregunta adicional, deberá ponerse en contacto con:

Médicos del Estudio: Margarita Calonge Cano

Número de Teléfono: 983184763

José María Herreras Cantalapiedra

Número de Teléfono: 983184750

12. PARTICIPACIÓN

Usted dispondrá del tiempo suficiente para decidir sobre su participación en el estudio.

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. Usted puede rechazar participar o puede abandonar el estudio en cualquier momento, por cualquier motivo, sin que pierda ninguno de los derechos o beneficios a los que por otro lado tiene derecho. Si usted decide no participar en el estudio, o si decide abandonar el estudio antes de su finalización, su atención médica habitual en este centro no se verá perjudicada en modo alguno. Si usted abandona el estudio, se le pedirá que realice una visita final de estudio. Esta visita se realiza por su seguridad y para garantizar la salud de su vista. El medico del estudio puede retirarle del estudio en cualquier momento. El IOBA y las agencias reguladora, tanto la Agencia Europea (EMEA) como la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) pueden suspender este estudio en cualquier momento si tienen razones para determinar que es lo adecuado.

13. INFORMACIÓN NUEVA

El medico del estudio le informará a usted o a su representante legalmente autorizado sobre cualquier información nueva acerca del trasplante de células limbares o mesenquimales expandidas que pudiera conocerse durante el transcurso de esta investigación y que pudiera influenciar su voluntad de participar en el estudio

Se le entregará una copia firmada y fechada de este formulario de consentimiento para sus propios archivos antes de su participación en el estudio.

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO

Título del Estudio: ESTUDIO CLINICO DE TERAPIAS AVANZADAS

“Ensayo Clínico Fase I-II. “Terapias avanzadas para la reconstrucción de la superficie ocular. Trasplante alogénico de células madre epiteliales limbares (TACM-EL) frente a mesenquimales de médula ósea (TACM-MO): ensayo clínico randomizado y doble-enmascarado”

Número de estudio: IOBA-005-2010

Al firmar abajo, yo declaro que:

- 1) He leído, o me han leído, y entiendo completamente el contenido del formulario de información adjunto, Versión 1 Final de 18 de abril 2011.
- 2) He tenido la oportunidad de preguntar y obtener respuestas satisfactorias a cada una de mis preguntas
- 3) Acepto de forma voluntaria participar en este estudio de investigación y sé que puedo retirarme del estudio en cualquier momento sin que se vea afectada la continuidad de mi tratamiento
- 4) Médicos: Dra. Margarita Calonge y/o Dr. José María Herreras, Dirección: Instituto Universitario de Oftalmología Aplicada – Paseo de Belén17 – 47011 - Valladolid; Número de Teléfono : 983 184 750; me ha explicado la información para el paciente y el formulario de consentimiento y comprendo lo que implica la investigación
- 5) He comprendido completamente que los representantes del patrocinador, el Comité Ético Independiente o los representantes de las autoridades regulatorias pueden examinar mis registros médicos donde aparece mi nombre para verificar la exactitud de la información obtenida y entiendo que estas personas tendrán el deber de manejar esta información con confidencialidad utilizándola solamente con un objetivo legítimo para la salud pública.
- 6) Acepto que mi médico de cabecera sea informado de mi participación en este estudio para obtener mis registros médicos.
- 7) Acepto comunicar a mi médico todos los efectos secundarios u otros cambios en mi salud y todos los cambios de mi tratamiento médico
- 8) Se me entregará una copia firmada y fechada de este formulario de consentimiento para mis propios archivos.

Nombre del Paciente

Firma _____
(Debe ser firmado y fechado por el paciente)

Fecha _____

Nombre del representante legalmente autorizado

Firma _____
(Debe ser firmado y fechado por el representante legalmente autorizado -si aplica-)

Fecha _____

Nombre del Investigador

Firma _____
(Debe ser firmado y fechado por el investigador)

Fecha _____

Nombre de la persona que participó en la discusión del CI

Firma _____
(Debe ser firmado y fechado por la persona que explicó el consentimiento informado)

Fecha _____

Iniciales del Paciente _____ Fecha _____

<h2 style="margin: 0;">IOBA-05-2010</h2> <p style="margin: 0;">Unidad de Terapias Avanzadas IOBA/IBGM</p>	<div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 20px; margin: 0 auto;"></div> <p style="margin: 0;">Nº Paciente</p>	<h3 style="margin: 0;">Visita 1</h3> <h3 style="margin: 0;">Inclusión</h3> <p style="margin: 0;">(Día < -15)</p>
---	---	--

Fecha de visita: |_|_| |_|_| |_|_|
día mes año

Consentimiento informado firmado

¿Ha firmado el paciente el consentimiento informado? Sí No

Fecha de la firma: |_|_| |_|_| |_|_|
día mes año

Ojo de estudio

¿Por favor especifique el ojo de estudio? Ojo derecho Ojo izquierdo
 El mismo sujeto puede ser intervenido del ojo contralateral, en ese caso, debe usarse otro Cuaderno de Recogida de datos

Enfermedad causante de SIL por la que se realiza el trasplante

¿Dónde se detecta el problema? Ambos ojos Sólo ojo de inclusión

	Ojo derecho	Ojo izquierdo
Patología:	<input type="checkbox"/> Caustificación <input type="checkbox"/> Lentes de contacto <input type="checkbox"/> Post-quirúrgicas <input type="checkbox"/> Medicamentosa <input type="checkbox"/> Conjuntivitis cicatrizante En caso afirmativo , especificar: <input type="checkbox"/> Penfigoide <input type="checkbox"/> Eritema multiforme <input type="checkbox"/> Rosácea <input type="checkbox"/> Queratoconjuntivitis <input type="checkbox"/> EICH <input type="checkbox"/> Otros, especificar: _____	<input type="checkbox"/> Caustificación <input type="checkbox"/> Lentes de contacto <input type="checkbox"/> Post-quirúrgicas <input type="checkbox"/> Medicamentosa <input type="checkbox"/> Conjuntivitis cicatrizante En caso afirmativo , especificar: <input type="checkbox"/> Penfigoide <input type="checkbox"/> Eritema multiforme <input type="checkbox"/> Rosácea <input type="checkbox"/> Queratoconjuntivitis <input type="checkbox"/> EICH <input type="checkbox"/> Otros, especificar: _____

Datos demográficos

Fecha de nacimiento: |_|_| |_|_| |_|_| |_|_|
día mes año

Etnia: ₁ Blanco (mediterráneo, caucásico, nórdico) ₂ Otro (especificar): _____

Sexo: ₁ Varón ₂ Mujer

Datos morfométricos

Por favor marque esta casilla si la evaluación **NO** se ha realizado:

Peso: |_|_| kg

Talla: |_|_| cm

Test de embarazo

¿Se ha realizado la prueba? Sí No

En caso **Negativo**, especificar Razón: Varón Post-Menopáusica Otra: _____

Fecha de realización: |_|_| |_|_| |_|_|
día mes año

Resultado: Negativo Positivo → Debe excluirse a la paciente del estudio

<h2 style="margin: 0;">IOBA-05-2010</h2> <p style="margin: 0;">Unidad de Terapias Avanzadas IOBA/IBGM</p>	<div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 20px; margin: 0 auto;"></div> <p style="margin: 0;">Nº Paciente</p>	<p style="margin: 0;">Visita 1</p> <p style="margin: 0;">Inclusión</p> <p style="margin: 0;">(Día < -15)</p>
---	---	--

Datos de laboratorio

Hematología

¿Se ha realizado la prueba? Sí No

Fecha de realización:

día	mes							año	

Resultado Normal Anormal

En caso de **Anormal**, especificar:

¿Constituye efecto secundario de la medicación? Sí No

En caso de **Afirmativo**, especificar: _____

Bioquímica

¿Se ha realizado la prueba? Sí No

Fecha de realización:

día	mes							año	

Resultado Normal Anormal

En caso de **Anormal**, especificar:

¿Constituye efecto secundario de la medicación? Sí No

En caso de **Afirmativo**, especificar: _____

Serología

¿Se ha realizado la prueba? Sí No

Fecha de realización:

día	mes							año	

Test	Positivo	Negativo	No realizado	Razón de la No realización:
HIV	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Lues	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Hepatitis B	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Hepatitis C	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

Pruebas de coagulación

¿Se ha realizado la prueba? Sí No

Fecha de realización:

día	mes							año	

Resultado Normal Anormal

IOBA-05-2010

Unidad de Terapias Avanzadas IOBA/IBGM

--	--	--

Nº Paciente

**Visita 1
Inclusión
(Día < -15)**

Historia Clínica / Enfermedades Concomitantes extraoculares

¿El paciente ha padecido alguna enfermedad relevante, cirugía, accidentes? No Sí, especificar:

¿El paciente ha sido diagnosticado/padece síntomas al principio del estudio? No Sí, especificar:

	Diagnóstico / Enfermedad relevante	Fecha inicio (parcial si es necesario)			Continua 0 = No 1 = Sí
		día	mes	año	
1	_____				
2	_____				
3	_____				
4	_____				
5	_____				
6	_____				
7	_____				
8	_____				
9	_____				
10	_____				
11	_____				
12	_____				
13	_____				
14	_____				
15	_____				
16	_____				
17	_____				
18	_____				
19	_____				
20	_____				

<p>IOBA-05-2010</p> <p>Unidad de Terapias Avanzadas IOBA/IBGM</p>	<div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 20px; margin: 0 auto;"></div> <p>Nº Paciente</p>	<p>Visita 1</p> <p>Inclusión</p> <p>(Día < -15)</p>
--	--	---

Historia Clínica / Enfermedades Concomitantes oculares					
¿El paciente ha padecido alguna enfermedad relevante, cirugía, accidentes? <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí, especificar:					
¿El paciente ha sido diagnosticado/padece síntomas al principio del estudio? <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sí, especificar:					
Diagnóstico / Enfermedad relevante	Fecha inicio <i>(parcial si es necesario)</i>			Continúa	Ojo de la patología
	día	mes	año	0 = No 1 = Sí	1 = Ojo de estudio 2 = Ojo contralateral
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					

<h2 style="margin: 0;">IOBA-05-2010</h2> <p style="margin: 0;">Unidad de Terapias Avanzadas IOBA/IBGM</p>	<div style="border: 1px solid black; width: 40px; height: 20px; margin: 0 auto;"></div> <p style="margin: 0;">Nº Paciente</p>	<h3 style="margin: 0;">Visita 1</h3> <h3 style="margin: 0;">Inclusión</h3> <p style="margin: 0;">(Día < -15)</p>
---	---	---

Prueba de Agudeza Visual																				
¿Se ha realizado el examen? <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No																				
Fecha de realización: <table style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; font-size: 8px;">día</td> <td style="text-align: center; font-size: 8px;">mes</td> <td colspan="6"></td> <td style="text-align: center; font-size: 8px;">año</td> </tr> </table>												día	mes							año
día	mes							año												
OJO DERECHO	OJO IZQUIERDO																			
Indicar valor de ETDRS:																				
<table style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"><tr><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td></tr></table> valor decimal					<table style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"><tr><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td></tr></table> valor decimal															
<input type="checkbox"/> Cuenta dedos <input type="checkbox"/> Movimiento de las manos <input type="checkbox"/> Percepción de la Luz (PL) <input type="checkbox"/> No percepción de la Luz (NPL)	<input type="checkbox"/> Cuenta dedos <input type="checkbox"/> Movimiento de las manos <input type="checkbox"/> Percepción de la Luz (PL) <input type="checkbox"/> No percepción de la Luz (NPL)																			
En caso de no disponer del ETDRS, indicar (si se dispone del valor) optotipo Snellen:																				
<table style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"><tr><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td></tr></table>				<table style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"><tr><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td></tr></table>																

Examen externo ojo																						
¿Se ha realizado el examen? <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No																						
Fecha de realización: <table style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; font-size: 8px;">día</td> <td style="text-align: center; font-size: 8px;">mes</td> <td colspan="6"></td> <td style="text-align: center; font-size: 8px;">año</td> </tr> </table>														día	mes							año
día	mes							año														
Patología polo anterior	Hallazgo	Ojo derecho	Ojo izquierdo																			
<input type="checkbox"/> Ptosis		<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No																			
<input type="checkbox"/> Entropión		<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No																			
<input type="checkbox"/> Ectropión		<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No																			
<input type="checkbox"/> Palpebrales		<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No																			
<input type="checkbox"/> Cutáneas faciales		<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No																			
Otras alteraciones (especificar una por línea)																						
		<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No																			
		<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No																			
		<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No																			

IOBA-05-2010

Unidad de Terapias Avanzadas IOBA/IBGM

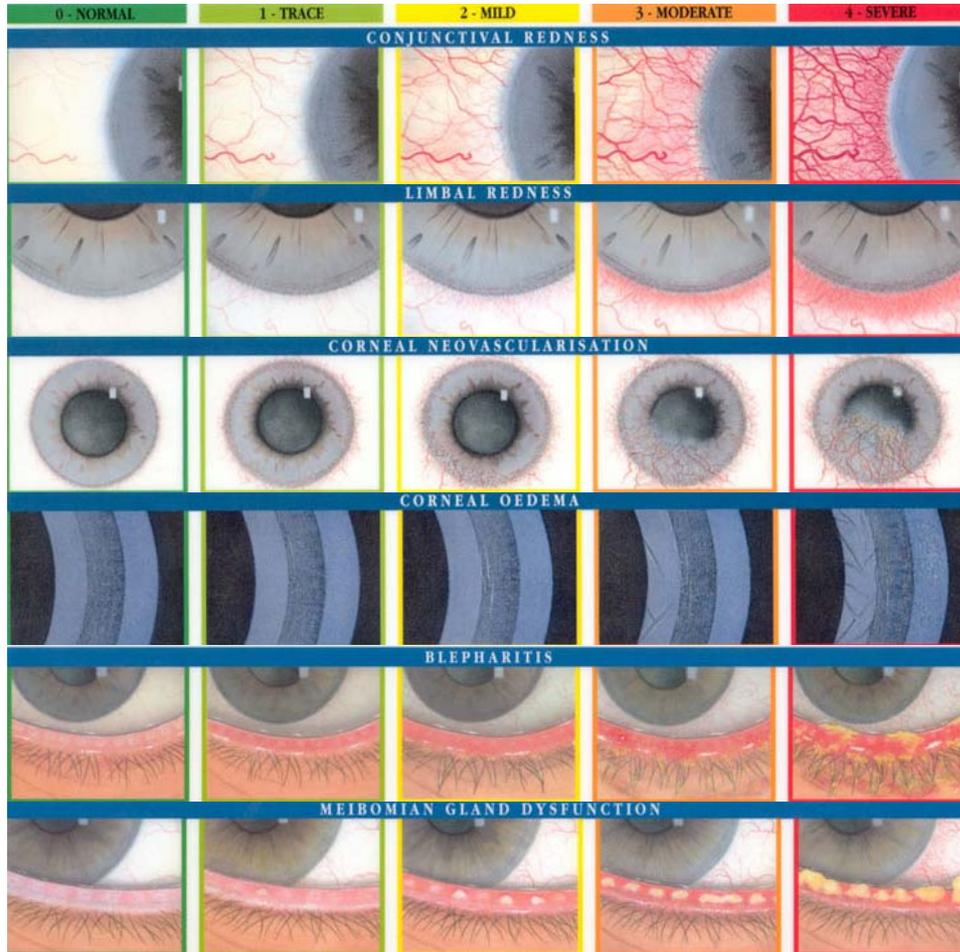
N° Paciente

**Visita 1
Inclusión
(Día < -15)**

Biomicroscopia de polo anterior (según la escala Efron)

¿Se ha realizado la prueba? Sí No

Fecha de realización: día mes año



Grado	Interpretación
0	Normal-sin cambios
1	Leves indicios-No precisa acción clínica
2	Medio-Puede precisar acción clínica
3	Moderado-Normalmente requiere acción clínica
4	Grave-Requiere acción clínica urgente

Por favor marque con una X la opción que corresponda

BPA	Ojo derecho					Ojo izquierdo				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Enrojecimiento conjuntival										
Enrojecimiento limbar										
Neovascularización corneal										
Edema corneal										
Blefaritis										
Meibomitis										
Otros hallazgos (especificar uno por línea)										

<h2 style="margin: 0;">IOBA-05-2010</h2> <p style="margin: 0;">Unidad de Terapias Avanzadas IOBA/IBGM</p>	<p style="margin: 0;">Nº Paciente</p>	<h3 style="margin: 0;">Visita 1</h3> <h3 style="margin: 0;">Inclusión</h3> <p style="margin: 0;">(Día < -15)</p>
---	---------------------------------------	---

Colorantes Vitales

¿Se ha realizado la prueba? Sí No

Fecha de realización:

día	mes	año							

Por favor marque con una X la opción que corresponda

	Ojo derecho					Ojo izquierdo						
Colorantes vitales	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5
Fluoresceína (córnea)												
Rosa de Bengala (conjuntival)												
Lisamina verde (opcional) (conjuntival)												

Iconografía en BPA

¿Se ha realizado la prueba? Sí No

Fecha de realización:

día	mes	año							

Test Schirmer

¿Se ha realizado la prueba? Sí No

Fecha de realización:

día	mes	año							

OJO DERECHO	OJO IZQUIERDO																
Secreción	Secreción																
<table style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"><tr><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td></tr><tr><td colspan="4" style="text-align: center; font-size: 8px;">mm/min</td></tr></table>					mm/min				<table style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"><tr><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td><td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td></tr><tr><td colspan="4" style="text-align: center; font-size: 8px;">mm/min</td></tr></table>					mm/min			
mm/min																	
mm/min																	

Microscopía confocal in vivo (HRTIII RCM)

¿Se ha realizado la prueba? Sí No

Fecha de realización:

día	mes	año							

	Ojo derecho	Ojo izquierdo
Fenotipo corneal:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Fenotipo conjuntival:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Células calciformes:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Células inflamatorias:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Quistes:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Neovasos:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Fibrosis:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Limbo patológico:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
Otros (Especificar uno por línea):		
	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No

<h2 style="margin: 0;">IOBA-05-2010</h2> <p style="margin: 0;">Unidad de Terapias Avanzadas IOBA/IBGM</p>	<div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; margin: 0 auto;"></div> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; margin: 0 auto;"></div> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px; margin: 0 auto;"></div> <p style="margin: 0;">Nº Paciente</p>	<h3 style="margin: 0;">Visita 1</h3> <h3 style="margin: 0;">Inclusión</h3> <h3 style="margin: 0;">(Día < -15)</h3>
---	---	---

Citología por impresión corneal																								
¿Se ha realizado la prueba? <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No																								
Fecha de realización: <table style="display: inline-table; border-collapse: collapse; margin-left: 20px;"> <tr> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; font-size: 8px;">día</td> <td style="text-align: center; font-size: 8px;">mes</td> <td colspan="2" style="text-align: center; font-size: 8px;">año</td> <td colspan="7"></td> </tr> </table>														día	mes	año								
día	mes	año																						
Por favor responda las siguientes preguntas:																								
	Ojo derecho	Ojo izquierdo																						
Microscopía óptica																								
Fenotipo corneal:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No																						
Fenotipo conjuntival:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No																						
Células calciformes:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No																						
Neovasos:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No																						
Otros (Especificar uno por línea):																								
	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No																						
	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No																						
Análisis de marcadores moleculares																								
Corneales:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No																						
Conjuntivales:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No																						
Células madre:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No																						
Mucinas:	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No																						
Otros (Especificar uno por línea):																								
	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No																						
	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No																						

Presión Intraocular																							
¿Se ha realizado la prueba? <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No																							
Fecha de realización: <table style="display: inline-table; border-collapse: collapse; margin-left: 20px;"> <tr> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; font-size: 8px;">día</td> <td style="text-align: center; font-size: 8px;">mes</td> <td colspan="2" style="text-align: center; font-size: 8px;">año</td> <td colspan="7"></td> </tr> </table>													día	mes	año								
día	mes	año																					
OJO DERECHO	OJO IZQUIERDO																						
Presión Intraocular:																							
<table style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> </tr> </table> mmHg					<table style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></td> </tr> </table> mmHg																		

<p>IOBA-05-2010</p> <p>Unidad de Terapias Avanzadas IOBA/IBGM</p>	<table border="1"> <tr> <td style="width: 20px; height: 20px;"> </td> <td style="width: 20px; height: 20px;"> </td> <td style="width: 20px; height: 20px;"> </td> </tr> </table> <p>Nº Paciente</p>				<p>Visita 1</p> <p>Inclusión</p> <p>(Día < -15)</p>

Fondo de Ojo									
¿Se ha realizado la prueba?	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No								
Fecha de realización:	<table border="1" style="display: inline-table;"> <tr> <td style="width: 20px; height: 20px;"> </td> </tr> </table>								
	<p style="font-size: small;">día mes año</p>								
Resultado	<input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Anormal								
En caso de Anormal , especificar: _____									
Relación E/P:	<table border="1" style="display: inline-table;"> <tr> <td style="width: 20px; height: 20px;"> </td> <td style="width: 20px; height: 20px;"> </td> <td style="width: 20px; height: 20px;"> </td> </tr> </table> / <table border="1" style="display: inline-table;"> <tr> <td style="width: 20px; height: 20px;"> </td> <td style="width: 20px; height: 20px;"> </td> <td style="width: 20px; height: 20px;"> </td> </tr> </table>								

Medicación concomitante ocular y extraocular	
¿El paciente está recibiendo o ha recibido algún tratamiento?	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No
En caso afirmativo, cumplimente la hoja de medicación concomitante .	

Diario del Paciente	
<p>POR FAVOR, RECUERDE FACILITAR AL PACIENTE LOS CUESTIONARIOS CORRESPONDIENTES A LA VISITA 1</p>	

IOBA-05-2010 Unidad de Terapias Avanzadas IOBA/IBGM	 Nº Paciente	Visita 1 Inclusión (Día < -15)
---	---	--

Criterios de inclusión

	Sí	No
1. Varón o mujer mayor de 18 años que entienda y firme el consentimiento informado. En caso de no poder entender el contenido del consentimiento informado, deberá expresarse dicha información a su tutor legal y proceder según lo previsto en el RD223/2004 para dichos supuestos.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Resultado negativo en el Test de embarazo en orina en la visita basal para las mujeres en edad fértil, que deberán adquirir el compromiso de usar un método anticonceptivo eficaz durante el periodo de participación en el estudio.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Diagnóstico de fracaso de la superficie ocular debido a SIL, basado en las características clínicas publicadas (algunos de los siguientes: neovascularización corneal superficial, pérdida de transparencia corneal, irregularidad epitelial e historia de queratitis puntada, erosiones o ulceraciones repetidas y presencia de síntomas) y confirmado por la presencia de células de fenotipo epitelial en la citología por impresión conjuntival.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Haber entendido y firmado el consentimiento informado del estudio y de técnicas diagnóstico-quirúrgicas a realizar.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Capacidad para seguir todas las instrucciones y completar las visitas programadas.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		↑
Una casilla marcada en esta columna excluye al paciente del estudio		

Criterios de exclusión

	Sí	No
1. Enfermedad sistémica descontrolada (por ej. hipertensión o diabetes) o cualquier enfermedad que, a juicio del anestesiólogo responsables de las evaluaciones preoperatorios o del médico oftalmólogo, pudiera poner en riesgo al paciente o la interpretación de los resultados.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Infección ocular activa en cualquiera de los ojos. Si se trata de un proceso erradicable, se podrá considerar su inclusión 30 días mínimos tras su curación.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Alteraciones de la estática o dinámica palpebral o cualquier otra patología (por ej. síndrome de ojo seco grave) a excepción de la que ha originado el SIL en cualquiera de los dos ojos que, a juicio del oftalmólogo, pudieran interferir con el resultado satisfactorio. Estas deben corregirse hasta donde sea posible, al menos 3 meses antes de la inclusión del paciente, pudiendo volver a considerarse su inclusión.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. SIL que no haya sido tratado antes con todos los medios médicos (no quirúrgicos) disponibles.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Alteraciones cognitivas que pudieran interferir con el cumplimiento del estudio.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Imposibilidad de acudir a las visitas programadas para el estudio.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. Cualquier otra causa no contenida en los supuestos anteriores y que a juicio del investigador principal desaconseje la participación del sujeto aún cuando cumpla con los demás criterios.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
		↑
Una casilla marcada en esta columna excluye al paciente del estudio		

Cuaderno del Paciente

IOBA-05-2010

Unidad de Terapias Avanzadas IOBA/IBGM

"TERAPIAS AVANZADAS PARA LA RECONSTRUCCIÓN DE LA SUPERFICIE OCULAR. TRASPLANTE ALOGÉNICO DE CÉLULAS MADRE EPITELIALES LIMBARES (TACM-LE) FRENTE A MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA (TACM-MO): ENSAYO CLÍNICO RANDOMIZADO Y DOBLE-ENMASCARADO"

Nº de centro:

Nº de paciente:

IOBA-05-2010 Unidad de Terapias Avanzadas IOBA/IBGM	 Nº Paciente	Visita 1 Inclusión (Día < -15)
---	---	--

Cuestionario de Calidad de Vida VFQ-25

Fecha de realización:
día mes año

Sección A: Función Visual

Estas preguntas están relacionadas con su visión o la sensación que tiene usted acerca de su vista. Responda teniendo en cuenta que lleva gafas o lentes de contacto, si es que las necesita, con un ojo o con los dos, según cómo usted vea mejor.

A1. Actualmente, diría usted que si vista (con corrección que necesita) es: (se considerará la mejor situación, con ambos ojos o bien con uno solo)

- | | |
|----|---------------------|
| 1. | Completamente ciego |
| 2. | Muy mal |
| 3. | Mala |
| 4. | Regular |
| 5. | Buena |
| 6. | Excelente |

A2. ¿Con qué frecuencia se preocupa usted por su vista?

- | | |
|----|------------------------------|
| 1. | Todo el tiempo |
| 2. | La mayor parte del tiempo |
| 3. | Parte del tiempo |
| 4. | Una pequeña parte del tiempo |
| 5. | Nunca |

A3. ¿Cuánto dolor o malestar diría usted que ha sentido con los ojos o alrededor de los ojos (por ejemplo, ardor, picazón o dolor)?

- | | |
|----|------------|
| 1. | Muy severo |
| 2. | Severo |
| 3. | Moderado |
| 4. | Un poco |
| 5. | Nada |

A4. ¿Cuánta dificultad tiene usted para leer la letra regular de los periódicos?

- | | |
|----|--|
| 1. | Dejó de hacerlo por otras razones o no está interesado/a en hacer esto |
| 2. | Dejó de hacerlo a causa de su vista |
| 3. | Dificultad extrema |
| 4. | Dificultad moderada |
| 5. | Un poco de dificultad |
| 6. | Ninguna dificultad |

IOBA-05-2010 Unidad de Terapias Avanzadas IOBA/IBGM	 Nº Paciente	Visita 1 Inclusión (Día < -15)
---	---	--

Cuestionario de Calidad de Vida VFQ-25 (Continuación)

A5. ¿Cuánta dificultad tiene usted para hacer trabajos o pasatiempos (hobbies que requieran que vea bien de cerca), como cocinar, coser, arreglar cosas en la casa o usar herramientas?

- | | |
|----|--|
| 1. | Dejó de hacerlo por otras razones o no está interesado/a en hacer esto |
| 2. | Dejó de hacerlo a causa de su vista |
| 3. | Dificultad extrema |
| 4. | Dificultad moderada |
| 5. | Un poco de dificultad |
| 6. | Ninguna dificultad |

A6. A causa de su vista ¿cuánta dificultad tiene usted para encontrar algo que está en un estante/repisa lleno/a de cosas?

- | | |
|----|--|
| 1. | Dejó de hacerlo por otras razones o no está interesado/a en hacer esto |
| 2. | Dejó de hacerlo a causa de su vista |
| 3. | Dificultad extrema |
| 4. | Dificultad moderada |
| 5. | Un poco de dificultad |
| 6. | Ninguna dificultad |

A7. A causa de su vista ¿cuánta dificultad tiene usted para leer los nombres de las calles o lo nombres de las tiendas?

- | | |
|----|--|
| 1. | Dejó de hacerlo por otras razones o no está interesado/a en hacer esto |
| 2. | Dejó de hacerlo a causa de su vista |
| 3. | Dificultad extrema |
| 4. | Dificultad moderada |
| 5. | Un poco de dificultad |
| 6. | Ninguna dificultad |

A8. A causa de su vista ¿cuánta dificultad tiene usted para bajar escalones, escaleras o el borde de la acera cuando hay poca luz o es de noche?

- | | |
|----|--|
| 1. | Dejó de hacerlo por otras razones o no está interesado/a en hacer esto |
| 2. | Dejó de hacerlo a causa de su vista |
| 3. | Dificultad extrema |
| 4. | Dificultad moderada |
| 5. | Un poco de dificultad |
| 6. | Ninguna dificultad |

A9. A causa de su vista ¿cuánta dificultad tiene usted para notar objetos a los lados cuando va caminando?

- | | |
|----|--|
| 1. | Dejó de hacerlo por otras razones o no está interesado/a en hacer esto |
| 2. | Dejó de hacerlo a causa de su vista |
| 3. | Dificultad extrema |
| 4. | Dificultad moderada |
| 5. | Un poco de dificultad |
| 6. | Ninguna dificultad |

IOBA-05-2010 Unidad de Terapias Avanzadas IOBA/IBGM	 Nº Paciente	Visita 1 Inclusión (Día < -15)
---	---	--

Cuestionario de Calidad de Vida VFQ-25 (Continuación)

A10. A causa de su vista ¿cuánta dificultad tiene usted para ver cómo reacciona la gente cuando dice usted algo?

- | | |
|----|--|
| 1. | Dejó de hacerlo por otras razones o no está interesado/a en hacer esto |
| 2. | Dejó de hacerlo a causa de su vista |
| 3. | Dificultad extrema |
| 4. | Dificultad moderada |
| 5. | Un poco de dificultad |
| 6. | Ninguna dificultad |

A11. A causa de su vista ¿cuánta dificultad tiene usted para escoger y coordinar su propia ropa?

- | | |
|----|--|
| 1. | Dejó de hacerlo por otras razones o no está interesado/a en hacer esto |
| 2. | Dejó de hacerlo a causa de su vista |
| 3. | Dificultad extrema |
| 4. | Dificultad moderada |
| 5. | Un poco de dificultad |
| 6. | Ninguna dificultad |

A12. A causa de su vista ¿cuánta dificultad tiene usted para visitar a la gente en su casa, en fiestas o restaurantes?

- | | |
|----|--|
| 1. | Dejó de hacerlo por otras razones o no está interesado/a en hacer esto |
| 2. | Dejó de hacerlo a causa de su vista |
| 3. | Dificultad extrema |
| 4. | Dificultad moderada |
| 5. | Un poco de dificultad |
| 6. | Ninguna dificultad |

A13. A causa de su vista ¿cuánta dificultad tiene usted para salir al cine, al teatro o ver eventos deportivos?

- | | |
|----|--|
| 1. | Dejó de hacerlo por otras razones o no está interesado/a en hacer esto |
| 2. | Dejó de hacerlo a causa de su vista |
| 3. | Dificultad extrema |
| 4. | Dificultad moderada |
| 5. | Un poco de dificultad |
| 6. | Ninguna dificultad |

A14. Respecto a conducir el coche ¿conduce usted en la actualidad, al menos de vez en cuando?

- | | |
|----|----|
| a. | Sí |
| b. | No |

A14a. ¿es porqué nunca ha conducido un coche o porque ha dejado de hacerlo?

- | | |
|----|--------------------|
| a. | Nunca he conducido |
| b. | Lo he dejado |

IOBA-05-2010 Unidad de Terapias Avanzadas IOBA/IBGM	 Nº Paciente	Visita 1 Inclusión (Día < -15)
---	---	--

Cuestionario de Calidad de Vida VFQ-25 (Continuación)

A14b. Si ha conducido anteriormente: ¿dejó de conducir principalmente a consecuencia de su vista, principalmente por otras razones o por ambas cosas?

- | | |
|----|----------------------------------|
| a. | Principalmente por la vista |
| b. | Principalmente por otras razones |
| c. | Por ambas cosas |

SI NO CONDUCE, PASE A LA PREGUNTA A15

A14c. Si conduce habitualmente ¿Cuánta dificultad tiene usted para conducir durante el día por lugares conocidos?

- | | |
|----|-----------------------|
| 1. | Dificultad extrema |
| 2. | Dificultad moderada |
| 3. | Un poco de dificultad |
| 4. | Ninguna dificultad |

A14d. ¿Cuánta dificultad tiene usted para conducir un coche?

- | | |
|----|--|
| 1. | Dejó de hacerlo por otras razones o no está interesado/a en hacer esto |
| 2. | Dejó de hacerlo a causa de su vista |
| 3. | Dificultad extrema |
| 4. | Dificultad moderada |
| 5. | Un poco de dificultad |
| 6. | Ninguna dificultad |

Preguntas sobre problemas de la vista

Las siguientes preguntas se refieren a cómo podrían estar afectadas por su vista las cosas que hace. Para cada pregunta, conteste por favor si esto es cierto todo el tiempo, la mayor parte del tiempo, parte del tiempo, una pequeña parte del tiempo o nunca.

A15. ¿Con qué frecuencia ha realizado usted menos trabajo del que le hubiera gustado hacer a causa de su vista?

- | | |
|----|------------------------------|
| 1. | Todo el tiempo |
| 2. | La mayor parte del tiempo |
| 3. | Parte del tiempo |
| 4. | Una pequeña parte del tiempo |
| 5. | Nunca |

A16. ¿Con qué frecuencia está limitado/a en la cantidad de tiempo que puede trabajar o hacer otras cosas por culpa de su vista?

- | | |
|----|------------------------------|
| 1. | Todo el tiempo |
| 2. | La mayor parte del tiempo |
| 3. | Parte del tiempo |
| 4. | Una pequeña parte del tiempo |
| 5. | Nunca |

IOBA-05-2010 Unidad de Terapias Avanzadas IOBA/IBGM	 Nº Paciente	Visita 1 Inclusión (Día < -15)
---	---	--

Cuestionario de Calidad de Vida VFQ-25 (Continuación)

A17. ¿Con qué frecuencia no puede hacer lo que quisiera a causa del dolor o malestar en los ojos o alrededor de los ojos, por ejemplo, ardor, picazón o dolor?

1. Todo el tiempo
2. La mayor parte del tiempo
3. Parte del tiempo
4. Una pequeña parte del tiempo
5. Nunca

A continuación, conteste si es definitivamente cierta, fundamentalmente cierta, fundamentalmente falsa, definitivamente falsa o no está seguro/a:

A18. Me quedo en casa la mayor parte del tiempo por culpa de mi vista:

1. Definitivamente cierta
2. Fundamentalmente cierta
3. No estoy seguro/a
4. Fundamentalmente falsa
5. Definitivamente falsa

A19. Me siento frustrado/a gran parte del tiempo a causa de mi vista:

1. Definitivamente cierta
2. Fundamentalmente cierta
3. No estoy seguro/a
4. Fundamentalmente falsa
5. Definitivamente falsa

A20. Tengo mucho menos control sobre lo que hago a causa de mi vista:

1. Definitivamente cierta
2. Fundamentalmente cierta
3. No estoy seguro/a
4. Fundamentalmente falsa
5. Definitivamente falsa

A21. A causa de mi vista, tengo que depender demasiado de lo que otra gente me dice:

1. Definitivamente cierta
2. Fundamentalmente cierta
3. No estoy seguro/a
4. Fundamentalmente falsa
5. Definitivamente falsa

A22. Necesito mucha ayuda de otras personas a causa de mi vista:

1. Definitivamente cierta
2. Fundamentalmente cierta
3. No estoy seguro/a
4. Fundamentalmente falsa
5. Definitivamente falsa

IOBA-05-2010 Unidad de Terapias Avanzadas IOBA/IBGM	 Nº Paciente	Visita 1 Inclusión (Día < -15)
---	---	--

Cuestionario de Síntomas de Discomfort Ocular																								
INSTRUCCIONES: Por favor, marque con un número, de 0 a 4 (según las explicaciones a la derecha de la tabla) la intensidad de cada síntoma que presenta en sus ojos de forma global.																								
Fecha de realización: <table style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> <td style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 20px;"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; font-size: small;">día</td> <td style="text-align: center; font-size: small;">mes</td> <td colspan="9" style="text-align: center; font-size: small;">año</td> </tr> </table>														día	mes	año								
día	mes	año																						
Sequedad		Escala de puntuación:																						
Sensación de cuerpo extraño		0= no he sentido el síntoma																						
Quemazón / escozor		1= rara vez he sentido el síntoma, pero no es molesto																						
Dolor		2= alguna vez he sentido el síntoma, me causa molestias pero no interfiere en mis actividades																						
Picor		3= siempre siento este síntoma, me causa molestias pero no interfiere en mis actividades																						
Sensibilidad a la luz		4= siempre siento este síntoma, me causa molestias y además interfiere en mis actividades																						
Visión borrosa																								
Otros (especificar):																								

IOBA-05-2010 Unidad de Terapias Avanzadas IOBA/IBGM	 Nº Paciente	Visita 1 Inclusión (Día < -15)
---	---	--

Cuestionario sobre la discapacidad de la superficie ocular

INSTRUCCIONES:

Por favor, conteste a las siguientes preguntas marcando con una cruz (X) la casilla que mejor describa su respuesta

Fecha de realización:

día	mes	año							

¿Ha experimentado algunos de los siguientes síntomas durante la pasada semana?

	Siempre (4)	Casi siempre (3)	La mitad del tiempo (2)	Algunas veces (1)	Nunca (0)
1. Ojos sensibles a la luz					
2. Sensación de tener arena en los ojos					
3. Ojos dolorosos (dolor/escozor)					
4. Visión Borrosa					
5. Mala Visión					

¿Los problemas con sus ojos le han limitado a la hora de realizar alguna de las siguientes actividades durante la pasada semana?

	Siempre (4)	Casi siempre (3)	La mitad del tiempo (2)	Algunas veces (1)	Nunca (0)	No procede
6. Lectura						
7. Conducir de noche						
8. Usar un ordenador o un cajero automático						
9. Ver la televisión						

¿Ha sentido molestias en los ojos en alguna de las siguientes situaciones, durante la pasada semana?

	Siempre (4)	Casi siempre (3)	La mitad del tiempo (2)	Algunas veces (1)	Nunca (0)	No procede
10. Cuando hacía viento						
11. En lugares con una humedad baja (muy secos)						
12. En lugares con aire acondicionado						

Tabla A.8. Datos clínicos previos (0) y de la evaluación de los resultados a los 6 meses (6) y a los 12 meses (12) de los 11 casos evaluables (9 ojos, 9 pacientes) sometidos a trasplante de epitelio limbar cultivado (CLET) debido a fracaso corneal secundario a síndrome de insuficiencia limbar (SIL)

CLET No./Ojo	Paciente No. Sexo/Edad	Etiología de SIL (meses inicio SIL-CLET): Grupo*/Grado† Diagnósticos 2º	SIDEQ 0/6/12	OSDI 0/6/12	VFQ25 0/6/12	Potencial visual‡ 0/6/12	AV mejor corregida (ETDRS) 0/6/12	Enrojecimiento conjuntival al (0-4) 0/6/12	Opacidad epitelial central (0-4) 0/6/12	Área neovasos corneales (0-4) 0/6/12	Longitud neovasos corneales (0-4) 0/6/12	Tinción corneal (0-4) 0/6/12	Defecto epitelial persistente corneal (0-4) 0/6/12	Fonotipo epitelial central (MCIV) 0/6/12	Reabsorción MA, días desde cirugía	Resultado final 6 meses 12 meses	Comentarios
1/OD	1/H/49	Queratitis post-infecciosa, acantamoeba (240) +2 QPP previos: 3/T Glaucoma	24/9/16	89,6/50,0/65,9	45,4/57,3/55,0	4	0,025/0,001/0,001	1/1/1	3/3/3	2/2/1	2/1/1	4/2/1	0/0/0	Conj/Conj	24	Exito parcial Exito parcial	QP en mes 18. A pesar de injerto transparente, la AV se deterioró debido a glaucoma avanzado
2/OI	2/H/77	Defecto epitelial persistente (20) 2º a carcinoma de superficie ocular recurrente (120): 3/T	17/17/13	87,5/50,0/60,0	46,8/49,0/35,3	1	0,04/0,2/0,25	2/2/1	1/1/0	2/1/1	2/1/1	3/1/0	3/0/0	Conj/ NP/Corn	30	Exito parcial Exito	Paciente crónicamente inmunosuprimida debido al trasplante de corazón
3/OD	3/M/47	Causticación + lesión mecánica (24): 1/T Patología retiniana irreversible	8/6/8	57,5/25,0/32,5	47,1/32,5/34,5	0	0,001/0,001/0,001	2/2/1	4/3/2	3/1/1	3/2/1	3/2/1	0/0/0	Conj/ Mixy/Mix	30	Exito Exito	-
4/OI	7/M/48	Causticación (46) +2 AMT anterior: 1/T	14/13/-	62,5/83,3/-	50,9/43,8/-	4	0,001/0,001/-	3/2/-	3/3/-	4/3/-	3/3/-	4/3/-	2/1/-	Conj/ Conj/-	90	Exito parcial	Reoperado CLET-5, para intentar mayor mejoría
5/OI	7/M/48	Causticación (54) +2 TMA + CLET-4 previo: 1/T	9/8/14	83,3/62,5/80,6	52,9/50,9/55,0	4	0,001/0,001/0,001	2/1/1	3/2/2	3/3/3	3/2/2	3/1/0	1/0/0	Conj/ Mixy/Mix	90	Exito Exito	-
6/OI	9/M/62	TMA + QPP previa: 1/T Glaucoma, exotropía	13/18/-	61,1/85,4/-	53,8/57,0/-	4	0,001/0,001/-	3/3/-	2/3/-	4/4/-	3/3/-	2/2/-	3/2/-	Conj/ Conj/-	21	Fracaso	Reoperado CLET-7
7/OI	9/M/62	Causticación (608) +2 TMA previa+ QPP previa+ CLET-6 previo: 1/T	17/22/16	93,8/72,7/85,4	53,6/53,4/56,0	4	0,001/0,01/0,01	3/2/2	3/3/2	4/4/4	3/3/3	2/0/0	2/0/0	Conj/ Conj/Conj	30	Exito parcial Exito parcial	-
8/OD	10/H/44	Glaucoma, exotropía Steven-Johnson + varios TMA previos (120): 2/T Catarata	28/20/21	100,0/93,8/97,5	47,4/49,8/47,3	2	0,25/0,32/0,32	3/3/1	3/1/1	3/1/1	3/2/1	2/1/1	0/0/0	Mix/ Corn/Conj	8	Exito Exito	-
9/OD	13/M/48	Causticación (84) +3 AMT previos: 1/T	16/11/15	81,8/72,9/79,2	30,6/35,8/39,8	4	0,0001/0,0001/0,0001	2/2/1	4/4/4	4/4/4	4/4/4	0/0/0	0/0/0	Conj/ Mixy/Mix	30	Fracaso Fracaso	La extrema delgadez corneal impidió eliminar el pannus durante la cirugía. A pesar de fracaso, se logró aumentar espesor corneal para queratoprótesis
10/OD	16/M/50	Enfermedad de injerto contra huésped (168) +5 QPP previas + parche escleral: 2/T	17/22/18	87,5/90,0/89,6	56,3/59,1/52,5	0	0,001/0,001/0,001	4/3/2	4/4/4	4/4/4	4/4/4	0/0/0	0/0/0	Conj/ Conj/Conj	10	Fracaso Fracaso	QP: endotelial mes 14+cirugía de catarata+lente de contacto rígida para recuperar AV (1,0)
11/OI	21/M/41	Causticación (36) +5 TMA previos: 1/T Catarata, glaucoma	10/11/9	62,5/64,6/87,5	5,0/48,4	4	0,32/0,5/0,4	2/1/1	2/2/2	3/2/1	2/1/1	2/0/0	0/0/0	Mix/ Corn/Conj	34	Exito Exito	-
Media (DE)		181,8 (219,2)	15,7 (6,1)/14,3 (5,8)/14,4 (4,1)	78,8 (15,1)/68,2 (49,4 (8,8)/20,7 (14,4 (4,1)-75,4 (19,8)	5,0 (7,0)/49,4 (8,8)/47,1 (8,6)										36,1 (27,9)		
Mediana (RIQ)								2 (1)/2 (1)/1 (0)	3 (1)/3 (1)/2 (1)	3 (1)/3 (2,5)/1 (3)	3 (0,5)/2 (1,5)/1 (2)						

Los casos evaluables fueron aquellos que alcanzaron al menos 6 meses postoperatorios; * Grupo 1: causticaciones; Grupo 2: enfermedades inflamatorias inmunológicas; Grupo 3: enfermedades no inflamatorias; † T: total; S: severo; ‡ Potencial visual: 1, mejora con CLET solamente (la opacidad corneal era sólo superficial); 2, mejora con una cirugía de trasplante de córnea de diferente forma después de CLET (es decir, eliminación de cataratas); 3, mejoría con posterior trasplante de córnea después de CLET (opacidad corneal era espesa total); 4, mejora con posterior trasplante de córnea más otra cirugía (eliminación de cataratas a menos que se especifique lo contrario) después de CLET; y 0: No hay posibilidad de mejora (es decir, debido a una patología retiniana irreversible); AV: agudeza visual (valores 0,01, 0,001, 0,0001 y 0,00001) equivalente a contando los dedos, el movimiento de la mano, la percepción de la luz, y no hay percepción de la luz, respectivamente); † ETDRS, Tratamiento Precoc Retinopatía Diabética Estudio; Conj, conjuntival; Corn, corneal; Mix, mixto; RIQ, rango intercuartil; MCIV, microscopía confocal in vivo; SIDEQ, Sing le tem Dry Eye Questionnaire; VFQ25, National Eye Institute 25-item Questionnaire de Función Visual (0-100); OSDI, Índice de Enfermedades Superficiales Oculares (0-100); DEP, defecto epitelial persistente; TMA, membrana amniótica; QP, queratoplastia; DE, desviación estándar; H, hombre; M, mujer; OI, ojo izquierdo; OD, ojo derecho.

Tabla B8. Datos clínicos previos (0) y los resultados a los 6 meses (6) y 12 meses (12) después de trasplante de células madre mesenquimatosas derivadas de la médula ósea (TCMT) en los 17 casos evaluables (16 ojos, 14 pacientes) Síndrome de insuficiencia de células madre del limbo (LSCD).																	
Paciente Nº	Sexo/Edad	Etiología de SIL (meses inicio SIL-MSCT): Grupo*/Grado/ Diagnóstico 2º	SIDEQ 0/6/12	OSDI 0/6/12	VFQ25 0/6/12	Potencial visual#	AV mejor corregida (ETDRS) 0/6/12	Enrojecimiento corneal central (0-4) 0/6/12	Opacidad epitelial corneal central (0-4) 0/6/12	Área de neovasos corneales (0-4) 0/6/12	Longitud de la neovasos corneales (0-4) 0/6/12	Tinción corneal (0-4) 0/6/12	Defecto epitelial persistente(0-4) 0/6/12	Fenotipo epitelial corneal central (IVCM) 0/6/12	Reabsorción MA, días desde cirugía	Resultado final 6 meses 12 meses	Comentarios
1/OS	4/H/31	Caustración (24) + 2 resección previa + TMA: 1 / T Catarata	18/15/8	39,6/47,9/64,6	22,6/43,0/29,4	2	0,158/0,125	1/1/1	1/2/3	3/3/3	2/2/3	2/0/2	1/0/0	Mix/Conj/Conj	10	Fracaso Fracaso	Cumplimiento deficiente Retirada al mes 7: empeoraron ambos ojos por intenso brote sistémico; perforando la cornea del SO; Se requirió QP
2/OS	6/M/53	Queratoconjuntivitis atópica (170): 2/T Queratitis herpética Crugía de cataratas sin éxito	24/23/-	95,8/93,8/-	43,6/41,0-	2	0,04/0,025/-	3/0/-	2/0/-	3/0/-	2/0/-	1/0/-	0/0/0	Mix/NP/-	17	Exito parcial	
3/OD	7/M/48	Caustración (46) + múltiples TMA: 1/T Glaucoma	12/15/-	77,1/85,4/-	55,0/56,8/-	4	0,001/0,001/-	3/3/-	3/3/-	4/4/-	4/4/-	3/2/-	0/0/0	Conj/Conj/-	25	Fracaso	Reoperado MSCT-4
4/OD	7/M/48	Caustración (54) + TMA múltiple + MSCT-3 anterior: 1 /T Glaucoma, catarata /T Glaucoma, catarata	9/8/11	83,3/62,5/77,8	54,2/50,9/57,8	4	0,001/0,001	3/2/1	3/2/1	4/4/4	4/3/2	2/2/1	0/0/0	Conj/Mix/Corn	60	Exito Exito	QP al mes 15
5/OD	8/M/70	Queratoconjuntivitis proliferante vitreoretinopática (48): 3/S	6/3/7	12,5/15,6/6,3	54,6/63,8/62,4	4	0,001/0,001	1/1/0	2/0/1	2/1/1	1/1/1	2/1/1	1/0/0	Mix/Corn/Conj	10	Exito Exito	QP al mes 30
6/0	10/H/44	Stevens Johnson (120)+multiple TMA: 2/T Catarata	28/23/16	100,0/93,8/97,5	46,1/49,3/41,8	2	0,01/0,25/0,32	3/3/1	4/3/1	4/3/2	3/2/1	3/2/2	0/0/0	Mix/Corn/Conj	8	Exito Exito	
7/OS	11/H/37	Aniridia congénita (132): 3/S Catarata, nistagmus	16/14/12	38,9/45,5/63,6	39,3/41,6/43,3	4	0,062/0,1/0,1	1/0/0	4/3/2	3/2/1	2/2/2	0/0/0	0/0/0	Conj/Mix/Mix	22	Exito Exito	
8/OD	12/H/42	Queratoconjuntivitis atópica (132)+2 TMA previo: 2/T Catarata	21/20/-	79,2/77,1/-	39,2/40,2/-	2	0,03/0,025/-	1/2/-	1/1/-	2/2/-	2/2/-	1/1/-	0/0/0	Conj/Conj/-	15	Fracaso	Reoperado MSCT-9 (Tabla S4)
9/OD	12/H/42	Queratoconjuntivitis atópica (140)-2 TMA previo +previo MSCT-8: 2/T Catarata	17/21/23	66,7/66,7/75,0	33,9/39,7/27,8	2	0,05/0,05/0,05	2/2/1	1/1/1	2/2/2	2/2/2	1/1/1	0/0/0	Conj/Conj/Conj	15	Fracaso Fracaso	Cumplimiento deficiente Enfermedad sistémica mal controlada
10/0	14/H/53	Aniridia congénita (160): 3/S Catarata, nistagmus, glaucoma	21/20/21	83,3/75,0/85,4	44,7/43,8/47,8	2	0,1/0,08/0,08	1/1/0	2/1/1	2/1/1	2/1/1	3/1/0	0/0/0	Mix/Conj/Conj	28	Exito Exito	Tuvo un CLET anterior (trasplante perdido No. 7) La cirugía de cataratas al mes 20 y no recuperó la visión
11/OD	17/H/28	Caustración (72)+ trasplante de limbo de cadáver previo +TMA+QP: 1/T Conjuntivitis alérgica severa conjuntivitis, catarata, Caustración (360)+TMA	19/13/13	64,6/33,3/33,3	40,3/35,8/46,8	4	0,01/0,01/0,01	3/2/1	1/1/1	4/4/4	3/2/2	1/1/0	0/1/0	Conj/Mix/Conj	20	Exito parcial Exito parcial	QP al mes 13
12/OD	18/M/65	previo+QP+anillos intracorneales: 1/T Catarata	24/16/16	81,3/70,8/79,2	44,1/33,6/37,2	4	0,12/0,5/0,4	2/1/1	1/1/1	3/3/3	2/2/2	2/0/0	0/0/0	Mix/Corn/Conj	29	Exito Exito	QP al mes 20
13/OS	19/H/49	Caustración (80)+trasplante de mucosa oral+2 TMA: 1/S Stevens Johnson (90)+3 TMA	23/19/18	91,7/97,9/83,3	37,5/48,8/38,6	3	0,01/0,2/0,2	1/1/1	2/1/0	2/1/1	2/1/1	1/0/0	0/0/0	Conj/Conj/Conj	20	Exito Exito Exito	QP al mes 24
14/OS	20/H/44	previo: 2/T Cataract	23/16/21	83,3/62,5/81,3	46,1/47,8/42,5	4	0,5/0,3/2	3/2/2	2/2/1	2/2/2	1/1/1	4/3/1	0/0/0	Mix/Conj/Conj	15	Exito Exito	Progresión de la catarata
15/OD	21/M/41	Caustración(45)+5 TMA previo-QP: 1/T Catarata, glaucoma	9/12/7	64,6/64,6/70,8	44,0/33,6/48,0	4	0,01/0,001	4/3/2	4/2/1	4/3/3	3/2/1	4/NP/1	4/2/0	Conj/Conj/Mix	85	Exito parcial Exito	Inicialmente realizado por la inminente perforación
16/OD	22/M/54	Caustración(89)+2 TMA previo: 1/T Catarata	20/18/7	70,8/66,7/89,6	40,6/21,7/36,3	3	0,25/0,25/0,25	2/1/1	1/0/0	1/1/1	2/1/1	0/0/0	0/0/0	Mix/Conj/Conj	30	Exito Exito	
17/OS	22/M/54	Caustración (95)+3 TMA previo: 1/T Catarata	28/22/19	77,1/70,8/56,3	37,0/34,4/33,6	4	0,001/0,001	4/2/1	4/4/3	4/4/4	3/3/2	3/1/0	3/0/0	Conj/Conj/Conj	60	Exito parcial Exito parcial	
Media (DS)		108,9 (77,8)	18,7 (6,5)/16,4 (5,4)/14,2 (5,7)	71,2 (22,5)/66,5 (21,8)/68,9 (24,0)	42,5 (8,0)/42,7 (9,9)/42,4 (9,8)			2 (2)/2 (1)/1 (0)	2 (2)/1 (1)/1 (0)	3 (2)/2 (2)/2 (2)	2 (1)/2 (1)/1,5 (1)				27,6 (21,1)		
Mediana (RI)																	

Los casos evaluables fueron aquellos que alcanzaron al menos 6 meses postoperatorios: * Grupo 1: causticaciones; Grupo 2: enfermedades inflamatorias inmunológicas; Grupo 3: enfermedades no inflamatorias; T: total; S: severo; †: Potencial visual: 1, mejora con CLET solamente (la opacidad corneal era sólo superficial); 2, mejora con una cirugía de trasplante de córnea de diferente forma después de CLET (es decir, eliminación de cataratas); 3, mejoría con posterior trasplante de córnea después de CLET (opacidad corneal era espesor total); 4, mejora con posterior trasplante de córnea más otra cirugía (eliminación de cataratas a menos que se especifique lo contrario) después de CLET; y 0: No hay posibilidad de mejora (es decir, debido a una patología retiniana irreversible); AV: agudeza visual (valores 0,01, 0,001, 0,0001 y 0,00001) equivalente a contando los dedos; el movimiento de la mano, la percepción de la luz, y no hay percepción de la luz, respectivamente); ; ETDRS, Tratamiento Precoz Retinopatía Diabética Estudio; Conj, conjuntival; Mix, mixto; RIQ, rango intercuartil; MCIV, microscopía confocal in vivo; SIDEQ, Single Item Dry Eye Questionnaire; VFQ25, National Eye Institute 25-item Questionnaire de Función Visual (0-100); OSDI, Índice de Enfermedades Superficiales Oculares (0-100); DEP, defecto epitelial persistente; MA, membrana amniótica; TMA, trasplante de membrana amniótica; QP, queratoplastia; DE, desviación estándar; H, hombre; M, mujer; OI, ojo izquierdo; OD, ojo derecho.

