

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



TESIS DOCTORAL

**“ESTUDIO DEL EFECTO DE LAS CÉLULAS
MADRE MESENQUIMALES SOBRE EL
SEGMENTO ANTERIOR DEL OJO EN UN
MODELO EXPERIMENTAL DE
ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA
HUÉSPED OCULAR”**

REBECA LORENZO PÉREZ

2012

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



Trabajo realizado por
Rebeca Lorenzo Pérez
para aspirar al grado de
Doctor en Medicina

Salamanca, 2012

Los directores:

PROF. DR. D. EMILIANO HERNÁNDEZ GALILEA

DR. D. JOSÉ ANTONIO PÉREZ SIMÓN

DR. D. LUIS IGNACIO SÁNCHEZ ABARCA

PROF. DR. D. CLEMENTE MURIEL VILLORIA, Director del Departamento de Cirugía. Facultad de Medicina. Universidad de Salamanca.

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada “Estudio del efecto de las células madre mesenquimales sobre el segmento anterior del ojo en un modelo experimental de enfermedad de injerto contra huésped ocular”, ha sido realizada por Dña. Rebeca Lorenzo Pérez para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, cumpliendo todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa ante el Tribunal Calificador.

Y para que así conste y obre los efectos oportunos, expido el presente certificado en Salamanca, a doce de julio de dos mil doce.

Fdo.: Prof. Dr. D. Clemente Muriel Villoria.

Director del Departamento de Cirugía

PROF. DR. D. EMILIANO HERNÁNDEZ GALILEA. Doctor en Medicina y Cirugía. Profesor titular de la Universidad de Salamanca. Jefe de Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario de Salamanca.

DR. D. JOSÉ ANTONIO PÉREZ SIMÓN. Doctor en Medicina y Cirugía. Jefe de Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

DR. D. LUIS IGNACIO SÁNCHEZ ABARCA. Doctor en Farmacia. Licenciado en Bioquímica.

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado “Estudio del efecto de las células madre mesenquimales sobre el segmento anterior del ojo en un modelo experimental de enfermedad de injerto contra huésped ocular”, realizado por Dña. Rebeca Lorenzo Pérez bajo su dirección en el Departamento de Cirugía, reúne, a su juicio, todos los requisitos exigidos para ser presentado ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Salamanca, 2012

Prof. Dr. Emiliano Hernández Galilea
Simón

Dr. José Antonio Pérez

Dr. Luis Ignacio Sánchez Abarca

A mis padres
A Ibán

AGRADECIMIENTOS

A los directores, a Emiliano Hernández Galilea, por sus enseñanzas durante mi formación como oftalmóloga y en este Trabajo, a Luis Ignacio Sánchez Abarca por su ayuda y su trabajo desinteresado e incansable y a José Antonio Pérez Simón por su apoyo, sus consejos a nivel científico e interés. Me gustaría mostrar mi más sincero agradecimiento, ha sido un honor trabajar bajo su dirección.

A los miembros del Servicio de Oftalmología, en especial a Mercedes por haberme acogido como a una hija, por orientar mis primeros pasos en la Oftalmología, por sus enseñanzas y por su empeño en la realización de esta Tesis.

Al equipo del Prof. Aijón, al Prof. Aijón por su trabajo e interés en este tema, a Rosario, a Marta y a Maite por toda su ayuda en los trabajos de laboratorio, que sin ella no habría sido posible realizar esta Tesis.

A Teresa Flores y a Guti por todo lo que me han enseñado y ayudado con la Anatomía Patológica.

A todos mis amigos por su apoyo y por hacerme olvidar durante largos ratos el duro trabajo de esta Tesis.

A mi familia, por su ánimo, ayuda y porque siempre han estado apoyándome.

A Ibán, por tener paciencia conmigo durante todo este tiempo, por su apoyo y su cariño.

Índice

ABREVIATURAS**19****1. INTRODUCCIÓN****21**

1.1. Anatomía de la superficie ocular	24
1.1.1. Párpados	24
1.1.2. Córnea	26
1.1.3. Limbo esclerocorneal	30
1.1.4. Conjuntiva	33
1.1.5. Glándula lagrimal	36
1.1.6. Película lagrimal	37
1.2. Enfermedad de Injerto contra huésped (EICH)	39
1.2.1. Fisiopatología de la EICH	40
1.2.2. Manifestaciones clínicas	42
1.3. Enfermedad de Injerto contra Huésped Ocular (EICHo)	46

1.3.1. Fisiopatología	46
1.3.1.1. Conjuntiva	46
1.3.1.2. Glándula lagrimal	46
1.3.2. Manifestaciones clínicas	48
1.3.2.1. Superficie ocular	49
1.3.2.2. Glándula lagrimal	51
1.3.3. Opciones terapéuticas actuales	51
1.3.3.1. Lágrimas artificiales sin conservantes	51
1.3.3.2. Evitar la evaporación de la lágrima	52
1.3.3.3. Control del drenaje de la lágrima	52
1.3.3.4. Disminuir la inflamación de la superficie ocular	52
1.3.3.5. Tratamiento sistémico de la EICHo	53
1.4. Células <i>Stem</i> Mesenquimales (CSM)	55
1.4.1. Origen de las CSM	55

1.4.2. Caracterización y cultivo de las CSM	56
1.4.3. Funcionalidad de las CSM	58
1.4.4. Potencial de diferenciación	59
1.4.5. Aplicaciones clínicas de las CSM	60
1.4.5.1. Reparación de tejidos esqueléticos	61
1.4.5.2. Reparación de miocardio	61
1.4.5.3. Aplicación en el contexto del trasplante hematopoyético ..	62

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

63

3. MATERIAL Y MÉTODOS

67

3.1. Material	69
3.1.1. Animales de experimentación	69

3.1.2. Obtención de CSM para cultivos	69
3.1.3. Material no biológico (reactivos)	69
3.2. Métodos	74
3.2.1. Modelo murino de generación de EICHo	74
3.2.2. Obtención, aislamiento y expansión de CSM	75
3.2.3. Administración de CSM mediante inyección subconjuntival	77
3.2.4. Extracción de los ojos, córnea y limbo	78
3.2.5. Procesamiento histológico para microscopía óptica	79
3.2.6. Técnicas inmunohistoquímicas	81
3.2.6.1. Inmunohistoquímica de fluorescencia	82
3.2.6.2. Inmunohistoquímica preinclusión para microscopía electrónica de transmisión	83
3.2.7. Electroforesis en Gel de poliacrilamida (SDS-Page). Western Blot	85
3.2.8. Experimentos murinos	88

4. RESULTADOS

93

4.1.	Animales con EICHo. Análisis clínico y anatomopatológico de la superficie ocular	95
4.1.1.	Signos clínicos de EICH y EICHo	95
4.1.2.	Examen histológico de la superficie ocular en el modelo de EICHo	98
4.2.	Western Blot	105
4.3.	Animales sanos tratados con inyección subconjuntival de CSM. Análisis inmunohistoquímico y ultraestructural de la superficie ocular	107
4.3.1.	Localización de CSM GFP ⁺ inyectadas subconjuntivalmente en ratones sanos	107
4.3.2.	Análisis ultraestructural. Microscopía electrónica	114
4.4.	Animales con EICHo tratados con inyección subconjuntival de CSM. Análisis inmunohistoquímico de la superficie ocular	117

5. DISCUSIÓN

121

5.1. Animales con EICHo. Análisis clínico y anatomopatológico de la superficie ocular	123
5.1.1. Piel periocular	124
5.1.2. Glándula lagrimal	124
5.1.3. Conjuntiva	125
5.1.4. Córnea y limbo esclerocorneal	125
5.2. Animales sanos tratados con inyección subconjuntival de CSM. Análisis inmunohistoquímico y ultraestructural de la superficie ocular	127
5.2.1. Administración de CSM	127
5.2.2. Migración de las CSM	128
5.2.3. Tratamiento del daño tisular: diferenciación vs fusión	129
5.3. Animales con EICHo tratados con inyección subconjuntival de CSM. Análisis inmunohistoquímico de la superficie ocular	132

6. CONCLUSIONES**135**

7. BIBLIOGRAFÍA**139**

Abreviaturas

ABC: Complejo avidina-biotina-peroxidasa

BSA: Suero albúmina bovina

CAT: Células amplificadoras transitorias

CDs: Células dendríticas

CFU-F: Unidades formadoras de colonias fibroblásticas

CMN: Células mononucleadas

CSM: Células madre (stem) mesenquimales

DAB: diaminobencidina

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO: Dimetil sulfóxido

EICH: Enfermedad de Injerto contra Huésped.

EICHo: Enfermedad de Injerto contra Huésped ocular.

EICL: Enfermedad de injerto contra leucemia

GA: Glutaraldehído

GFP: Green Fluorescent Protein

HBSS: Medio Hanks's Balanced Salt Solution

MO: Médula ósea

PBS: Tampón fosfato salino (Phosphate Buffer Saline)

RPMI: Medio celular Roswell Park Memorial Institute

SBF: Suero bobino fetal

SDS: dodecilsulfato sódico

TA: Temperatura ambiente.

TBI: Irradiación corporal total (total body irradiation)

1.

Introducción

El trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos representa la única posibilidad de curación para numerosos pacientes con hemopatías malignas. No obstante, el procedimiento tiene una elevada morbi-mortalidad, provocada, en gran parte, por la Enfermedad de Injerto contra Huésped (EICH), que se debe al efecto citotóxico de los linfocitos T del donante sobre los órganos del paciente. Su incidencia alcanza valores de hasta el 80% en series de pacientes sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos de donante no emparentado¹.

El ojo es un órgano diana de la EICH. Entre el 40-90% de los pacientes con EICH presenta afectación ocular, lo que se conoce como Enfermedad de Injerto contra Huésped Ocular (EICHo). Se caracteriza principalmente por la aparición de un síndrome de ojo seco severo que afecta de manera importante a la calidad de vida de estos pacientes²⁻⁴. No se conoce con exactitud la fisiopatología de la EICHo, está escasamente estudiada y la mayoría de los estudios describen un daño a nivel de la glándula lagrimal y la conjuntiva. No está descrito la afectación a nivel corneal, ni limbar^{3,5} [ENREF 2](#) [ENREF 3](#). El segmento anterior del ojo está formado por diferentes estructuras oculares: conjuntiva, córnea, limbo esclerocorneal, película lagrimal, anejos oculares (párpados, glándula lagrimal principal y el sistema de drenaje lagrimal), cámara anterior, iris, cuerpo ciliar y cristalino. De todas estas estructuras, la conjuntiva, el epitelio corneal, el limbo esclerocorneal, la película lagrimal y los anejos forman una unidad anátomo-funcional denominada superficie ocular que permite proteger el ojo de las agresiones externas y mantener una adecuada transparencia corneal. Es esta unidad anátomo-funcional la que resulta principalmente afectada en el transcurso de la EICH. De modo que al alterarse cualquiera de los componentes de la superficie ocular se provoca una variación en las barreras de defensa del ojo y la transparencia corneal, aumentando el riesgo de aparición de infecciones, molestias oculares y disminución de la agudeza visual⁶ [ENREF 1](#).

Las opciones terapéuticas frente a la EICHo son escasas e ineficaces⁷. Actualmente la mayoría de los tratamientos que se pueden aplicar se centran en aliviar la sintomatología del ojo seco⁸ que se produce como consecuencia de la EICHo. Es por tanto fundamental el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas hacia la prevención y el tratamiento etiológico de la EICHo. Por ello el uso de células stem mesenquimales (CSM) puede convertirse en una buena alternativa para la profilaxis

y tratamiento de la EICHo debido a sus propiedades inmunológicas y su capacidad para diferenciarse a otros tejidos⁹⁻¹⁴ [ENREF 4](#).

1.1. ANATOMÍA DE LA SUPERFICIE OCULAR

Entendemos por superficie ocular una unidad anátomo-funcional de diversas estructuras del ojo y anejos, que permiten mantener la adecuada transparencia corneal, y proteger el ojo de la agresión externa. Bajo esta definición se considera a la conjuntiva, el limbo esclerocorneal, el epitelio de la córnea y la película lagrimal. Los párpados, la glándula lagrimal principal y el sistema de drenaje lagrimal constituyen anejos esenciales para una adecuada homeostasis de la superficie ocular, contribuyendo a la humectación y eliminación de sustancias. Para el mantenimiento de esta homeostasis son también necesarias unas vías nerviosas aferentes y eferentes intactas⁶.

1.1.1. Párpados-

Los párpados constituyen la primera barrera mecánica de protección del globo ocular. Evitan la desecación de la córnea y conjuntiva, protegen la superficie ocular del traumatismo, y por medio del parpadeo es renovada la película lagrimal, eliminando sustancias tóxicas y de desecho. Sus dimensiones varían con la edad, raza y constitución, siendo de unos 10-12mm en sentido vertical y 30mm en sentido horizontal⁶.

Los párpados están compuestos por: (Fig.1 y Fig.2)

- Piel palpebral: se compone de epidermis y estroma. La epidermis es un epitelio estratificado queratinizado sobre una gruesa membrana basal de colágeno tipo IV. Esta membrana es blanco de enfermedades autoinmunes que afectan al resto de la piel del organismo. El estroma o

dermis es laxo y delgado, con escaso tejido adiposo, folículos pilosos y glándulas sudoríparas^{15,16}.

- **Músculo orbicular de los párpados:** es la segunda capa de los párpados bajo la piel. Responsable de la tonicidad palpebral, participa en el drenaje de la película lagrimal y junto al músculo elevador del párpado, en los movimientos palpebrales. Se reconocen en él tres porciones: una porción pretarsal encargada del parpadeo, y las porciones pre-septal y orbitaria encargadas del cierre forzado del párpado y durante el sueño. El músculo de Riolo es la porción del músculo orbicular inmediatamente adyacente y paralelo al borde libre palpebral⁶.
- **Músculos elevadores:**
 - o Elevador del párpado superior.
 - o Músculo de Müller, en el párpado superior.
 - o Retractores del párpado inferior.
- **Tarso:** constituido por tejido colágeno denso. Se localiza entre el músculo orbicular y la conjuntiva. Cada placa tarsal tiene una dimensión aproximada de 30mm de longitud por 1mm de grosor y 11mm de alto la superior y 5mm la inferior. En su interior se encuentran las glándulas de Meibomio¹⁷.
- **Conjuntiva palpebral:** firmemente adherida a la superficie posterior del tarso. Paralelamente al borde palpebral discurre un repliegue de la conjuntiva tarsal⁶.

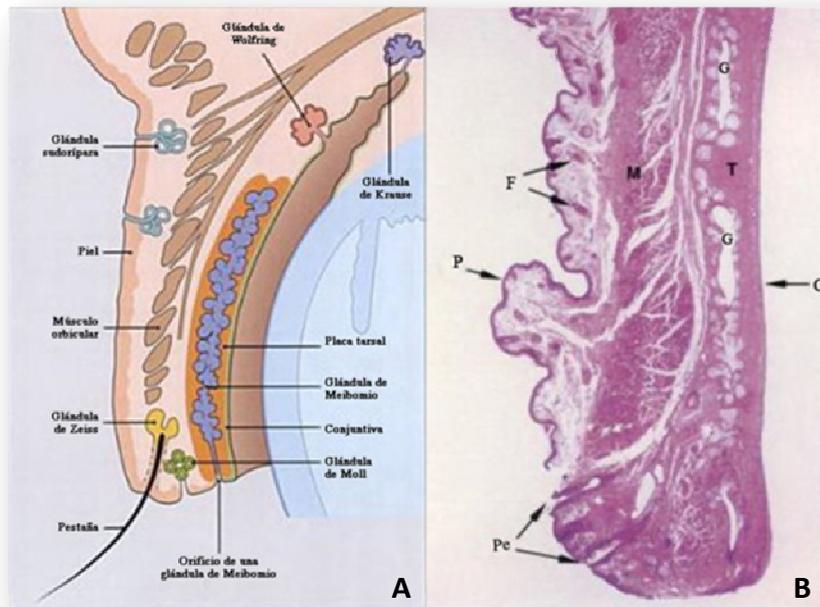


Fig.1: **A.** Esquema del párpado formado por piel, músculo orbicular, tarso y conjuntiva. Contiene varios tipos de glándulas. **B.** Párpado. Tinción con hematoxilina-eosina (16X). Cada párpado está compuesto por una lámina densa fibroelástica, el tarso (T), cubierta externamente por una piel fina y muy plegada (P) y en su parte interna por la conjuntiva lisa (C). La piel contiene folículos pilosos finos dispersos (F). Las fibras musculares (M) del músculo orbicular y del elevador del párpado aparecen sobre el tarso. En el tarso se encuentran las glándulas de Meibomio (G) Asociadas a las pestañas (Pe) están las glándulas de

El borde libre palpebral constituye la zona de transición entre el epitelio estratificado queratinizado de la piel de los párpados y el epitelio columnar no queratinizado de la conjuntiva tarsal. Esta unión mucocutánea se localiza inmediatamente posterior a los orificios de las glándulas de Meibomio. Tiene aproximadamente 30mm de longitud y 2mm de ancho¹⁸.

Los folículos de las pestañas se ubican adyacentes a la cara anterior de la placa tarsal, profundamente en la dermis. Asociado a estos folículos se encuentran las glándulas holocrinas sebáceas de Zeiss y las glándulas apocrinas de Moll que vacían su secreción al lumen del folículo piloso. La secreción de las glándulas de Zeiss contribuye a la lubricación del borde libre palpebral. Se desconoce la función de las glándulas de Moll. La secreción grasa de las glándulas forma una barrera en el borde libre palpebral que impide el rebase del menisco lagrimal⁶.

1.1.2.

Córnea

Macroscópicamente, la córnea es la porción anterior, transparente, de la cubierta externa del ojo. De apariencia elíptica, debido a que el limbo es más prominente en sentido vertical. La córnea mide anteriormente 12,5 x 11,5mm; centralmente es más delgada, con un promedio de aproximadamente 0,52mm, mientras que en la periferia tiene un espesor de 0,62mm. El tercio central denominado zona óptica es casi esférico, con un radio de curvatura promedio de 7,8mm. La córnea periférica es menos curva, pero también variable. La superficie corneal posterior es casi esférica y se ha calculado que su radio de curvatura aproximada es de 6,8mm¹⁹.

Microscópicamente la córnea está formada por cinco capas que de superficie a profundidad son: epitelio, capa de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio. En una situación normal la córnea carece de vasos sanguíneos y linfáticos. (Fig.3)

- **El epitelio corneal:** es un epitelio escamoso estratificado, no queratinizado con un grosor de 50µm en el centro, con cinco estratos celulares (puede variar entre 3 y 7 según los individuos y la zona de la córnea). Está formado por tres tipos de células agrupadas por estratos: escamosas, planas o apicales; intermedias o alares; y basales columnares. Se caracteriza por los abundantes desmosomas presentes en las uniones intercelulares y hemidesmosomas que anclan el epitelio a la membrana basal, confiriendo a este epitelio impermeabilidad y adherencia. La ausencia de queratinización lo hace susceptible a la desecación y traumatismos, por lo que la indemnidad de los párpados y del film lagrimal son esenciales para mantener la transparencia corneal⁶.

Las células escamosas constituyen dos capas. Son de forma poligonal y tienen dos posibles aspectos al ser estudiadas por microscopía electrónica de barrido: las células claras son células más jóvenes, mientras que las células oscuras se admite que son hiper maduras y próximas a la descamación. Estas células epiteliales superficiales no caliciformes, que

producen mucina, expresan las queratinas específicas de la córnea: K₃ y K₁₂. Este marcador es muy importante para diferenciarlo del epitelio conjuntival que tiene células epiteliales superficiales que expresan mucina. En la cara externa de las células superficiales, existen numerosas microproyecciones, denominadas microvilli, que alcanzan una longitud entre 0,5 y 1,2 µm. Existen numerosas uniones estrechas alrededor de todos los bordes laterales de cada célula, que ejercen una función de barrera anatómica al paso de sustancias al espacio intercelular y a resistir las presiones externas. Las moléculas implicadas en la adherencia intercelular son las *Integrinas* y las *Cadherinas*.

La capa de células intermedias tiene una profundidad de tres células; cuanto más superficial es la célula, más plano es su aspecto. El núcleo de estas células alares es paralelo a la superficie. Existe una extensa interdigitación entre estas células con numerosas uniones desmosómicas.

Las células basales situadas en la profundidad componen una única capa de células columnares que descansa sobre la membrana basal. Estas células tienen núcleos ovales que se disponen perpendicularmente a la superficie. Se trata de células mitóticamente activas y las células hijas producidas se desplazan anteriormente para transformarse en células intermedias. Las células basales se unen entre sí utilizando microestructuras que además tienen un papel de comunicación y formación de barreras. Son fundamentalmente tres los distintos tipos de estructuras:

1. Desmosomas, que son interdigitaciones entre las superficies celulares.
2. Uniones estrechas (*tight junctions*), que forman un sistema estanco impidiendo el paso de moléculas.
3. Uniones comunicantes (*gap junctions*), formando canales de iones y moléculas hidrofílicas.

Las células basales también contienen conjuntos de tonofilamentos para mantener la forma celular. Existen filamentos de actina que pueden

desempeñar un papel en la migración celular, como sucede durante la curación de las heridas.

Las células del epitelio corneal están muy adheridas a su membrana basal mediante unos complejos de unión denominados hemidesmosomas. Estos se fijan a las fibrillas de anclaje situadas en la membrana basal, compuestas por colágeno tipo VII, se extienden desde la lámina basal penetrando en la estructura del estroma finalizando en placas localizadas compuestas por colágeno tipo IV y tipo VII, formando un complejo muy entramado²⁰.

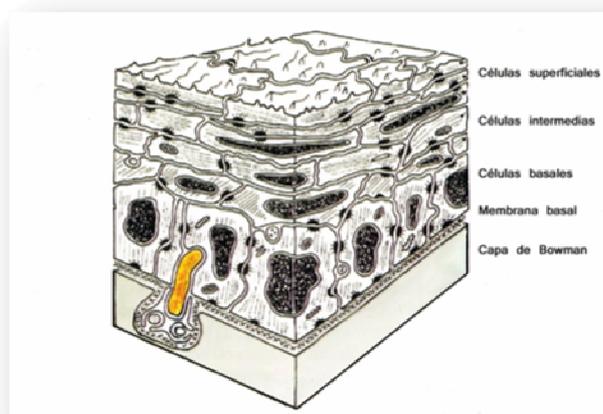


Fig.2: Esquema del epitelio corneal

El epitelio corneal está siendo constantemente renovado, por la actividad mitótica de la capa basal y la exfoliación de las células apicales, estimándose un recambio de 7 días. Además posee una rápida respuesta frente a disrupciones, con un rápido desplazamiento ameboideo de las células adyacentes al defecto hasta cubrirlo en pocas horas. Los hemidesmosomas y otras uniones intercelulares se reforman, y la monocapa celular es reemplazada por una capa de 6 células por la actividad mitótica de las células basales de la periferia del desbridamiento²¹.

- **La capa de Bowman:** membrana acelular, de 8 a 10 μ m de espesor, situada debajo del epitelio. El margen anterior se limita anteriormente por la membrana basal del epitelio y el borde posterior se mezcla con las fibras de colágeno anteriores del estroma. Bajo microscopía la capa de Bowman parece homogénea, pero la microscopía electrónica permite observar que está compuesta por fibrillas de colágeno dispuestas al azar. Carece de capacidad regenerativa cuando se lesiona. Durante el proceso de curación se forma una fina estructura idéntica a la capa de Bowman; sin embargo, esta capa secundaria no recupera su espesor original.
- **El estroma:** constituye aproximadamente el 90% de la córnea, tiene un grosor de 0,45mm en el centro, consta fundamentalmente de fibras de colágeno, células del estroma y sustancia fundamental. El 78% está formado por agua. Las fibrillas de colágeno corresponden aproximadamente al 80% del peso seco de la córnea, la sustancia fundamental está compuesta principalmente por proteoglicanos al 15% y los elementos celulares constituyen tan sólo un 5%, siendo el queratocito la célula que predomina en el estroma.
- **La membrana de Descemet:** tiene un espesor aproximado de 10 μ m en los adultos y se trata de una lámina basal gruesa producida por el endotelio. El anillo de Schawlbé señala el final de la Membrana de Descemet. Mediante microscopía electrónica se observa que la Membrana de Descemet está compuesta por una zona anterior en banda (cuyo componente principal es el colágeno tipo IV) y una posterior homogénea (de colágeno tipo III y IV). A diferencia de la capa de Bowman se desprende del estroma con facilidad, regenerándose con rapidez tras una lesión.
- **El endotelio:** se trata de una única capa de células planas hexagonales. No tienen una gran actividad mitótica en el endotelio tras el nacimiento. La densidad celular disminuye desde 3.500-4.000 células/mm² al nacer a 2.500-3.000 células/mm² en la córnea adulta. Cuando se produce una

pérdida celular por la edad o por un traumatismo, las células vecinas cubren la zona que ha quedado vacía. Lo que da lugar a un aumento del área celular y una disminución de la densidad celular. Las células endoteliales pueden conservar su función a pesar de un aumento enorme de tamaño^{22,23}.

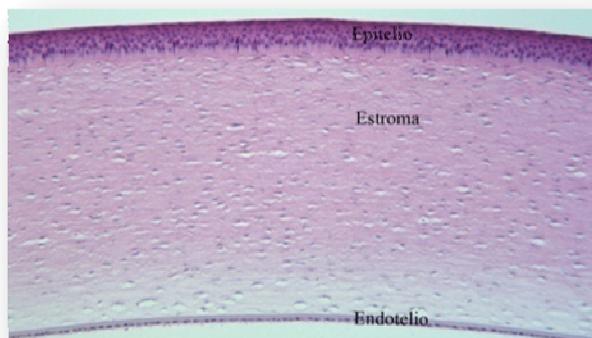


Fig.3: Estructura corneal normal. Tinción con hematoxilina-eosina

La inervación sensorial de la córnea la suministra la primera división del nervio trigémino mediante las ramas ciliares largas y, las ciliares cortas del nervio nasociliar. Unos 70 troncos nerviosos atraviesan la córnea después de penetrar en la esclerótica a escasos milímetros del limbo. Los nervios se abren camino bajo la capa de Bowman, donde forman un plexo subepitelial denso. Atraviesan después la capa de Bowman y finalizan entre las células epiteliales como terminaciones axónicas simples²².

Las fibras simpáticas también inervan la córnea, aunque su función no está totalmente aclarada. Sus cuerpos celulares están en el ganglio cervical superior y sus axones los transporta el nervio trigémino, junto a las fibras sensoriales al epitelio corneal^{22,23}.

1.1.3.

Limbo

esclerocorneal

El limbo es la zona de transición, transparente y vascularizada, entre la conjuntiva y la esclerótica en un lado y la córnea en el otro. Clínicamente, el margen corneal periférico se confunde con la esclerótica y la extensión central del limbo está bastante definida por una línea que une los extremos de la Capa de Bowman y la Membrana de Descemet. (Fig.4 y Fig.5)

En el limbo tienen lugar algunos cambios importantes. El estroma pierde su transparencia y sus láminas pierden su disposición ordenada. Las fibras de colágeno individuales aumentan de tamaño y varían su diámetro y su disposición, adquiriendo las características de la esclerótica. La Capa de Bowman acaba en un extremo redondeado en el margen central del limbo y da origen a tejido conectivo fibroso, en el que se desarrollan las papilas subepiteliales en la zona de la empalizada.

El final de la Capa de Bowman se encuentra en los ápices de los vasos sanguíneos del limbo. El epitelio de la córnea aumenta de grosor en el limbo, conteniendo aproximadamente 12 capas de células. El epitelio se proyecta hacia atrás entre las papilas subepiteliales, que aparecen como líneas blancas orientadas radialmente que cruzan el limbo cada 1-2mm. Estas proyecciones clínicamente visibles se conocen como empalizadas de Vogt. El epitelio corneal y conjuntival a este nivel contiene diferentes queratinas, que permiten su diferenciación inmunohistoquímica.

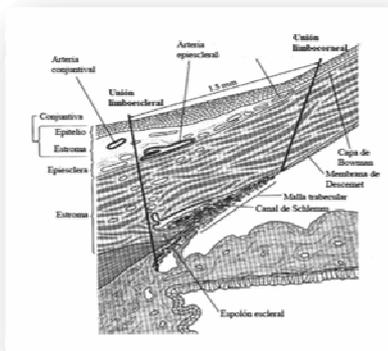


Fig.4: Esquema del limbo esclerocorneal.

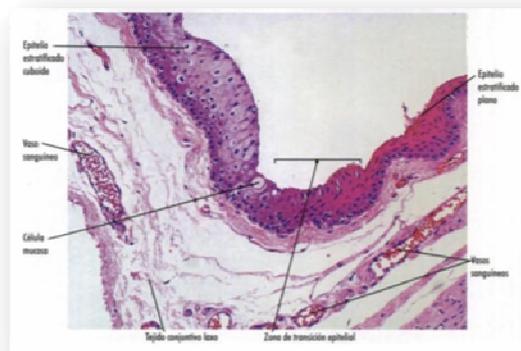


Fig.5: Limbo esclerocorneal. Tinción con hematoxilina-eosina

El limbo tiene una gran importancia en la regeneración del epitelio corneal. El epitelio límbico posee un mayor potencial de proliferación que el epitelio corneal central o periférico²⁴ y contiene una población de células madre cuyas células hijas poblarán la córnea^{25,26}. Estas células se localizan en la base de los salientes epiteliales, y puede que también en la periferia corneal superior²⁷. El limbo superior parece tener una reserva mayor de células epiteliales con características de células madre. La destrucción total del limbo provoca una disminución de la capacidad de regeneración epitelial²² [ENREF 11](#) [ENREF 11](#).

Recientemente se han publicado estudios que demuestran la existencia de células madre en áreas centrales de la córnea²⁸. Aunque, la mayor parte de las células madre del epitelio corneal se encuentran en el limbo. Dichas células, poseedoras de una alta actividad mitótica, carentes de marcadores de queratina y por lo tanto fenotípicamente indiferenciadas, serían las responsables de la repoblación centrípeta de la superficie corneal y, a su vez impedirían el avance del epitelio conjuntival sobre la córnea central²⁵.

El nicho en el que residen las células madre tiene características especiales. Su ubicación entre las empalizadas de Vogt le confiere una protección mecánica frente a agresiones externas. Y la presencia de melanocitos genera un entorno rico en pigmento que protege a las células madre de las radiaciones ultravioleta. La proliferación de las células madre tiene lugar mediante dos vías²⁹:

- La primera es por desplazamiento centrípeto de las células madre desde el limbo hacia el centro de la córnea, que se diferencian a células amplificadoras transitorias (CAT). Estas células pasan a constituir el estrato basal del epitelio corneal, que proliferan para producir las células postmitóticas suprabasales, identificadas como las células alares del epitelio corneal. Las células madre tienen alta capacidad de diferenciación y las células CAT tienen alta capacidad de proliferación.
- La segunda vía proliferativa seguiría una dirección vertical y estaría implicada en la función de barrera para prevenir el avance del epitelio conjuntival.

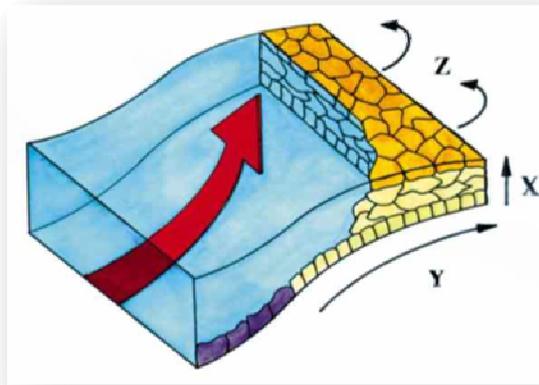


Fig.6: Esquema del desplazamiento en tres fases de las células madre del limbo corneal.

La teoría X Y Z de Thoft resume el desplazamiento de las células epiteliales en tres fases, siendo X el desplazamiento centripeto, Y el desplazamiento vertical, y Z la descamación de las células en la superficie³⁰. (Fig. 6)

Cuando ocurre una disminución de la población de células madre, las células epiteliales de la conjuntiva invaden la córnea, acompañados de tejido fibrovascular que altera la transparencia corneal, e induce un proceso inflamatorio crónico, con defectos epiteliales persistentes y cicatrización estromal. Este proceso se puede detectar precozmente por la presencia de células caliciformes en la citología de impresión de la superficie corneal⁶.

1.1.4.

Conjuntiva

Se trata de una membrana mucosa que cubre la superficie interna de los párpados y la superficie externa del globo ocular. Permite el movimiento independiente de los párpados y del globo, proporciona mucus para la lubricación y contiene tejido linfoide para la protección inmunológica.

La conjuntiva se inicia en la unión mucocutánea del margen palpebral, posterior a los orificios de las glándulas de Meibomio. Está firmemente adherida a los párpados y holgadamente fijada a los fórnices y sobre el globo ocular, excepto en

el limbo. Aproximadamente a 2mm del margen tarsal se halla un surco superficial, el surco subtarsal, que señala la transición desde el epitelio escamoso estratificado no queratinizado del margen palpebral al epitelio cuboideo.

Se distinguen tres porciones: la conjuntiva bulbar que reviste el globo ocular desde el limbo hasta los fondos de saco, la conjuntiva de los fondos de saco y la conjuntiva tarsal que se extiende sobre la superficie tarsal hasta el borde libre de los párpados en la unión mucocutánea.

Microscópicamente, la conjuntiva como todas las membranas mucosas posee una capa epitelial y una lámina propia submucosa. El epitelio escamoso estratificado no queratinizado aparece en el margen palpebral, sobre los 2-3mm más periféricos del tarso, y rodeando el limbo en 2 a 3 mm. El resto de la conjuntiva tarsal y la conjuntiva del fórnix poseen de 2 a 5 capas de células epiteliales, con células basales cuboideas, células cilíndricas superficiales y hasta tres capas de células poliédricas entre ellas. El número de capas celulares aumenta gradualmente sobre la conjuntiva bulbar, siendo las células superficiales cada vez más planas y las basales cada vez más altas, y aumentando el número de capas poliédricas. Las células caliciformes, formaciones celulares apocrinas secretoras de moco, aparecen en todas las regiones conjuntivales. Son más numerosas sobre el tarso y en el fórnix y menos en la conjuntiva bulbar interpalpebral. Poseen una morfología redondeada u ovalada, con un núcleo aplanado cerca de la base celular y un gran almacenamiento intracelular de mucina. El número de células caliciformes aumenta en algunas inflamaciones conjuntivales y disminuye en procesos conjuntivales destructivos.

Las superficies de las células epiteliales conjuntivales están cubiertas por microvellosidades y micropliegues, así como por un delgado glucocáliz y una cubierta de mucina³¹. Esta cubierta aumenta el área de superficie y contribuye a fijar la película lagrimal. Las células epiteliales basales se fijan mediante hemidesmosomas a una membrana basal típica. Se pueden encontrar melanocitos entre el epitelio basal.

El estroma conjuntival consta de dos capas, una capa linfoide superficial y una fibrosa más profunda. La capa linfoide está compuesta por una matriz de tejido conectivo que contiene una población de linfocitos de aspecto homogéneo. Normalmente no aparece ningún folículo germinal. Más profunda se encuentra la capa de tejido fibroso, a través de la cual discurren los vasos y los nervios conjuntivales; su espesor es variable y está muy limitada sobre el tarso.

Sobre el globo ocular, una capa de tejido areolar laxo separa la conjuntiva de la epiesclerótica, denominada Cápsula de Tenon. La Cápsula de Tenon contiene ramas de las arterias ciliares anteriores que han pasado hacia delante de las inserciones de los músculos extraoculares. La Cápsula de Tenon emerge aproximadamente a 3-4mm del limbo junto a la conjuntiva. Normalmente, la conjuntiva y sus vasos pueden moverse libremente sobre la capa de Tenon y sus vasos.

En la conjuntiva aparecen dos tipos de glándulas lagrimales accesorias: las de Krause y las de Wolfring. Sus estructuras son similares a las de las glándulas lagrimales. Las de Krause se localizan en el fórnix superior y en la carúncula, en el tejido conectivo submucoso. Las de Wolfring se localizan en el tarso, en el borde superior del tarso superior y en el borde inferior del tarso inferior.

La conjuntiva recibe su aporte sanguíneo de las ramas muscular, palpebral media y lagrimal de la arteria oftálmica. Las ramas palpebral media y lagrimal forman las arcadas periféricas o marginales de los párpados, localizadas entre el tarso y el orbicular. Las ramas de estas arcadas atraviesan los tarsos hacia la conjuntiva, aproximadamente a nivel del surco subtarsal. Irrigan por completo la conjuntiva, excepto el área situada a 3-4mm del limbo. Se encuentra en esta área una anastomosis de los vasos conjuntivales con las ramas de las arterias ciliares anteriores en la Cápsula de Tenon. Las ramas de la arteria ciliar anterior parecen más oscuras que los vasos superficiales y no se mueven con la conjuntiva.

Los capilares conjuntivales son fenestrados. En situaciones de inflamación, el rezumado a través de estas fenestraciones supera a veces la velocidad con la que el líquido atraviesa la conjuntiva hacia la superficie dando lugar a la aparición de quémosis.

La conjuntiva posee un abundante retículo linfático. Los vasos linfáticos se originan aproximadamente a 1mm del limbo. Los linfáticos de las porciones laterales de la conjuntiva drenan en los ganglios preauriculares e intraparotídeos, y los de las porciones mediales lo hacen en los submandibulares.

La inervación sensorial de la conjuntiva es proporcionada por la división oftálmica del quinto par craneal. Generalmente, la inervación de la conjuntiva tiene la misma fuente que la del párpado, excepto que los nervios ciliares largos inervan la conjuntiva límbica. La única modalidad sensorial que se percibe es el dolor, exceptuando alguna sensación de presión en la conjuntiva tarsal marginal y en la carúncula. También existen fibras autónomas y se asocian con los vasos sanguíneos^{6,22}.

1.1.5. Glándula lagrimal

La glándula lagrimal se localiza en la zona superoexterna de la órbita, rodeada de tejido fibroso que la ancla superiormente al periostio del hueso frontal. En el adulto aproximadamente mide 20x12x5mm y pesa 0,78g. Está dividida en dos lóbulos por la extensión lateral de la aponeurosis del músculo elevador. El lóbulo orbitario más grande comprende el 60-70% de toda la glándula, localizado por detrás del tabique orbitario y por encima de la aponeurosis del elevador; y el lóbulo palpebral, más pequeño, queda situado bajo la extensión lateral de la aponeurosis del elevador, por debajo del lóbulo orbitario. Los dos lóbulos están conectados por vasos, nervios y conductos lagrimales^{32,33}.

Los lóbulos que forman la glándula lagrimal se encuentran separados por tejido conectivo fibrovascular. Cada lóbulo está formado por una unidad acinar y un sistema de conductos. De dos a seis conductos secretores del lóbulo orbitario pasa a través del lóbulo palpebral o a través de la cápsula fibrosa de este lóbulo, uniéndose con los conductos del lóbulo palpebral, para formar de 6 a 12 túbulos que drenan en la zona superoexterna del fórnix conjuntival, a una distancia de 4 ó 5 mm por encima del tarso^{34,35}. Por lo tanto, la escisión del lóbulo palpebral puede interrumpir el drenaje del lóbulo orbitario. Los conductos, revestidos por un epitelio escamoso, pseudoestratificado, no queratinizado, forman un patrón ramificado en la glándula lagrimal; de manera que las secreciones de los acinos drenan a pequeños conductos de diámetro cada vez mayor hasta que forman túbulos de gran calibre, para drenar finalmente en la zona superoexterna del fórnix conjuntival. La superficie de la luz de los conductos contiene microvellosidades similares a las células acinares secretoras. Las paredes epiteliales de los grandes conductos presenta entre 3 y 4 capas de células columnares o cuboideas, a diferencia de los conductos intralobulares más pequeños que sólo tienen una capa de células³⁵.

Cada unidad acinar, o unidad secretora, de la glándula lagrimal está compuesta por una capa interna de células cilíndricas secretoras dispuestas hacia una luz central, rodeadas por una capa basal de células mioepiteliales. Estas células mioepiteliales al contraerse facilitan la salida de las secreciones hacia el sistema de drenaje tubular^{33,36}.

1.1.6. Película lagrimal-

La película lagrimal es la primera superficie refractiva del ojo al generar una interfase lisa entre el aire y el epitelio corneal. Constituye un agente esencial en la oxigenación e hidratación del epitelio corneal. Por otra parte actúa como un agente lubricante de la superficie ocular al disminuir el roce durante el parpadeo y los movimientos oculares.

Además juega un papel fundamental en la defensa frente a la invasión bacteriana. Tiene propiedades antiadherentes y compuestos antibacterianos como la transferrina y la lactoferrina (efectivas contra las bacterias gram-positivas), lisozima (efectiva contra las bacterias gram-negativas y ciertos hongos), beta-lisina, IgA, IgG, factores del complemento y leucocitos que aumentan en número especialmente cuando el párpado está cerrado. También se encuentran en el componente lipídico de la película lagrimal ácidos grasos de cadena corta y larga, siendo los primeros agentes desestabilizadores de la membrana celular bacteriana, y los últimos interfieren en el metabolismo bacteriano. Existen, diluidos en la lágrima, factores que favorecen el trofismo del epitelio corneal, tales como la lactoferrina y el factor de crecimiento epitelial.

Su espesor medio es de $7\mu\text{m}$ aproximadamente, pero es variable. La producción basal de lágrima en situación de reposo es de alrededor de $1,2\mu\text{l}/\text{minuto}$. Su composición es compleja:

- Una capa lipídica, de origen meibomiano principalmente y muy fina ($0,1$ a $0,5\mu\text{m}$), evita la evaporación, la caída de la lágrima y su contaminación externa. Está compuesta por una mezcla de lípidos hidrofílicos e hidrofóbicos en estado líquido a la temperatura de la superficie ocular. Los lípidos hidrofílicos están en contacto con la capa acuosa y los hidrofóbicos se disponen hacia la interfase aérea. Confiere tensión superficial a la película lagrimal, permitiendo su distribución homogénea sobre la superficie ocular.
- La capa principal, acuosa o serosa, de aproximadamente $6,5\mu\text{m}$, representa más del 90% del grosor de la película lagrimal. Se origina en las glándulas lagrimales principal y accesorias. Contiene, además de agua y electrolitos, numerosas sustancias entre las que se incluyen algunas con importancia defensiva, como la lisozima, lactoferrina e inmunoglobulinas. En las lágrimas acuosas aparecen numerosas células, derivadas del epitelio corneal y conjuntival, el tejido linfoide conjuntival y los vasos conjuntivales. Los linfocitos son los más numerosos, seguidos por las células epiteliales descamadas y los leucocitos polimorfonucleares. Esta capa se mezcla progresivamente con la capa mucinosa.

La capa mucinosa o mucosa se encuentra adherida a la superficie epitelial. Está compuesta por el glicocáliz de las microvellosidades de las células epiteliales superficiales de la córnea y por el mucus secretado desde las células caliciformes conjuntivales. La mucina permite la adhesión de la lágrima acuosa a la superficie, de otro modo hidrófoba, del epitelio corneal. Además constituye una barrera contra la invasión bacteriana y de células inflamatorias. Confiere a la película lagrimal mayor estabilidad y disminuye la tensión superficial, favoreciendo la distribución de la película lagrimal por la superficie ocular con el parpadeo. Esta capa tiene un grosor de $0,2 - 0,5\mu\text{m}$ ^{22,23,37,38}.

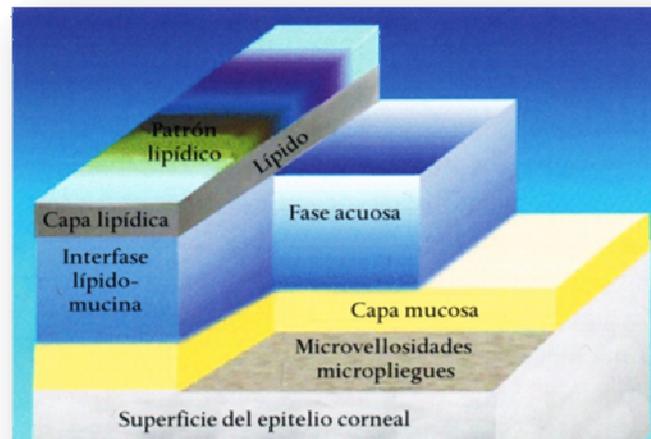


Fig.7: Esquema de la película lagrimal donde se pueden distinguir los tres componentes de la misma

1.2. ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HUÉSPED.

El trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos representa la única posibilidad de curación para numerosos pacientes con hemopatías malignas, lo que justifica el número creciente de trasplantes realizados a nivel mundial desde su desarrollo hace más de 30 años. Se trata, por tanto, de una estrategia terapéutica sobre la que existe una amplia experiencia. A pesar de ello, hoy en día los resultados de los trasplantes están lejos de ser los idóneos y esto se debe, en gran medida, a la elevada toxicidad relacionada con el procedimiento, que puede provocar hasta un 20-50% de mortalidad^{39,40}. En concreto, la Enfermedad de Injerto contra Huésped (EICH), que se debe al efecto citotóxico de los linfocitos T del donante sobre tejidos y órganos vitales del paciente, es la complicación más grave tras el trasplante, con una incidencia de hasta el 80% en [ENREF 1](#) series de pacientes sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos de donante no emparentado¹. Sin embargo, precisamente en este reconocimiento y efecto citotóxico de los linfocitos del donante frente antígenos extraños reside también el efecto curativo del trasplante alogénico, de manera que los linfocitos desencadenan una respuesta inmune frente al tejido hematopoyético y las células tumorales del paciente, provocando el efecto injerto contra leucemia (EICL)^{41,42}. [ENREF 22](#)

A pesar de los esfuerzos de numerosos grupos de investigación a nivel mundial durante muchos años, en la actualidad aún no se ha podido desarrollar ningún procedimiento que permita separar el EICL (beneficioso) del EICH (perjudicial) de manera que, en la práctica, los procedimientos más eficaces en la prevención del EICH, como la depleción de linfocitos T del donante, provocan también una inmunosupresión más profunda y, por tanto, un mayor riesgo de recaída (menor EICL) o de infecciones potencialmente fatales en el período postrasplante⁴³.

1.2.1. Fisiopatología de la EICH-

Los primeros pacientes que recibieron médula ósea después de un trasplante alogénico desarrollaron un cuadro clínico que se denominó “Enfermedad Secundaria”, y las manifestaciones clínicas incluirían afectación de piel, tracto gastrointestinal e hígado.

En 1966 Billingham formuló los tres requerimientos necesarios para el desarrollo de EICH:

- El injerto debe contener células inmunocompetentes.
- El receptor debe de tener antígenos tisulares que no estén presentes en el donante.
- El receptor debe ser incapaz de producir una respuesta efectiva para eliminar las células trasplantadas.

Actualmente conocemos que estas células inmunocompetentes son linfocitos T y que la EICH tiene lugar cuando los linfocitos T son transferidos de una persona inmunocompetente a otra incapaz de eliminarlas^{44,45}.

La EICH se clasifica como aguda o crónica en función de sus manifestaciones clínicas y del momento de aparición. La EICH aguda suele aparecer durante los tres primeros meses tras el trasplante y la EICH crónica a partir de los 3 meses, con una mediana de aparición de 6-9 meses post-trasplante⁴⁶. Los factores de riesgo para el desarrollo de EICH crónica son: haber padecido EICH aguda, el aumento de la edad media de los receptores, el empleo de precursores hematopoyéticos de sangre periférica, la disparidad de HLA entre donante y receptor, y el aumento de la supervivencia⁴⁷⁻⁵⁰ [ENREF 28](#)

Aunque la EICH es un proceso complejo, el papel fundamental en su desarrollo se atribuye a las células dendríticas (CDs) del receptor, que actúan como células presentadoras de antígenos a los linfocitos T del donante, específicamente a aquellos que reconocen antígenos del receptor (células T aloreactivas)^{51,52}. La EICH crónica se inicia con la expansión de linfocitos T del donante en respuesta

a alo o auto-antígenos, que escapan a los mecanismos de supresión a nivel tímico o en sangre periférica⁵³.

La unión del linfocito T al antígeno a través de su receptor TCR/CD3 conduce a la activación de diversas tirosin-quinazas, PKC, PLC y a la activación de calcineurina [ENREF 32 ENREF 32 ENREF 32](#). Sin embargo, para que la interacción antígeno-linfocito T provoque una respuesta inmune adecuada, deben activarse otras vías de señalización a través de moléculas co-estimuladoras como CD28 o CD40L. Estas vías finalmente convergen en factores de transcripción como NF- κ B, NFAT o AP-1 que inducen la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune o la proliferación celular como p27 o bcl-2⁵⁴.

El papel de la auto o alo-reactividad en el contexto de la EICH crónica constituye un área de debate que permanece sin clarificar. La alo-reactividad frente a antígenos menores de histocompatibilidad explica la EICH crónica como una manifestación o fase tardía de EICH aguda. Sin embargo, las manifestaciones clínicas de la EICH crónica frecuentemente se asemejan a las descritas en el contexto de enfermedades autoinmunes y algunos estudios han identificado linfocitos T reactivos frente a antígenos no polimórficos comunes (compartidos por donante y receptor) que aparecerían en el contexto de un daño a nivel tímico y ausencia de selección negativa⁵⁵. Por tanto, la EICH crónica depende de la persistencia de linfocitos T que no desarrollan una respuesta inmuno-tolerante frente a antígenos del receptor. Por otra parte, se detectan anticuerpos antinucleares, antiDNA o antimúsculo liso hasta en el 62% de los casos. Además, se ha encontrado una clara relación entre la generación de anticuerpos anti-Y⁵⁶ o la expresión del marcador de activación BAFF (B-cell activating factor), que promueve la supervivencia y diferenciación de los linfocitos B, y el desarrollo de EICH crónico, lo que pone de relieve la importancia de la respuesta inmune humoral en su aparición. Las citocinas predominantes en la EICH crónica son las Th2 anti-Y^{56,57}.

Además de la alteración en la función tímica, se aprecian alteraciones funcionales a nivel periférico que pueden contribuir al desarrollo de la EICH crónico. En este sentido, tanto las células dendríticas (CDs) del donante como las del receptor pueden contribuir al desarrollo de la EICH crónico mediada por linfocitos CD4 en la piel (fundamentalmente las CDs del receptor) o en el tubo

digestivo (las del donante). Otros mecanismos implicados en la regulación y homeostasis del sistema inmune a nivel periférico, como los linfocitos T reguladores, se encuentran disminuidos en el contexto de la EICH crónica⁵¹.

1.2.2. Manifestaciones clínicas

La EICH aguda es una entidad clínico-patológica caracterizada por la aparición de erupciones cutáneas, alteraciones intestinales y hepáticas^{49,52} [ENREF 47](#). (Tabla1)

- Piel: es el órgano más comúnmente afectado y se caracteriza por un eritema maculopapuloso pruriginoso localizado o generalizado que puede cursar en los casos más graves con la formación de bullas o necrosis epidérmica⁵⁸.
- Hígado: la alteración de las pruebas de función hepática es frecuente durante el período post-trasplante inmediato como consecuencia de la enfermedad veno-oclusiva, la toxicidad del acondicionamiento, infecciones virales, sepsis, sobrecarga férrica y otras causas de obstrucción biliar extrahepática. La afectación hepática secundaria a la EICH se caracteriza por un aumento de la bilirrubina conjugada y fosfatasa alcalina como consecuencia de la afectación de los canalículos biliares produciéndose un incremento de transaminasas.
- Afectación gastrointestinal: puede cursar con la aparición de anorexia, náuseas, vómitos e intolerancia alimentaria, diarrea, dolor abdominal y en casos graves hemorragia e íleo⁵⁹. La presencia de hemorragia digestiva como resultado de la ulceración de la mucosa se asocian con un mal pronóstico⁶⁰.

En cuanto a la EICH crónica, puede afectar prácticamente cualquier órgano, remedando diversas enfermedades autoinmunes, la clasificación propuesta

en el National Institute of Health Consensus Development Project pretende establecer 3 grupos de pacientes en función del número de órganos afectados por la EICH crónica y el grado de afectación de cada órgano, de manera que divide la EICH crónica en: (1) leve: afectación de uno o dos órganos (excepto el pulmón) con una puntuación máxima de 1; (2) moderada: 3 ó más órganos afectados con una puntuación máxima de 1 o siempre que un órgano tenga una puntuación de 2 (salvo el pulmón en el que es suficiente una puntuación de 1); (3) grave: cuando al menos 1 órgano alcanza una puntuación de 3 (o bien el pulmón alcanza una puntuación de 2). Mientras que los tipos moderado y grave requieren tratamiento inmunosupresor sistémico el leve puede manejarse con tratamiento tópico^{1,46} (Tablas 1 y 2) .

CRITERIOS:	DIAGNÓSTICO	CARACTERÍSTICO	OTROS	COMÚN CON EICH AGUDA
Piel	Poiquilodermia Liquen plano Cambios escleróticos Morfea, liquen escleroso	Despigmentación	Alt. sudación Ictiosis Queratosis pilaris Hipo/hiperpigmentación	Eritema Rash maculopapular Prurito
Uñas		Distrofia Estrías longitudinales Uñas quebradizas Onicolisis Pterigium ungueal Pérdida ungueal		
Cuero cabelludo		Alopecia cicatricial Lesiones descamativas Lesiones papuloescamosas	Fragilidad capilar Encanecimiento prematuro	
Boca	Lesiones liquenoides Placas hiperqueratósicas (leucoplaquia) Esclerosis	Xerostomía Mucocele Pseudomembranas Úlceras		Gingivitis Mucositis Eritema Dolor
Ojos		Sequedad, dolor Conjuntivitis cicatricial Queratoconjuntivitis seca	Fotofobia Hiperpigmentación periorbital Blefaritis	
Genitales	Liquen plano, cicatrices o estenosis vaginal	Erosión, fisuras, úlceras		
Digestivo	Membrana esofágica Estenosis hasta 1/3 medio (documentados por		Insuficiencia pancreática exocrina	Anorexia, náuseas, vómitos, diarrea, pérdida de peso, retraso de crecimiento

	endoscopia o contraste)		(niños)
Hígado			Bilirrubina total, fosfatasa > 2 veces el límite superior de la normalidad (N) AST ó ALT > 2 x N
Pulmonar	Bronquiolitis obliterante diagnosticada por biopsia	Bronquiolitis obliterante diagnosticada por espirometría y radiología	Bronquiolitis obliterante con neumonía organizada
Muscular, fascia	Fascitis, rigidez o contracturas articulares secundarias a esclerosis	Miositis ó polimiositis (requiere biopsia)	Edema, calambres, artralgia, artritis

Tabla 1: Signos y síntomas de la EICH crónica.

CRITERIOS:	DIAGNÓSTICO	CARACTERÍSTICO	OTROS	COMÚN CON EICH AGUDA
Hematológico e inmunológico			Trombocitopenia, eosinofilia, linfopenia, hipo/hipergammaglobulinemia, autoanticuerpos	
Otros			Ascitis, derrame pleural o pericárdico, neuropatía, síndrome nefrótico, miastenia gravis, alt conducción a nivel cardíaco, miocardiopatía	

Tabla 1 (continuación): Signos y síntomas de la EICH crónica.

	Puntuación: 0	Puntuación: 1	Puntuación: 2	Puntuación: 3
Estado general	Asintomático ECOG 0 Karnofsky 0	Sintomático; paciente ambulatorio, limitado únicamente con actividad intensa ECOG 1 Karnofsky 1	Sintomático, paciente ambulatorio, capaz de llevar a cabo medidas elementales de higiene personal ECOG 2 Karnofsky 2	Sintomático, capacidad limitada para llevar a cabo medidas de higiene personal ECOG 3 Karnofsky 3

Piel Rash maculopapuloso Similares a liquen plano, Ictiosis o lesiones papuloescamosas Hiperpigmentación Hipopigmentación Queratosis pilaris Eritema, Eritrodermia Poiquilodermia Cambios escleróticos Prurito Afectación capilar Afectación ungüeal % SCA	Asintomático Sin hallazgos a la exploración	<18% SCA pero sin signos de esclerosis	19-50% SCA o lesiones superficiales escleróticas (la rigidez permite “pellizcar” la piel)	> 50% SCA o cambios escleróticos profundos (no se puede “pellizcar” la piel) o alteración de la movilidad ulceraciones o prurito severo
---	---	---	---	---

Tabla 2: Clasificación de la EICH crónica. National Institute of Health Consensus Development Project

	Puntuación: 0	Puntuación: 1	Puntuación: 2	Puntuación: 3
Boca	Asintomático	Sintomatología leve con signos de enfermedad en mucosa pero que no limita la ingesta	Sintomatología moderada con signos de enfermedad en mucosa y limitación parcial de la ingesta oral	Sintomatología severa con signos de enfermedad que limitan la ingesta
Ojos Schirmer > 10 mm 6-10 mm < 5 mm	Asintomático	Síntomas leves de ojo seco que no afectan la AC (requiere gotas oculares ≤ 3 / día) ó asintomático con signos de QS	Síntomas moderados que afectan parcialmente la AC (gotas > 3 / día) sin afectación de agudeza visual	Síntomas severos que afectan la AC ó incapacidad para trabajar debido a la sintomatología ocular ó pérdida de visión causada por QS
Tubo digestivo	Asintomático	Disfagia, anorexia, náuseas, vómitos, dolor abdominal o diarrea sin pérdida significativa de peso (< 5%)	Síntomas asociados a pérdida moderada de peso (5-15%)	Síntomas asociados a pérdida de peso > 15%, requiere aporte nutricional ó dilatación esofágica
Hígado	PFH normales	Alteración PFH < 2 x LSN	Bilirrubina > 3 mg/dL o enzimas hepáticas 2-5 x LSN	PFH > 5 x LSN
Pulmones FEV1 DLCO	Asintomático	Síntomas leves (disnea tras subir un piso de	Síntomas moderados (disnea tras caminar en llano)	Síntomas graves (disnea de reposo)

	FEV1 > 80% ó PFP	escaleras) FEV1 60-79% ó PFP 3-5	FEV1 40-59% ó PFP 6-9	FEV1 < 39% ó PFP 10-12
Articulaciones y músculos	Asintomático	Tirantez en brazos o piernas, movilidad articular normal o levemente disminuida que no afectan la AC	Tirantez en brazos o piernas o contracturas articulares, eritema debido a fascitis, movilidad articular afectada moderadamente que limita la AC de manera leve o moderada	Contracturas con afectación severa de la movilidad articular que afecta severamente la AC (incapaz de atarse los zapatos, vestirse, etc)
Tracto genitourinario	Asintomático	Sintomático con signos de afectación leve que no afectan el coito; mínimas molestias a la exploración ginecológica	Sintomático con signos moderados de afectación a la exploración con dispareunia leve o molestias a la exploración	Sintomático con signos severos de afectación (estenosis, ulceración) con dispareunia severa o imposibilidad de introducir un espéculo ginecológico

Tabla 2 (continuación): Clasificación de la EICH crónica. National Institute of Health Consensus Development Project

1.3. ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HUÉSPED OCULAR

1.3.1.

Fisiopatología

La EICHo causa un síndrome de ojo seco severo que afecta de manera importante a la calidad de vida de estos pacientes provocando además de graves molestias, disminución de la agudeza visual e incluso puede ser causa de ceguera⁶¹; sin embargo no se conoce con exactitud la fisiopatología de la enfermedad de injerto contra huésped ocular debido a su complejidad y a los numerosos factores implicados^{3,4,62,63} [ENREF 2](#). La mayoría de los estudios

demuestran la afectación de la conjuntiva y la glándula lagrimal, los cambios en la córnea y el limbo esclerocorneal no están descritos⁶⁴⁻⁶⁶.

1.3.1.1. Conjuntiva

Existen pocos trabajos que profundicen en la fisiopatología de la EICH ocular, Rojas et al. pusieron de manifiesto que en la conjuntiva tras el trasplante alogénico existen más células CD3+ y CD14+ en el epitelio, más linfocitos T (CD3+, CD4+, CD8+) y células CD14+ en el estroma y una mayor expresión de VLA-4 y LFA-1 en el estroma. Además en los pacientes con trasplante alogénico que presentaban signos o síntomas de ojo seco observaron un aumento de células CD14+ en epitelio y estroma comparado con los pacientes sin estos signos o síntomas. Demostraron también que en los pacientes con queratoconjuntivitis sicca existía un cociente CD4/CD8 mayor que en los pacientes que no tenían queratoconjuntivitis sicca⁶⁵. Por otra parte, Aronni S y cols. demostraron en otro estudio sobre las características de la conjuntiva en la EICH ocular una disminución de la densidad de células caliciformes que se correlacionaba directamente con una disminución del test de Schirmer y un aumento en la expresión de los marcadores inflamatorios⁶⁷.

1.3.1.2. Glándula lagrimal

La característica histológica principal encontrada en la glándula lagrimal es una marcada fibrosis en el intersticio y un notable incremento de fibroblastos, con una moderada infiltración linfocítica⁶⁸. Los linfocitos, predominantemente T, se localizan en el área periductal de la glándula lagrimal⁶⁹. Estos hallazgos son más numerosos en los pacientes con EICHo severo que en los casos moderados. La microscopía electrónica de la glándula lagrimal en la EICH crónica ha revelado la presencia de fibroblastos estromales junto a células inflamatorias, fundamentalmente células T. Además, se ha observado en los fibroblastos, un retículo endoplásmico bien desarrollado y la síntesis de nuevas fibrillas de colágeno en la matriz extracelular, que indican que los componentes de la matriz extracelular están produciéndose activamente. Clínicamente se ha visto que la severidad del ojo seco se correlaciona directamente con la extensión de los cambios fibróticos, más que con la infiltración linfocítica⁶¹.

Por otra parte, Anderson et al. observaron que los fibroblastos del donante se encontraban en la glándula lagrimal, sugiriendo que estos participaban en el exceso de fibrosis existente en los pacientes con EICH ocular crónico^{70,71}.

Además, en la glándula lagrimal, la lámina basal de los vasos presentan múltiples capas, lo que indica múltiples daños en la pared de esos vasos y reparación de los mismos. Estos cambios se observan con frecuencia en vasculopatías sistémicas como en la diabetes mellitus y la artritis reumatoide. También la lámina basal de los conductos y los lóbulos de la glándula lagrimal de estos pacientes presenta múltiples capas y un adelgazamiento que se correlaciona directamente con la gravedad del ojo seco del paciente⁶⁸.

La región periductal de la glándula lagrimal en la EICHo crónica es uno de los principales sitios de activación de células T CD4+ y CD8+. Una subpoblación de estas células expresan el marcador de activación CD154⁶⁹. Además junto a estas células T se encuentran fibroblastos que actúan como células presentadoras de antígenos, expresan moléculas HLA-DR, moléculas de adhesión y coestimuladoras como CD45, CD54, CD40, CD80 y CD86⁶⁸. La presencia de linfocitos T CD4+, CD8+, células T CD154+ activadas, mononucleares y fibroblastos que expresan HLA-DR y CD54 y otras moléculas coestimuladoras hacen que se considere la región periductal como un sitio de activación de células T en los pacientes con EICH crónico⁶⁹.

Por tanto, en la EICHo crónica las células T CD4+ y CD8+ son activadas en la región periductal de la glándula lagrimal por células presentadoras de antígenos. Después estas células T activadas llevan a cabo su actividad citotóxica sobre las células epiteliales de la glándula lagrimal⁶¹, dando lugar a una ectasia ductal^{68,69}. De este modo, es explicable que en los pacientes con EICHo crónica se haya observado una ectasia de la glándula lagrimal, con una dilatación de los conductos y una obstrucción de la luz de los mismos, cambios similares a los observados en la vía biliar en el hígado en los pacientes con EICH^{62,66,72-76}.

Adam S. Hassan y cols. han descrito cambios histológicos, muy similares a los observados en humanos, en la glándula lagrimal en modelos murinos de EICH. A las dos semanas del trasplante observaron la aparición de un infiltrado inflamatorio alrededor de los conductos de la glándula lagrimal, retención de la

secreción en los conductos de la glándula lagrimal y restos de células epiteliales en la luz de los conductos, fibrosis periductal y apoptosis. El infiltrado leucocitario observado estaba constituido por células CD3+ (primordialmente CD8+ y en menor medida CD4+). A diferencia de otros órganos no se observó endotelitis. Todos los cambios observados se incrementaban a partir de las 6 semanas postraplante⁷⁷.

1.3.2. Manifestaciones clínicas de la EICHo

Las alteraciones oculares pueden afectar hasta el 40- 90% de los pacientes con EICH^{4,78}. Pueden aparecer en pacientes con EICH agudo o crónico, pero es más frecuente en los pacientes con EICH crónico, además en éstos las manifestaciones son más graves^{72,78}.

Todas las capas del ojo pueden resultar afectadas, incluyendo párpados, glándula lagrimal, conjuntiva, córnea, vítreo, coroides y nervio óptico, aunque la afectación del polo posterior es muy rara. La glándula lagrimal y la superficie ocular son las que más se afectan⁶⁶.

Las manifestaciones oculares de la fase aguda incluyen la aparición de una conjuntivitis pseudomembranosa que se relaciona con el desarrollo de una EICH aguda y se ha asociado a una menor supervivencia del trasplante. La inflamación conjuntival y la aparición de pseudomembranas se atribuyen a una pérdida completa del epitelio conjuntival. Otras manifestaciones más infrecuentes descritas son la escleritis posterior con desprendimiento coroideo y glaucoma secundario, e infecciones por virus del herpes simple⁷⁹.

Las complicaciones tardías de la EICH son la queratoconjuntivitis seca, la disfunción de las glándulas de Meibomio, complicaciones corneales secundarias a queratoconjuntivitis seca, la aparición de cataratas y más raramente manifestaciones en el segmento posterior como retinopatía isquémica, edema macular quístico, retinopatía proliferativa, afectación del nervio óptico, úvea e incluso órbita^{3,80}.

1.3.2.1. Superficie ocular

El Síndrome de ojo seco es la complicación más frecuentes de la EICH, apareciendo en el 40-76% de los pacientes^{2-4,78,81}. Algunos autores han relacionado directamente la gravedad del ojo seco con la severidad de la EICH³. En la mayoría de los pacientes la queratoconjuntivitis sicca persiste a pesar de la resolución de la EICH^{3,81,82} [ENREF 79](#).

El Síndrome de ojo seco se considera una enfermedad multifactorial de la lágrima y de la superficie ocular que provoca síntomas de incomodidad o molestias, alteración de la agudeza visual, e inestabilidad de la película lagrimal con daño potencial a la superficie ocular. Se acompaña de incremento de osmolaridad de la lágrima e inflamación de la superficie ocular^{83,84}. El ojo seco se diagnostica por la historia clínica, la disminución del tiempo de ruptura lagrimal (≤ 10 segundos), la tinción de la superficie ocular con fluoresceína y rosa de bengala, la prueba de Schirmer y otras pruebas complementarias como la medición de la osmolaridad en la lágrima, la citología de impresión y bioquímica de la lágrima^{85,86}. Los criterios diagnósticos de Síndrome de ojo seco de acuerdo con American-European Consensus Group for Sjögren Syndrome son: un test de Schirmer ≤ 5 mm en 5mm sin anestesia tópica y/o tinción positiva de la superficie ocular⁸⁷.

En la EICHo la afectación inicial de la superficie ocular se caracteriza por la aparición de una conjuntivitis no infecciosa pseudomembranosa, que puede acompañarse de quémosis conjuntival y alteración del epitelio corneal^{72,81}. Se han descrito 4 estadios de EICH conjuntival:

- Estadio 1: caracterizado por la aparición de hiperemia conjuntival sin otros cambios.
- Estadio 2: incluye quémosis y/o un exudado serosanguinolento.
- Estadio 3: se observa la aparición de pseudomembranas.
- Estadio 4: además de pseudomembranas se puede ver una alteración en el epitelio corneal (ulceración)⁸⁸.

Estos estadios describen la gravedad de la afectación conjuntival y generalmente indican una progresión de la enfermedad. Aunque los pacientes pueden pasar progresivamente de un estadio a otro, es frecuente ver pacientes con inicio de la

enfermedad en estadio 3⁸². También el estadio 2 con frecuencia no sigue al estadio 1.

Es muy importante conocer la historia clínica del paciente para determinar el estadio de la EICHo puesto que la quémosis (que caracteriza el estadio 2) puede producirse por una retención de líquidos, el tratamiento con corticoides o una alteración en el balance de electrolitos. La hiperemia conjuntival, que corresponde al estadio 1, incluye una amplia gama de alteraciones conjuntivales que implique inflamación.

El estadio 3 se puede describir como conjuntivitis pseudomembranosa. Es importante un diagnóstico adecuado de pseudomembranas nada más aparecer, porque en la mayoría forman cicatrices membranosas fibrovasculares, que persisten como conjuntivitis cicatriciales⁶⁴. En el estadio 4 se incluyen las alteraciones del epitelio (queratitis, úlceras) añadido a la conjuntivitis pseudomembranosa. Mientras el estadio 3 se puede observar en la EICH crónica y aguda inmediatamente después del día 100, el estadio 4 aparece típicamente en las fases aguda e hiperaguda post-trasplante⁶⁴.

Las lesiones conjuntivales no influyen en la gradación sistémica, importante durante los primeros 100 días postrasplante, aunque se ha sugerido que la existencia de lesiones oculares conjuntivales se relaciona con menor supervivencia⁸⁸

Otros procesos inflamatorios que se han observado en la EICHo, son la queratoconjuntivitis límbica superior y la epiescleritis⁶⁴.

La queratoconjuntivitis límbica superior asociada a EICHo aparece en pacientes con un test de Schirmer sin anestesia menor de 5mm, con un proceso cicatricial de conjuntiva tarsal. Este proceso es más frecuente cuando la fuente del trasplante procede de sangre periférica.

La epiescleritis bilateral desaparece empleando corticoides tópicos⁶⁴. La cicatrización conjuntival es relativamente frecuente en la EICH crónica⁸⁹.

Igual que a nivel sistémico la EICH provoca daños similares a una enfermedad autoinmune, en el ojo las manifestaciones clínicas son similares a las que aparecen en enfermedades autoinmunes como la conjuntivitis cicatricial en

pénfigo, la queratoconjuntivitis sicca en el síndrome de Sjögren, escleritis y epiescleritis en la artritis reumatoide⁶⁴.

1.3.2.2. Glándula lagrimal

La afectación de la glándula lagrimal y la queratoconjuntivitis sicca es otro hallazgo importante en la EICHo. La disfunción de la glándula lagrimal se asocia principalmente con EICH crónica, pero también puede aparecer en los casos agudos⁷². Un test de Schirmer menor o igual a 5mm o la aparición de queratoconjuntivitis sicca con un Schirmer de 6-10mm es suficiente para hacer el diagnóstico de EICH ocular en pacientes con EICH que afecta al menos a un órgano⁴⁶.

1.3.3. Opciones terapéuticas actuales para la EICHo

La mayoría de los tratamientos actuales se centran en aliviar la sintomatología del ojo seco que se produce como consecuencia de la EICHo, mediante el empleo de lubricantes, evitando la evaporación de la lágrima, el drenaje de la lágrima, disminuyendo la inflamación de la superficie ocular y controlando la respuesta inmunológica^{7,8}.

El tratamiento de primera línea es el empleo frecuente de lágrimas artificiales y esteroide tópicos sin conservantes, asociado a la oclusión lagrimal, que conseguirían controlar un porcentaje significativo de los casos^{90,91}.

1.3.3.1. Lágrimas artificiales sin conservantes

Es la primera opción terapéutica para el tratamiento de la queratitis, disminuye la clínica del ojo seco y mejora la agudeza visual⁹². Cuando las aplicaciones deben ser muy frecuentes, se pueden emplear lágrimas artificiales más viscosas que permanecen más tiempo en la superficie ocular⁷⁸. En la pauta de administración se puede usar una combinación de lágrimas en función de la actividad o necesidades del paciente.

1.3.3.2. Evitar la evaporación de la lágrima

- Se debe evitar la exposición al viento sin gafas y ambientes con poca humedad y si es necesario proteger los ojos con gafas cerradas⁹³.
- Los pacientes deben realizar medidas de higiene palpebral para obtener un correcto funcionamiento de las glándulas de Meibomio que son las que producen la capa lipídica de la película lagrimal responsable de evitar la evaporación de la lágrima.
- La Doxiciclina se emplea en el tratamiento de la blefaritis con meibomitis para estabilizar la capa lipídica de la película lagrimal, además tiene propiedades antiinflamatorias⁹⁴.
- En los casos refractarios al tratamiento, puede ser necesario realizar una cirugía para disminuir la exposición de la superficie ocular mediante una tarsorrafia⁹⁵.
- Las lentes de contacto de apoyo escleral duras o gafas con cierre apropiado para que formen una cámara en contacto con el ojo, pueden ser útiles en los casos severos⁹⁶.

1.3.3.3. Control del drenaje de la lágrima.

Para disminuir el drenaje de la lágrima desde la superficie ocular, puede realizarse una oclusión permanente o temporal de los puntos lagrimales en pacientes con ojo seco severo (Test de Schirmer <5mm). De manera temporal se puede realizar usando unos tapones de silicona, si se pierden repetidas veces se puede ocluir el punto lagrimal con cauterio de forma permanente, en ocasiones son necesarios varios tratamientos porque el punto lagrimal se reabre⁹⁷⁻⁹⁹.

1.3.3.4. Disminuir la inflamación de la superficie ocular

- Los corticoides tópicos preferiblemente sin conservantes son el tratamiento de primera línea en las exacerbaciones de la EICHo cuando la inmunosupresión sistémica se reduce gradualmente¹⁰⁰. Los corticoides tópicos también son beneficiosos en los casos de conjuntivitis cicatricial y la formación de pseudomembranas⁸⁹. Los principales efectos secundarios de los corticoides son el aumento de la presión intraocular, la formación de cataratas y la aparición de queratitis infecciosas.

- La ciclosporina A tópica al 1% controla la respuesta inmune a nivel de la superficie ocular de forma eficaz y segura¹⁰¹. De forma tópica se alcanzan concentraciones en conjuntiva y humor acuoso mayores que si se administra de forma sistémica¹⁰². No se conoce bien la forma en la que actúa la ciclosporina en la función lagrimal, pero incrementa los valores del test de Schirmer y disminuye la apoptosis en la superficie ocular en pacientes con ojo seco. Se ha observado en perros con queratoconjuntivitis sicca que reduce el infiltrado de la glándula lagrimal y mejora la producción de lágrima¹⁰³. Después de 6 meses de tratamiento disminuye la respuesta inmune y las citocinas inflamatorias y aumenta la cantidad de células caliciformes en conjuntiva^{104,105}. Está indicada en el control de cuadros de ojo seco severo con componente inflamatorio de base y en los casos en los que existe un *melting* corneal asociado¹⁰⁶.
- Se ha sugerido el empleo de tacrólimus tópico y corticoides como tratamiento de mantenimiento como alternativa terapéutica eficaz y bien tolerada¹⁰⁷.
- El suero autólogo también disminuye la inflamación de la superficie ocular¹⁰⁸. Contiene vitaminas, albúmina, factores de crecimiento y fibronectina, que están presentes en la lágrima normal. Son importantes para mantener la integridad de la córnea y la conjuntiva^{109,110}. El tratamiento con suero autólogo mejora la clínica y los signos (disminuye la queratitis punteada, aumenta el tiempo de ruptura lagrimal) en pacientes con ojo seco severo en la EICH. Siendo además un fármaco seguro, con pocos efectos adversos¹¹¹. Tiene un efecto bacteriostático porque contiene agentes antimicrobianos como inmunoglobulinas y lisozimas¹¹².
- En casos refractarios al tratamiento inicial, se ha propuesto el tratamiento con ácido retinoico tópico como eficaz para revertir la queratinización conjuntival¹¹³.

1.3.3.5. Tratamiento sistémico de la EICHo

Generalmente el tratamiento sistémico se realiza cuando el ojo seco severo se asocia a otras manifestaciones sistémicas y los fármacos más empleados son los corticoides, el tacrólimus, la ciclosporina, el rituximab y la fotoforesis. Se ha empleado con éxito también FK506 asociado a corticoides sistémicos¹⁰⁷.

Las tetraciclinas se usan porque además de su efecto antibiótico tienen propiedades antiinflamatorias y antiangiogénicas.

Los ácidos grasos esenciales deben ser administrados en la dieta, los ácidos grasos omega 6 son precursores del ácido araquidónico y por tanto de la inflamación, mientras que alguno de los omega 3 como el ácido linoleico y gammalinoleico, presentes en el pescado, inhiben la síntesis de mediadores de la inflamación¹¹⁴.

Es importante tener en cuenta en la evaluación de la respuesta al tratamiento en pacientes con EICH crónica, a efectos de reducir o suspender el tratamiento inmunosupresor, que las manifestaciones de EICHo /síndrome de ojo seco no necesariamente se relacionan con actividad de la enfermedad ya que pueden llegar a producirse alteraciones irreversibles que requieran tratamiento tópico a largo plazo. Por tanto, la persistencia de sintomatología únicamente a nivel ocular, nos debe hacer sospechar la presencia de cambios no reversibles y por tanto no son un criterio para mantener el tratamiento inmunosupresor del paciente.

1.4. CÉLULAS STEM MESENQUIMALES

Las células madre mesenquimales también conocidas como células madre estromales son células multipotentes que en cultivo dan lugar a una población heterogénea de células de morfología fusiforme y aspecto fibroblástico^{115,116}. La existencia de una población con propiedades de células madre en la médula ósea (MO) diferente a la población hematopoyética ha suscitado gran interés en los últimos años¹¹⁷.

Friedenstein y cols. fueron los primeros en identificarlas por su capacidad de adherencia al plástico y de formar colonias de aspecto fibroblástico. Con un modelo experimental adecuado se ha puesto de manifiesto su potencialidad para diferenciarse hacia diversas estirpes celulares. La frecuencia de las células madre mesenquimales en la fracción mononuclear de la MO es de 1 de cada 10^4 – 10^5 células ¹¹⁸⁻¹²¹.

Aunque se describen utilizando diversa terminología, como células del estroma medular, unidades formadoras de colonias fibroblásticas (CFU-F), células *stem* del estroma medular o células precursoras del estroma, en adelante en este trabajo las denominaremos células *stem* mesenquimales (CSM).

1.4.1. Origen de las CSM

Estudios a nivel embrionario y fetal muestran la presencia de células con características similares a las CSM en aorto-gonado-mesonefro y de forma muy abundante en sangre circulante hasta la semana 12 de gestación; en menor proporción en semanas posteriores. Pueden persistir en tejidos maternos dañados durante el embarazo¹²².

Transcurrida la etapa embrionaria, se han aislado CSM de distintas zonas como cartílago¹²³, periostio^{124,125} y líquido sinovial¹²⁵, tejido adiposo¹²³, músculo y tendones¹²⁶, así como de placenta, vasos y sangre de cordón umbilical¹²⁷⁻¹²⁹, lo que sugiere que las CSM están ampliamente distribuidas. No obstante, la MO se considera una de las fuentes más accesibles y ricas para obtener CSM¹³⁰. Puesto que además se ha descrito que existen diferencias entre las CSM obtenidas de distintos tejidos, en este trabajo de Tesis nos referiremos únicamente a CSM obtenidas de aspirado de MO^{123,131}.

1.4.2. Caracterización y cultivo de las CSM

En cultivo, se ha observado que las CSM obtenidas de la MO son un tipo celular con capacidad de adherencia al plástico, apariencia fibroblástica y un nucléolo muy prominente ^{115,116}. Cuando se cultivan a baja concentración, tienen la propiedad de formar colonias CFU-F. Estas células, presentan una vida limitada, con un tiempo de duplicación de 33 horas y con un número de duplicaciones de aproximadamente 38. A medida que aumenta el número de pases en el cultivo, estos progenitores aparentemente pierden su capacidad multipotencial y comienzan a expresar características apoptóticas.

Los estudios de ciclo celular en cultivos de CSM humanas revelan que mientras una pequeña fracción de CSM están proliferando (aproximadamente el 10%) la amplia mayoría están en fase Go/G1.

Por otro lado, se ha descrito que las CSM forman una población un tanto heterogénea, y tal vez uno de los principales problemas para su caracterización sea la ausencia de marcadores fenotípicos específicos, lo que unido a su baja proporción en MO, impide hasta el momento aislarlas a partir de una muestra biológica¹³².

Los datos existentes en la bibliografía acerca de su caracterización inmunofenotípica indican que esta población no posee un fenotipo específico, sino que comparte características fenotípicas con células endoteliales, epiteliales y musculares¹³³⁻¹⁴³ [ENREF 106](#). Las CSM carecen de antígenos característicos de

progenitores o células hematopoyéticas, como CD14, CD34, CD45 o CD133. Se ha probado la especificidad de diversos anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos expresados en células del estroma con el fin de encontrar algún marcador específico de CSM¹³². Uno de ellos es el Stro-1, el cual reconoce un antígeno de superficie resistente a la tripsina pero que también se expresa en células mononucleadas de la MO, así como en todos los progenitores CFU-F. Además la expresión de Stro-1 se pierde gradualmente durante la expansión, lo que limita su uso para la identificación de CSM a medida que progresan los pasos.

La posible utilización de Stro-1 para aislar CSM a partir de la tracción de células mononucleadas (CMN) de una muestra de MO requiere, por tanto, el uso conjunto de otros marcadores¹⁴⁴.

La combinación de marcadores positivos para CSM varía entre los distintos grupos, que generalmente los seleccionan entre CD13, CD29, CD31, CD44, CD54, CD63, CD73, CD90, CD105, CD106, CD140b, CD166, Y Stro-1. Dentro de estos marcadores expresados por las CSM, Stro-1 ha sido el más estudiado^{13,145,146,147}.

<u>MARCADORES ESPECÍFICOS</u>	<u>MARCADORES DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS</u>
STRO-1+	CD34+
SB-10 (CD166)+	CD45+
SH-2 (CD105)+	CD133+
SH-3 Y SH-4 (CD73)+	
<u>OTROS MARCADORES</u>	<u>RECEPTORES DE CITOCINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO EXPRESADOS</u>
CD90+	IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R,
CD13+	LIFR, SCFR, G-CSFR, IFN γ R
CD109+	TNFIR, TNFIIIR, TGF β IR
CD140b+	
CD172a+	
<u>MOLÉCULAS DE ADHESIÓN</u>	<u>MOLÉCULAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR PRODUCIDAS</u>
INTEGRINAS	Colágeno tipo I, III, IV, V y VI
ICAM-1+	Fibronectina
ICAM-2+	Laminina
VCAM-1+	Ácido hialurónico
CD44+	Proteoglicanos

Tabla 3: Características biológicas de las CSM derivadas de MO. Expresión de antígenos específicos, receptores de citocinas y moléculas de adhesión. Producción de moléculas

Los cultivos de CSM se han realizado desde hace 30 años sin haberse establecido unos criterios rigurosos para su aislamiento y caracterización, lo que complica la comparación de resultados entre distintos grupos. Tradicionalmente, y debido a la ausencia de un marcador específico definitorio de las CSM, éstas se han aislado merced a su capacidad de adherencia al plástico, que permite separarlas de la población de células hematopoyéticas dentro de la fracción de CMN de la MO. Sin embargo, este sistema de aislamiento no garantiza la ausencia de células de la línea hematopoyética y proporciona una población heterogénea.

Dada la relevancia clínica que están adquiriendo este tipo de células. La Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) ha puesto de manifiesto la necesidad de utilizar un método de identificación común y ha establecido unos criterios mínimos que toda célula que se defina como CSM debe cumplir¹⁴⁸:

1. Deben adherirse al plástico cuando se mantienen en cultivo.
2. La población de CSM debe expresar antígenos como CD105, CD73, y CD90, así como carecer de expresión de marcadores hematopoyéticos como CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a o CD19 Y HLA-DR.
3. Y por último deben ser capaces de diferenciarse al menos hacia adipocitos, osteoblastos y condroblastos bajo las condiciones de cultivo adecuadas.

1.4.3. Funcionalidad de las CSM

Funcionalmente, las CSM contribuyen a la formación del nicho hematopoyético, el cual proporciona el microambiente adecuado para la auto-renovación, proliferación y diferenciación de las células *stem* hematopoyéticas y otros progenitores hematopoyéticos. A través de diferentes vías de señalización pueden ser movilizadas y diferenciarse a distintas estirpes del tejido conectivo. Estas señales son inducidas por daños en el tejido de tipo traumatológico, fracturas, inflamación, necrosis o tumores. Estudios recientes sugieren que la

capacidad de las CSM para secretar determinados factores solubles puede alterar la funcionalidad del microambiente y de este modo actuar en la reparación del daño tisular. Entre estos factores secretados por las CSM se incluyen el factor de crecimiento de hepatocitos, TGF-1 interleucina-1 (IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-7, IL-11, ítem cell factor y Fms-like tirosina kinasa 3 factor, que actúan estimulando la proliferación y diferenciación de los progenitores endógenos que se encuentran en el tejido, disminuyendo la inflamación y la reacción inmune¹⁴⁹.

Por otra parte, las CSM tienen propiedades inmunomoduladoras muy características. Estas células pueden suprimir algunas funciones de linfocitos T, B y células NK y en algunos casos también afectar a la función de las células dendríticas¹⁵⁰. Además, producen una variedad de factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas y proteasas que juegan un papel importante en su inmunomodulación y migración¹⁵¹.

1.4.4. Potencial de diferenciación

Las CSM se consideran células capaces de diferenciarse a células de tejidos de estirpe mesenquimal, es decir, procedentes de su misma capa embrionaria. Varios grupos han sido capaces de diferenciar las CSM hacia adipocitos, osteoblastos y condrocitos tanto en cultivos *in vitro*^{12,13} como en modelos *in vivo*¹⁴.

- La diferenciación hacia osteoblastos de las CSM se consigue gracias al cultivo de una capa adherente celular en un medio de inducción osteogénica que generalmente se suplementa con dexametasona, ácido ascórbico y β -glicerolfosfato. Las CSM comienzan a formar agregados o nódulos y aumentan su expresión de fosfatasa alcalina. A partir de la primera semana se pueden observar depósitos de calcio, pero no es hasta la tercera semana cuando se obtienen los mejores resultados. Tanto la aparición de depósitos cálcicos como el aumento de la actividad fosfatasa

alcalina pueden valorarse por métodos histoquímicos, aunque actualmente también se emplean técnicas de cuantificación de la expresión de genes como los de la osteopontina, osteocalcina, sialoproteínas óseas, las cuales pueden detectarse tanto a nivel de RNA como proteico^{152,153}. En la diferenciación osteogénica *in vivo* parecen estar implicadas las proteínas morfogénicas óseas (BMP), principalmente BMP-2 y BMP-6¹⁵⁴.

- La diferenciación condrogénica de las CSM pretende mimetizar el proceso de formación de cartílago *in vivo* y ha de realizarse en un cultivo en tres dimensiones. Para la diferenciación a cartílago se utiliza medio con dexametasona, ácido linoleico, insulina bovina, transferrina o suplementos más específicos como TGF-beta1, factor de crecimiento involucrado en su diferenciación *in vivo*. La diferenciación se caracteriza por la expresión de factores de transcripción como sox-9 y componentes de la matriz extracelular como colágenos tipo II y IX o agregano, siendo estos tres las principales dianas en la determinación de la diferenciación hacia condrocitos mediante técnicas histoquímicas¹⁴⁵.
- La diferenciación de CSM hacia adipocitos se obtiene generalmente al tratar las células con medio suplementado con dexametasona, isobutilxantina, insulina y un agonista del receptor PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ), como son los ácidos grasos de cadena larga. En este proceso es importante la unión de PARR γ a alguno de sus ligandos induciendo así la transactivación de PARR γ que inicia la adipogénesis e inhibe la osteogénesis¹⁵⁵.

La aparición de adipocitos, aunque puede observarse con microscopía de contraste de fases, debe confirmarse mediante tinción de las vacuolas lipídicas que aparecen en el interior de las células con oil-red-O o por detección de la expresión de adiposina, aP2 o PPAR γ y mediante RT-PCR^{153,154} [ENREF 126](#).

Además de la diferenciación a tejidos de origen mesodérmico, algunos grupos han descrito que bajo determinadas condiciones de cultivo, las CSM son capaces de adquirir características morfológicas y/o funcionales de células hepáticas,

renales, cardíacas e incluso neurales¹⁴⁵. Esto hace pensar que las células madre presentes en el individuo adulto presentan mayor plasticidad de lo que se pensaba y deriva la propiedad de multipotencialidad hacia pluripotencialidad cuando se habla de CSM.

- En el caso de los miocitos, algunos autores han descrito que las CSM que se tratan con 5-azacitidina pueden formar células musculares¹⁵⁶. Este potencial biogénico, también se ha demostrado en modelos *in vitro* xenogénicos cuando las CSM se co-cultivan con células de músculo esquelético de ratón, por lo que se considera que la interacción célula-célula es importante para inducir esta diferenciación¹⁵⁷.
- La formación de tendones *in vivo* está relacionada con el factor de crecimiento y diferenciación (GDF), miembro de la superfamilia de TGF- β ¹⁵⁸. Cuando se induce su diferenciación *in vitro* aún existen aspectos desconocidos, ya que además de los suplementos del medio de cultivo, hay que tener en cuenta los requerimientos mecánicos que debe adquirir una fibra de tendón para ser funcional¹⁵⁹.

1.4.5. Aplicaciones clínicas de las CSM

La medicina regenerativa pretende ofrecer posibles soluciones a diversas enfermedades degenerativas. En este campo, las CSM se perfilan como una fuente celular muy prometedora debido a su multipotencialidad, la facilidad para su obtención y expansión *in vitro*, y sus propiedades inmunomoduladoras. Son numerosos los trabajos realizados tanto con modelos animales como en ensayos clínicos, en los que CSM expandidas *ex vivo* han sido capaces de diferenciarse hacia las estirpes celulares de los tejidos dañados, reparando el daño tanto traumatológico como de cualquier otro origen y recuperando, por lo menos parcialmente, la función normal^{9,160-165}.

La aplicación de las CSM con fines clínicos se realiza a 4 niveles:

1. Implantación local de CSM en casos de daño localizado,

2. Trasplante sistémico,
3. Combinación con terapia génica,
4. Uso de las CSM en protocolo de ingeniería tisular.

Son muchos los trabajos que sugieren el uso terapéutico de las CSM con distintos grados de eficacia, y entre ellos podemos destacar:

1.4.5.1. Reparación de tejidos esqueléticos:

Posiblemente los mejores resultados clínicos obtenidos actualmente con CSM son su utilización en la reparación de hueso y cartílago, bien por administración directa de las células o a través de matrices y “carriers” (hidroxiapatita/fosfato tricálcico). Así, se han usado con buenos resultados en la reparación de defectos craneofaciales, de huesos largos o de cartílago articular, nariz, oreja y tráquea^{164,166}.

1.4.5.2. Reparación de miocardio:

Muchos tipos celulares se han administrado, tanto de forma sistémica como local, en modelos animales y ensayos clínicos para el tratamiento del infarto agudo de miocardio. Con la mayoría de células utilizadas no se han obtenido los resultados esperados; pocos son los estudios que han demostrado la persistencia de las células en la zona afectada y muchos menos los que han demostrado, de una forma más o menos creíble, que realmente las células administradas sean capaces de diferenciarse a miocardiocitos e integrarse de forma funcional en el miocardio¹⁶⁷.

1.4.5.3. Aplicación en el contexto de trasplante hematopoyético:

En muchos pacientes hematológicos sometidos a trasplante, el estroma puede estar dañado por el tratamiento previo, lo que podría retrasar e incluso impedir el injerto de las células hematopoyéticas. Por ello, se están llevando a cabo

ensayos con el fin de analizar la capacidad de las CSM para facilitar el injerto hematopoyético tras un trasplante, puesto que las CSM son las células *stem* del estroma medular^{11,168,169}.

Además, dadas sus especiales propiedades inmunológicas, se están realizando ensayos clínicos con CSM en pacientes con enfermedad injerto contra huésped⁹⁻¹¹.

2. Hipótesis y Objetivos

Objetivos

La EICH es la mayor causa de morbilidad y mortalidad entre los pacientes sometidos a trasplante de células madre hematopoyéticas con una incidencia es de hasta el 80% en series de pacientes sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos de donante no emparentado¹.

El ojo es un órgano diana de la EICH. En el 40-90% de los pacientes con EICH existe afectación ocular²⁻⁴. La EICHo se caracteriza principalmente por la aparición de un síndrome de ojo seco severo que afecta de manera importante a la calidad de vida de estos pacientes. No se conoce con exactitud la fisiopatología de la EICHo^{3,57}. Disponer de un modelo animal de EICH ocular nos permitiría profundizar en la fisiopatología de esta enfermedad y evaluar in vivo nuevas estrategias terapéuticas.

En este sentido, las opciones terapéuticas actuales frente a la EICHo son pocas e ineficaces. Actualmente la mayoría de los tratamientos que se pueden aplicar se centran en aliviar la sintomatología del ojo seco⁸ que se produce como consecuencia de la EICHo. Es por tanto, fundamental el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas hacia la prevención y el tratamiento etiológico de la EICHo. Por ello el uso de CSM y su capacidad para diferenciarse a otros tejidos podrían suponer una buena alternativa terapéutica debido a sus propiedades inmunológicas^{9,10,12-14,169}.

Los objetivos concretos de esta Tesis Doctoral han sido

1. Generación de un modelo animal de EICHo murino.
2. Evaluar la distribución, la caracterización y la capacidad de diferenciación de CSM humanas GFP+ inyectadas subconjuntivalmente en ratones BALB/C.
3. Evaluar la distribución, la caracterización y la capacidad de diferenciación de CSM humanas GFP+ inyectadas subconjuntivalmente en ratones BALB/C a los que se le había generado una EICHo.

3. Material y métodos

3.1. MATERIAL

3.1.1 Animales de experimentación

Los experimentos relacionados con investigación animal se llevaron a cabo en el Animalario de la Universidad de Salamanca de acuerdo con las normas establecidas por el Comité Ético del Animalario.

Se utilizaron las siguientes cepas de ratón: hembras BALB/c (H2d) y machos C57BL/6 (H2b). Todos los ratones procedieron de Charles River Laboratory (France).

Los protocolos de mantenimiento, manipulación y sacrificio de los animales se llevaron a cabo cumpliendo las directrices del Consejo de las Comunidades Europeas (86/609/EEC y 2003/65/EC) y de la legislación española (RD 1201/2005 de 10 de octubre, BOE de 21 de octubre de 2005) vigentes para el uso y cuidado de animales de experimentación y bajo la supervisión del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca.

3.1.2 Obtención de células *stem* mesenquimales para cultivo

Para la realización del presente trabajo, se utilizaron CSM procedentes de MO. Las muestras empleadas se obtuvieron tras el correspondiente consentimiento informado de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Los procedimientos se realizaron de acuerdo a las normas establecidas por el Comité Ético del Hospital Universitario de Salamanca. El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivos y Terapia Celular del Hospital Universitario de Salamanca bajo estrictas condiciones de esterilidad.

3.1.3 Material no biológico (reactivos)

A continuación se enumeran los materiales necesarios para llevar a cabo los experimentos:

-En el modelo animal se utilizaron: placas de petri estériles de 100mm de Soria Genlab, S.A., filtros con tamaño de poro de 40µm de Becton-Dickinson, Biosciencie, San José, CA, agujas de 25G (0,5mm x 16mm) de BD Microlance™ (BD Drogheda, Irland), jeringas de 1ml de BD Plastipak (BD Madrid) y agujas de insulina de 27G (0.4 x 12mm) de TERUMO®. El medio celular Roswell Park Memorial Institute (RPMI). El acondicionamiento pre-trasplante de los ratones se llevó a cabo mediante un irradiador de muestras biológicas Gammacell 1000 con una fuente de Cesio de 137.

- Se utilizó el citómetro de flujo modelo FACS Calibur (Becton Dickinson Bioscience San José, CA, EEUU) y los programas informáticos: CellQuest®, PAIN-A-GATE-PRO™ de (Becton Dickinson Bioscience, San José, CA, EEUU), ModFit LT for Mac (Verity Software House, Inc, ME, EEUU) e Infinicyt1.1 (Cytognos S.L. Salamanca, España).

- Para la realización de los cultivos de CSM se empleó: el medio Dulbecco's Modified Eagle's médium low glucosa (DMEM, Gibco Invitrogen Paisely, UK) suplementado con Suero Bovino Fetal al 10% (SBF: BioWhittaker® Lonza, Verviers, Belgium) y Penicilina 104U/ml / Estreptomina 104µg/ml (Gibco, Invitrogen, Paisely, UK) al 1%. El tampón salino Dulbecco's Phosphate Buffer Saline 1X (PBS) de GIBCO® Invitrogen™ (Paisely, UK). El medio Hanks's Balanced Salt Solution 1X con 0.35g/L NaHCO₃ (HBSS) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El suero fisiológico Viaflo Cloruro Sódico 0,9% pH 5,5 procedió de los laboratorios Bartex S.L. (Valencia, ESP). El medio oleoso para la separación de células mononucleadas (Ficoll-Paque) de GE-Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, EEUU). La heparina libre de aditivos 5000U/ml procede de Biochrom AG (Berlín, Alemania). El dimetil sulfóxido (DMSO) es de Sigma-Aldrich.

Métodos

- Para la obtención de muestras para el procesamiento histológico se usó el tampón salino Dulbecco's Phosphate Buffer Saline 1X (PBS) de GIBCO® Invitrogen™ (Paisely, UK), tampón fosfato salino 0.1M, pH 7.4 (TFS), el medio OCT®. El criostato CM 3050 S Leica y HM 560 Micron, portas superfrost (Thermo Scientific, Braunschweig, Alemania). Para la microscopía electrónica se empleó: una mezcla de suero albúmina bovina (BSA) al 4% y gelatina de pez al 0,1%, Tween 20 al 0,5% en TFS, resina Epon (Embed 812: 20 ml Epon 812, 16 ml DDSA, 8 ml MNA, 0,66 ml DMP-30) y un ultramicrotomo (Ultracut E, Reichert-Jung) y rejillas de ojal de cobre (Electron Microscopy Science).

-Los anticuerpos monoclonales, empleados para análisis por citometría de flujo fueron: (tabla 4)

Anticuerpo	Fluorocromo	Isotipo	Procedencia
CD14	FITC	Mouse IgG2bκ	Becton Dickinson Bioscience San José CA USA
CD19	PerpCp Cy5.5	Mouse IgG ₁ κ	Becton Dickinson Bioscience San José CA USA
CD34	FITC	Mouse IgG ₁ κ	Becton Dickinson Bioscience San José CA USA
CD45	PerpCp Cy5.5.	Mouse IgG ₁ κ	Becton Dickinson Bioscience San José CA USA
CD73	PE	Mouse IgG ₁ κ	BD Pharmingen San José, CA USA
CD90	FITC	Mouse IgG ₁ κ	BD Pharmingen San José, CA USA
CD105	APC	Mouse IgG ₁ κ	R&D System Mineapolis, USA
CD106	PE	Mouse IgG ₁ κ	BD Pharmingen San José, CA USA
CD166	PE	Mouse IgG ₁ κ	Becton Dickinson Bioscience San José CA USA
HLA DR	PerCP	MouseIgG2a κ	Becton Dickinson Bioscience San José CA USA
CD3	Alexa Fluor	Rat IgG2b κ	BD Pharmingen San José CA USA
CD34	Alexa Fluor	Rat IgG2b κ	BD Pharmingen San José CA USA
CD45	PerCp Cy5.5.	Mouse IgG2bκ	BD Pharmingen San José CA USA

H2Db	FITC	MouseIgG2b κ	BD Pharmingen San José CA USA
H2Dd	PE	Mouse IgG2a κ	BD Pharmingen San José CA USA

Tabla 4: En todos los casos se añadieron los anticuerpos a concentración de saturación: FITC: Isotiocianato de Fluoresceína; PE: Ficoeritrina; PerCPCy5.5: Proteína piridinín clorofílica cianina 5.5; APC: Alofocianina.

Métodos

- En los estudios de Western blot, las membranas de PVDF inmobilon P fueron de Millipore Corp. (Bedford, Mass.). Los anticuerpos policlonales empleados fueron anti-GFP de cabra (AB-5450, Abcam), anti-MIF de conejo (AB-7207, Abcam), anti-Mitocondria humana de ratón (MAB-1273, Millipore). Las bandas se visualizaban con NBT (Nitro-blue-tetrazolium, Roche Applied Science) y BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, Roche Applied Science).

- Para los estudios de inmunohistoquímica de fluorescencia se utilizaron: suero no inmune (Sigma) al 2% y Triton X-100 (Probus S.A.) al 0,2 %, tampón fosfato salino 0.1M, pH 7.4 (TFS), medio protector de fluorescencia ProLong® Gold antifading y los siguientes anticuerpos: (Tablas 5 y 6):

<i>Antígeno</i>	<i>Anticuerpo</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Dilución de uso</i>
GFP	IgG policlonal cabra	Abcam	1:500 (Fluo) 1:50 (MET) 1:2000 (WB)
MIF	IgG policlonal conejo	Abcam	1:400 (Fluo) 1:2000 (WB)
Mitocondria	IgG policlonal ratón	Millipore	1:50 (Fluo) 1:100 (WB)

Tabla 5: Anticuerpos primarios. Fluo: inmunohistoquímica de fluorescencia; MET: microscopía electrónica; WB: Western-blot;

<i>Método</i>	<i>Antígeno</i>	<i>Anticuerpo</i>	<i>Conjugado con</i>	<i>Casa comercial</i>
Fluorescencia	IgG de cabra IgG de conejo	IgG de burro IgG de cabra	Cy2 Cy3	Jackson Jackson
Oro coloidal	IgG de cabra	IgG de cabra	Oro coloidal	Aurion

Tabla 6: Anticuerpos secundarios fluorescentes

- El análisis de imagen se realizó con un microscopio Olympus PROVIS AX70, el programa informático Micro CCD. Las imágenes de microscopía confocal fueron obtenidas con el Microscopio Láser Confocal Espectral Leica TCS SP2. Las rejillas con las secciones ultrafinas fueron visualizadas en un microscopio electrónico ZEISS-EM 900 con una cámara TRS (Slow Scan CCD) acoplada y las imágenes fueron tomadas con el programa informático ImageSP Viewer. Las imágenes tomadas se trataron con el programa Adobe Photoshop® CS4.

3.2. MÉTODOS

3.2.1 Modelo murino de generación de EICHo

Para la generación de EICHo empleamos como donantes, ratones machos de entre 8 y 10 semanas de edad de la cepa C57BL/6 con haplotipo H2b y como receptores ratones hembras de entre 8 y 10 semanas de la cepa BALB/c con haplotipo H2d. Estas dos cepas comparten el antígeno de clase I (H2) y difieren en antígenos miHAs (H2d versus H2b). De esta manera se consigue un modelo de incompatibilidad HLA para generar una EICH comparable a la que sucede en humanos. Mediante citometría de flujo, es posible la identificación de las células procedentes tanto del donante como del receptor en los ratones trasplantados, debido a la existencia de anticuerpos monoclonales específicos para cada cepa de ratón. De este modo se puede conocer el quimerismo a diferentes tiempos post-trasplante.

Para la obtención de células de ratón donante empleadas para realizar el modelo de trasplante alogénico murino utilizamos:

1. MO procedente de los fémures y las tibias de los ratones donantes. Se introdujo RPMI a presión por el canal medular de los huesos usando agujas de 25G (0,5 x 16mm). La solución celular resultante se hizo pasar a través de filtros de 40µm de poro. Después del lavado de las células se procedió a un recuento celular mediante una cámara de Neubauer.
2. Esplenocitos del bazo del ratón donante, fundamentales para la generación de EICH en el ratón receptor. El bazo se disgregó mecánicamente entre dos portas esmerilados. El producto obtenido se hizo pasar a través de un filtro de 40µm de poro y de la misma manera que con la MO tras el lavado de las células se determinó el número de células disponibles.

Las dos soluciones celulares se resuspendieron de modo que a cada ratón receptor, después del proceso de irradiación, se le inyectó en torrente

circulatorio 5×10^6 células de MO asociado a 5 ó 10×10^6 células del bazo en $300\mu\text{l}$ de RPMI.

El proceso de irradiación se llevó a cabo empleando una fuente de Cesio 137, mediante un irradiador de muestras biológicas Gammacell 1000 que consta de dos partes:

- un contenedor fijo de la fuente radiactiva encapsulada en plomo
- un rotor que contiene un “canister” donde se introducen los ratones y cuya base rotatoria permite una exposición homogénea de la muestra a la fuente.

Los ratones receptores se sometieron a una irradiación corporal letal de 850cGy dividida en dos fracciones de 425cGy separadas por 4 horas.

Dos horas después de la segunda irradiación procedimos al trasplante de los ratones receptores. El ratón receptor se inmovilizó en una jaula donde con una bombilla infrarroja de calor se dilataron las venas laterales de su cola. Inmediatamente después administramos con una jeringa TERUMO MYJECTOR de $0,5\text{mL}$ y una aguja montada de $27 \times 1/2'' - 0,4 \times 12\text{mm}$ una infusión de 5×10^6 células de MO asociado o no a 5 o 10×10^6 esplenocitos de ratones donadores en $300\mu\text{l}$ de RPMI.

3.2.2. Obtención, aislamiento y expansión de CSM

El aislamiento, expansión y transducción de las CSM se hizo a partir de muestras de médula ósea (MO). La extracción de la MO se realizó en todos los casos bajo anestesia local, por punción de cresta ilíaca o esternón. Los tubos utilizados eran estériles (Venoject; Terumo®) y como anticoagulante tenían heparina libre de aditivos (Heparina 5000U/ml ; Seromed Biochrom KG), reconstituida con agua destilada Vitulia estéril (Laboratorios ERN, SA).

Todos los sujetos fueron debidamente informados y el procedimiento se realizó de acuerdo a las normas establecidas por el Comité Ético del Hospital Universitario de Salamanca.

Métodos

Tras comprobar la ausencia de coágulos o restos de fibrina en la muestra de MO, se diluyó en medio Hanks (Hanks Salt Solution, Gibco, Invitrogen) y posteriormente se centrifugó con Ficoll (GE Healthcare BioSciences) durante 30 minutos a 500xg siguiendo el método descrito previamente por Minguell¹⁶⁷ para separación celular por gradiente de densidad. Las células mononucleadas (CMN) recuperadas de la interfase se lavaron 2 veces con medio Hanks (10 minutos a 300xg). Finalmente el botón celular se resuspendió en 1ml del medio de expansión de CSM para proceder al recuento celular en cámara de Neubauer.

Se empleó el medio de expansión descrito para CSM consistente en D-MEM (Dulbecco's modified Eagle's medium-low glucose, Gibco, Invitrogen) suplementado con suero bovino fetal al 10% y penicilina/estreptomicina 1%¹⁷⁰. Una vez mezclados los componentes, se filtraron con 0.22µm, se alicuotaron y se mantuvieron a 4°C durante su utilización. Las células se mantuvieron en estufa a 37°C, 90% de humedad y 5% CO₂.

Las CMN obtenidas de MO se cultivaron a una concentración máxima de 10⁶ células/cm² en frascos de cultivo de fondo plano (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) en el medio de expansión correspondiente. Se mantuvieron en estufa de CO₂ durante 3-5 días, al cabo de los cuales las células no adheridas fueron retiradas, y el medio de cultivo fue renovado. Este cultivo se mantuvo hasta alcanzar el 80-90% de confluencia, cambiando el medio 2 veces/semana. Una vez que las células alcanzaron este punto, se procedió a despegarlas para realizar el primer pase mediante tripsinización. Para ello, se retiró todo el medio de cultivo del frasco, se lavó éste con PBS estéril, y se incubó con tripsina (Gibco, Invitrogen) durante 5 minutos a 37°C en atmósfera saturada de humedad y en presencia de CO₂. Posteriormente, se neutralizó la tripsina con suero fetal. Estas células se plantaron de nuevo para su expansión a una concentración de 5000 células/cm² en frascos de cultivo de mayor superficie. La selección de la población mesenquimal se realizó a través de sucesivos pases, realizando su transducción en pase 2 y empleándolas para el modelo animal en pase 3.

Para la transducción se empleó sobrenadante con partículas lentivirales que contenían el vector pLV-CMV-Luc2-ires-GFP que permitiría el seguimiento celular mediante fluorescencia debido a la expresión de GFP (Green Fluorescent

Protein). Partiendo de CSM en pase 2 al 40% de confluencia, se cambió el medio de expansión por medio de transducción consistente en una dilución 1:15 del sobrenadante de virus en medio de expansión. Además, se añadió polybrene (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 8µg/µl para aumentar la eficiencia de la transducción. Se mantuvo en paralelo un cultivo sin medio de transducción como control. Tras 24 horas a 37°C en el incubador de CO₂ se cambió el medio de transducción por medio fresco de expansión y se mantuvo el cultivo en condiciones estándar de expansión de CSM hasta el momento de su uso en el modelo animal. Las células GFP+ fueron analizadas mediante citometría de flujo para determinar la eficiencia de la transducción.

Para el modelo animal se inyectaron subconjuntivamente 2x10⁵ CSM resuspendidas en 20µl de suero fisiológico en cada ojo sometido a estudio. Estas mismas células se analizaron mediante Western-blot como control para comprobar la especificidad de los anticuerpos anti-GFP (AB5450, Abcam) y anti-mitocondria humana (MAB 1273, Millipore) como marcadores de CSM humanas.

3.2.3 Administración de CSM mediante inyección subconjuntival

Las CSM humanas GFP+ se inyectaron subconjuntivamente tanto en ratones control como en ratones trasplantados con MO y esplenocitos. En todos los casos los animales se sedaron con isoflurano al 4.0% durante 2 minutos. La sedación se mantuvo con isoflurano al 1.5%. A continuación se instiló una gota de ciprofloxacino tópico y se procedió a la inyección de las CSM GFP+ a nivel subconjuntival 5 minutos después de la inducción de la anestesia. Se inyectaron un total de 2x10⁵ CSM GFP+ resuspendidas en 20µl de suero fisiológico con una jeringa Terumo Myjector de 0,5mL y una aguja montada de 27x1/2"-0,4x12mm a dos milímetros del limbo esclerocorneal aproximadamente. La inyección se realizó bajo un estereomicroscopio (Leica MZ6). Posteriormente se instiló betadine tópico ® (povidona yodada) diluido al 50% con suero fisiológico en el saco conjuntival para evitar posibles infecciones.

Métodos

La inyección siempre se realizó en el ojo derecho, de modo que el ojo izquierdo se empleó como control experimental.

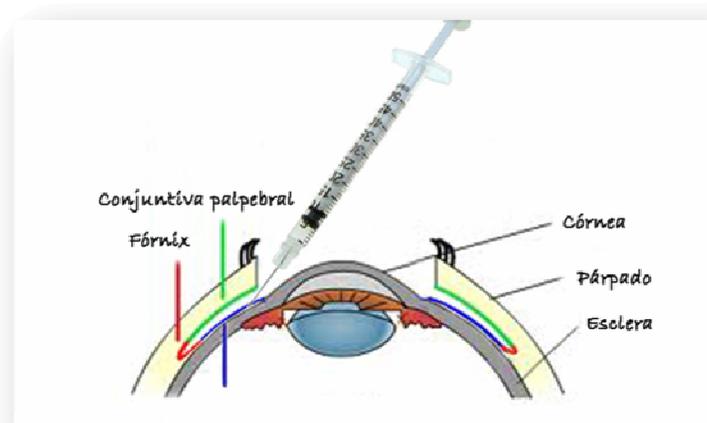


Fig.8: Esquema de la inyección subconjuntival de

3.2.4. Extracción de los ojos, la córnea y el limbo-

Inmediatamente después de sacrificar al animal, en cada caso se procedió a la extracción de los ojos realizando una cantotomía lateral y cortando la musculatura extraocular y finalmente el nervio óptico.

Una vez que se extrajeron los ojos, para el estudio anatomopatológico con hematoxilina-eosina, se realizó una incisión junto al nervio óptico y la conservación de los ojos se llevó a cabo en formaldehído al 5% tamponado en frascos estériles. Para realizar técnicas inmunohistoquímicas y el Western-blot

los ojos fueron fijados en paraformaldehído al 40% diluído con tampón fosfato salino.

Cuando el experimento requería el aislamiento de la córnea, se procedió a la separación de las capas más externas del ojo. Se recortó la esclera a nivel del ecuador del ojo, separando suavemente el iris de la córnea y retirando el resto de las estructuras.

Por otra parte, también se recogieron muestras de piel periocular y glándula lagrimal, que se conservaron en paraformaldehído hasta su procesamiento.

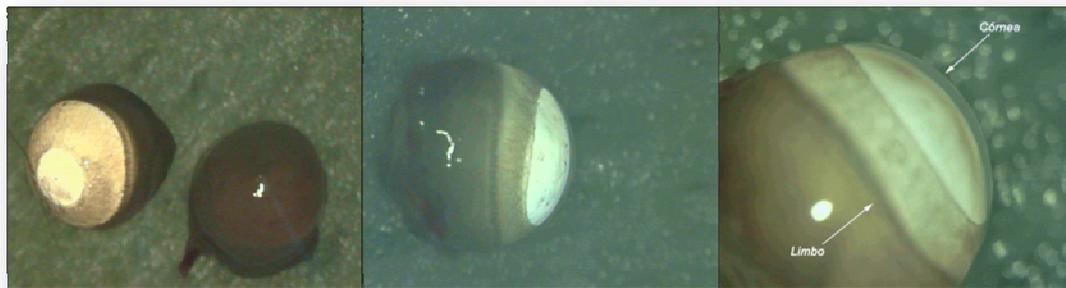


Fig.9: Fotografías tomadas durante la extracción de los ojos.

3.2.5. Procesamiento histológico para microscopía óptica-

Con el propósito de realizar un estudio anatomopatológico de los ojos de ratones que presentaban signos de EICHo y los controles se realizó una evaluación de las muestras mediante microscopía óptica.

Para el análisis de los tejidos mediante microscopía óptica, los ojos de los ratones, la piel periocular y la glándula lagrimal se fijaron en formaldehído al 5% tamponado. Después de fijadas, las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de soluciones acuosas de alcohol al 50%, 60%, 70%,

Métodos

80%, 90%, 100%. Seguidamente las muestras se colocaron en un recipiente de Xilol para su aclaramiento y fueron incluidas en parafina a 60° durante 4 horas. Por último se dejaron solidificar en moldes de metal a temperatura ambiente (TA) para poder realizar los cortes.

Una vez enfriados los bloques, se obtuvieron secciones transversales de 5 micrómetros de espesor. Se colocaron sobre el portaobjetos, se eliminó la parafina con Xilol y se rehidrataron de nuevo. Por último, los cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina y se deshidrataron de nuevo para fijarlos de modo permanente, para su examen histológico mediante el microscopio óptico.

Por otra parte, para confirmar la existencia de cuerpos apoptóticos realizamos una inmunotinción de la proteína Caspasa 3 empleando el anticuerpo monoclonal frente a Caspasa-3 (Novocastra™Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody CPP32). Las caspasas son un grupo de proteínas perteneciente al grupo de las cisteín-proteasas, caracterizadas por presentar un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas. En el caso de las caspasas el corte se produce al nivel de un residuo de aspartato de lo que deriva su nombre (cisteinil-aspartato proteasas). Las caspasas son mediadores esenciales de los procesos de apoptosis, la muerte celular programada. Otras están implicadas en procesos de maduración proteica como en el caso de mediadores del sistema inmune del tipo de la interleuquinas. Por lo tanto, la familia de las caspasas se puede clasificar en dos grupos, el grupo inflamatorio que estaría formado por los homólogos de ICE como la caspasa-11, y el grupo apoptótico, formado por las relacionadas con ced-3 como las caspasas-3 y 7. Aunque ambos grupos presentan similitudes en cuanto a la especificidad de sustrato, el primero mediaría la maduración de citoquinas proinflamatorias y el segundo el procesamiento de productos que desencadenarían cambios celulares incluyendo degradación del ADN, condensación de cromatina y desintegración de la membrana plasmática¹⁷¹. Gracias a estas características, la tinción de la Caspasa 3 sirve para confirmar la existencia de apoptosis.

Las muestras empleadas para confirmar la existencia de cuerpos apoptóticos se procesaron de la siguiente manera: después de cortar y montar las secciones en los portas, se retiró la parafina y se rehidrataron en agua destilada. A continuación, se colocaron en metanol al 0.5% durante 10 minutos, y se lavaron

con agua. Se colocaron en una olla a presión de acero inoxidable con 1500ml de una solución de 0.01M buffer citrate, pH6.0, previamente caliente. Cuando la olla alcanzó la temperatura y presión correctas, se dejaron las muestras dentro durante un minuto e inmediatamente se enfriaron, y fueron lavadas con agua corriente. Seguidamente se lavaron en PBS durante 5 minutos y se colocaron en suero diluido a 1:50 durante 10 minutos. Las secciones se incubaron con el anticuerpo primario y de nuevo se lavaron en PBS durante 5 minutos dos veces. Por último, se incubaron en el anticuerpo secundario diluido a 1:50 y se volvieron a lavar con PBS durante 5 minutos 2 veces. Finalmente se incubaron en reactivo ABC, se lavaron con PBS 5 minutos 2 veces y se incubaron en DAB, lavándose a continuación con agua corriente para deshidratar de nuevo la muestra y montar.

3.2.6. Técnicas inmunohistoquímicas

Para evaluar la expresión de proteínas específicas de las CSM humanas en la córnea y el limbo esclerocorneal de los ratones a los que previamente se les había inyectado dichas células y confirmar que no se producía esta expresión en los ojos que no se habían inyectado, se utilizaron técnicas de inmunofluorescencia sobre dichos tejidos tal y como se describe a continuación:

Tras la enucleación, los ojos se fijaron por inmersión en una solución de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato salino 0.1M, pH 7.4 (PBS) a 4° durante doce horas. Tras la fijación, se realizaron varios lavados en PBS durante al menos dos horas a TA para eliminar el resto de fijador del tejido. Después se procedió a la crioprotección del tejido para su posterior corte en un criostato. Los ojos se crioprotegieron mediante su inmersión en una solución de sacarosa progresivamente más concentrada desde el 10% al 50% en PBS durante dos días hasta que el tejido se hundió en el líquido de crioprotección. A continuación, se procedió a su congelación utilizando medio OCT®. La congelación se realizó utilizando nitrógeno líquido. El tejido que no se utilizó de inmediato tras la fijación, se lavó en PBS y se conservó a -20°C en metanol al 100%.

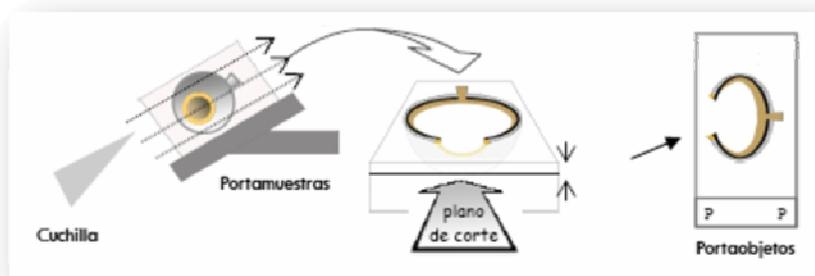


Fig.10: Esquema del proceso de corte del tejido

Las secciones se obtuvieron mediante un criostato (CM 3050 S Leica y HM 560 Microm) a una temperatura de -24°C . Se realizaron secciones horizontales de $12\ \mu\text{m}$ de espesor que se recogieron en portaobjetos doblemente gelatinizados (Fig. 10). Los portaobjetos se dejaron secar a TA y se almacenaron a -30°C hasta su posterior procesado.

3.2.6.1. Inmunohistoquímica de fluorescencia:

Las secciones se descongelaron a TA durante una hora y se lavaron en PBS 3 veces, durante 10 minutos cada una en agitación, para rehidratar el tejido.

A continuación se realizó una preincubación con suero no inmune (Sigma) al 2 % y Triton X-100 (Probus S.A.) al 0,02 % en PBS (PBS-TX) durante 1 hora a TA. En cada caso se utilizó suero procedente de la especie en que se había obtenido el anticuerpo secundario. Con este procedimiento conseguimos facilitar la penetración de los anticuerpos y, además, reducir las uniones inespecíficas de los mismos al tejido.

Posteriormente las secciones se incubaron con el medio de bloqueo, indicado anteriormente, al que añadimos el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 5), en el medio de preincubación durante 12 h a TA. Después de lavar con PBS, los cortes se incubaron durante 1 h a TA y en oscuridad con los anticuerpos secundarios fluorescentes correspondientes (Tabla 6), diluidos 1:250 en el medio de preincubación sin Triton X-100 para evitar fluorescencia de fondo. Después de lavar con PBS, las secciones se incubaron en 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) diluido a 1:10000 en PBS, para poder visualizar todos los núcleos celulares en la sección ya que se une selectivamente al DNA de la célula.

Una vez finalizada la incubación, los cortes se lavaron con PBS y se montaron con un medio protector de fluorescencia ProLong® Gold antifading.

Con objeto de determinar la especificidad de los anticuerpos, se realizaron controles negativos con todos los anticuerpos utilizados, estableciéndose los siguientes grupos:

1. Eliminación de los anticuerpos primarios, para determinar la presencia de uniones inespecíficas entre los anticuerpos secundarios y el tejido.
2. Eliminación de los anticuerpos secundarios, para detectar la posible autofluorescencia del tejido.

No se encontró marcaje en ninguno de los controles realizados.

Los anticuerpos empleados fueron los siguientes:

- Para identificar las CSM humanas
 - Anti-GFP (AB-5450, Abcam)
 - Anti-mitocondria humana (MAB-1273, Millipore)
- Para identificar células de ratón
 - Anti-MIF (AB-7207, Abcam)

Las imágenes de microscopía confocal fueron obtenidas con el Microscopio Láser Confocal Espectral Leica TCS SP2. Las imágenes tomadas se trataron con el programa Adobe Photoshop® CS4.

3.2.6.2. Inmunohistoquímica preinclusión para microscopía electrónica de transmisión:

La fijación para microscopía electrónica se realizó por inmersión del tejido en una mezcla fijadora de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0,2% en PBS durante 12h a 4°C.

Métodos

Una vez finalizado el proceso de fijación, el tejido se lavó varias veces con PBS durante 2h a TA para eliminar el resto de fijador.

Las córneas y el limbo esclerocorneal se crioprotegieron con glicerol-sacarosa (25% sacarosa y 10% glicerol en PBS) durante 12h a 4°C en agitación. Una vez crioprotegidos, se sometieron a un proceso de congelación y descongelación con nitrógeno líquido 3 veces para abrir poros en el tejido y facilitar la penetración del anticuerpo. Una vez permeabilizado el tejido, se lavó abundantemente con PBS.

Después de los lavados se procedió a una preincubación de las muestras con una mezcla de suero albúmina bovina (BSA) al 4% y gelatina de pez al 0,1% para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo al tejido, y Tween 20 al 0,5% en PBS como detergente para permeabilizar las membranas y facilitar la penetración de los anticuerpos. En este medio se incubaron las muestras durante 2h en agitación a 4°C. A continuación, se puso el anticuerpo anti-GFP a la concentración indicada en la Tabla 5 en el mismo medio, al que se le añadió NaN_3 (0,02%) para evitar la contaminación por hongos. La incubación en el anticuerpo primario se prolongó durante 72h en agitación a 4°C. A continuación, el tejido se lavó abundantemente con PBS y se puso en contacto con el anticuerpo secundario anti-cabra Ultrasmall (Aurion) a una concentración de 1:100 marcado con oro coloidal cuyas características se indican en la Tabla 6. La incubación en el anticuerpo secundario se realizó en el mismo medio de bloqueo, con NaN_3 y sin gelatina de pez, durante 48h en agitación a 4°C. Finalizada dicha incubación, se lavó nuevamente el tejido con abundante PBS.

En el siguiente paso se lavó el tejido con agua destilada y se realizó una intensificación del marcaje de oro coloidal con plata (R-GENT SE-EM, Aurion) durante 45min a TA. Después de lavar con agua destilada, se realizó una postfijación en glutaraldehído (GA) al 2% en agua destilada durante 20min a TA, para ayudar a que ambos anticuerpos y el intensificado con plata quedaran bien unidos al tejido. Nuevamente se lavó con agua destilada, se post-fijó el tejido con una mezcla de tetróxido de osmio y ferricianuro potásico (0,5% OsO_4 y 0,5% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en agua destilada) durante 20min en agitación y oscuridad a

TA. Finalmente, se lavó el tejido con abundante agua destilada y se procedió a preparar el tejido para su inclusión en resina.

En primer lugar, se deshidrató el tejido con gradaciones de etanol ascendentes 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96% y dos de 100% durante 10min en cada uno y agitación a 4°C. A continuación, se terminó de deshidratar el tejido con óxido de propileno realizando tres cambios de 10 min cada uno a 4°C y en agitación.

Una vez deshidratado el tejido se procedió a la infiltración del mismo con resina Epon (Embed 812: 20 ml Epon 812, 16 ml DDSA, 8 ml MNA, 0,66 ml DMP-30). Para su mejor penetración antes de la inclusión definitiva, el tejido fue sometido a mezclas de óxido de propileno con resina de la siguiente forma: 1) óxido de propileno: Epon 3:1 durante 1 h; 2) óxido de propileno: Epon 1:1, durante 12 h; 3) óxido de propileno: Epon 1:3, durante 1 h; y 4) dos veces en Epon, durante 1 h cada una. Todos estos pasos se realizaron a TA y en agitación.

La inclusión final se realizó en resina Epon. Se colocó el tejido en los moldes definitivos en la orientación deseada y la resina polimerizó durante 12h en la estufa a 60°C.

De los bloques obtenidos se realizaron cortes semifinos de 1µm de grosor y cortes ultrafinos de entre 50-80nm de grosor, en un ultramicrotomo (Ultracut E, Reichert-Jung).

Los cortes semifinos de las zonas a analizar fueron recogidos de forma seriada en portaobjetos gelatinizados y, posteriormente, fueron teñidos con Azul de Toluidina (0,5% de Azul de Toluidina con 0,5% de tetraborato sódico en agua destilada).

Para la observación y fotografía de las secciones semifinas se utilizó un microscopio Olympus Provis AX70 y las imágenes se capturaron con el programa informático Micro CCD.

En los cortes semifinos se localizó, mediante microscopía óptica, la zona a analizar ultraestructuralmente y, a continuación, se retalló el bloque, delimitando dicha zona para la realización de cortes ultrafinos consecutivos. Las secciones ultrafinas se recogieron en rejillas de ojal de cobre (Electron Microscopy Science), recubiertas con una película de 0,5% colodión en amil

acetato; y posteriormente se contrastaron con acetato de uranilo (2% acetato de uranilo en etanol al 50%) durante 15min en oscuridad a TA y con citrato de plomo (Merck) durante 10min a TA en atmósfera sin CO₂ para evitar que precipitara el plomo. Finalmente se lavaron las secciones con abundante agua destilada y se dejaron secar antes de su observación al microscopio electrónico.

Las rejillas con las secciones ultrafinas fueron visualizadas en un microscopio electrónico Zeiss-EM 900 con una cámara TRS (Slow Scan CCD) acoplada y las imágenes fueron tomadas con el programa informático ImageSP Viewer

3.2.7. Electroforesis en Gel de poliacrilamida (SDS-Page) - Western Blot

Para demostrar la especificidad de los anticuerpos se realizó una electroforesis SDS-PAGE en condiciones desnaturizantes.

Todos los anticuerpos utilizados eran policlonales. El anticuerpo contra GFP fue obtenido en cabra, el anti-MIF en conejo y el anticuerpo contra mitocondria humana en ratón.

Para la realización de la electroforesis se utilizaron, por separado, la córnea, la retina, el resto de estructuras oculares, el cerebro de ratón y las CSM. Se llevó a cabo la extracción de proteínas utilizando 200µl de tampón RIPA® Lysis Buffer IX (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EEUU.) según las especificaciones del producto. La concentración de proteínas de cada muestra se midió con un nanofotómetro (Nanophotometer de Implen).

Para la realización de la electroforesis se empleó el siguiente protocolo:

1. Se añadieron 60µl de tampón de carga (2% dodecil sulfato sódico [SDS], 10% glicerol, 5% β-mercaptoetanol, 62,5 mM de Tris-HCl, pH 6,8 y 0,25% azul de homofenol) al tejido disgregado.
2. Se calentó la muestra a 90 °C durante 5 minutos para desnaturizar el ADN, y después se puso en hielo para impedir la renaturalización.

3. Para la electroforesis se utilizaron dos geles. El primero es el gel separador, por el que migran las proteínas en función de su peso molecular, y está compuesto por 30%-0,3% Acril-Bisacrilamida, 1/5 solución TGGS (1 M de Tris-HCl, 0,5 M de glicina y 25% glicerol), 20% SDS, 1/100 persulfato amónico (APS) y 1/2000 N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED), en agua ultrapura. Se dejó polimerizar durante 30 minutos.
4. El segundo gel utilizado es el encargado de acumular todas las proteínas para que migren a la vez. Está compuesto por 30%-0,3% Acril-Bisacrilamida, 1/5 solución TEG (0,35 M Tris-HCl a pH 6,7, 20 mM etilendiamina, EDTA y 25% glicerol), 1/50 SDS, 1/100 APS y 1/1000 TEMED. Se añadió sobre el gel separador y se dejó polimerizar durante una hora tras poner el peine que permite la formación de los pocillos de carga.
5. El peine utilizado formaba dos pocillos, uno más pequeño para el marcador de peso molecular, y el otro más grande en el que añadimos los tejidos disgregados. Utilizamos un marcador de peso molecular con proteínas estándar SDS-PAGE de pesos moleculares conocidos (Invitrogen).
6. El gel se dispuso en una cubeta mini-PROTEAN® con una fuente de alimentación PowerPac Basic™ (Bio Rad). La cubeta de electroforesis se llenó con tampón de migración (250 mM de Tris-HCl a pH 8.3, 1.92 M de glicina y 1% SDS). El voltaje utilizado en la migración fue de 70 V.
7. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa mediante la aplicación de un campo eléctrico. Se colocó el gel en el molde del sándwich (Fig.11), que además contenía papeles de filtro, esponjillas y membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences, Little Chalfon, Reino Unido).

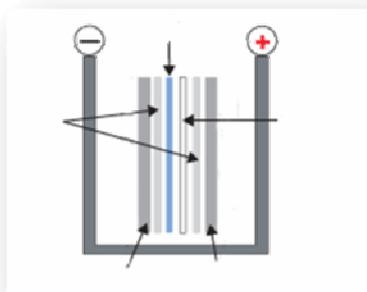


Fig.11: Esquema del sándwich del Western-

8. Se dispuso el sándwich en una cubeta (Mini Trans-Blot, de Bio Rad) con tampón de transferencia (250 mM de Tris-HCl a pH 8.3, 1.92 M glicina y 20% de metanol en agua miliQ). La transferencia se realizó a 4°C durante 1 hora a 100V.
9. La membrana de nitrocelulosa se lavó 3 veces durante 10 minutos cada lavado en TBS-Tween 20 (TBST: 1 M de Tris-HCl a pH 7.5, 5 M de NaCl, 0.1% Tween 20 (Sigma) en agua miliQ), a TA en agitación.
10. Preincubación con leche desnatada en polvo al 5% en TBST 0.1%, durante 1h.
11. Tres lavados de 10 minutos cada uno en TBST.
12. La membrana se cortó en tres tiras perpendiculares al frente de migración y en cada una de ellas se incubaron independientemente los 3 anticuerpos primarios. La incubación se realizó en TBST a una concentración de 1:2000 para los anticuerpos contra GFP y MIF y de 1:100 para anticuerpos contra mitocondria humana durante 12 horas a 4°C en agitación.
13. Tres lavados de 10 minutos cada uno en TBST a TA y agitación.
14. Incubación con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina (Ac anti-cabra/anti-conejo con una dilución 1:5000 o anti-ratón con una dilución 1:30000) durante 1 hora a TA.
15. Tres lavados de 10 minutos cada uno en TBST. Finalmente se reveló con NBT (Nitro-blue-tetrazolium, Roche Applied Science) y BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyd-phosphate, Roche Applied Science).

3.2.8 Experimentos murinos

Los ratones control y los trasplantados con MO y esplenocitos se estabularon en jaulas estériles con cobertor en aisladores de aire filtrado y presión positiva donde han estado sometidos a un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas y a una temperatura ambiental constante (18-20°C), disponiendo libremente de comida y agua.

Todos los ratones de cada jaula recibieron el mismo tratamiento. Los ratones trasplantados con MO y esplenocitos se valoraron individualmente dos veces a la semana teniendo en cuenta la variación del peso así como la aparición de signos de EICH (postura, actividad, erizamiento del pelo e integridad de piel) empleando una escala de 0-2¹⁷².



Fig. 12: Ratón con EICH



Fig. 13: afectación ocular en un ratón con EICH

Además se monitorizaron las características macroscópicas de los ojos de estos ratones 2 veces a la semana y cada ojo por separado, teniendo en cuenta: pelo periocular, borde palpebral y blefarospasmo. Se establecieron 3 grados de afectación clínica dependiendo de los signos observados en los ratones: la valoración de 0 se corresponde con ratones que no presentaban pérdida de pelo alrededor de los ojos, ni costras ni enrojecimiento del borde palpebral, no

Métodos

existía blefarospasmo. La valoración de 1 se corresponde con una de las siguientes características: pérdida de pelo periocular, costras o enrojecimiento del borde palpebral, blefarospasmo y la valoración de 2 se corresponde con ratones que presentaban dos o tres de las características mencionadas anteriormente.

Características macroscópicas de los ojos de los ratones.

- a. Pérdida de pelo periocular
- b. Alteración del borde palpebral (costras o enrojecimiento)
- c. Blefarospasmo.

Puntuación de 0 a 2 en función de la existencia de ninguna, una o dos de estas

Grupo 1: Animales con EICHo. Análisis clínico y anatomopatológico de la superficie ocular.

Con el propósito de generar un modelo de EICHo murino, se establecieron 3 subgrupos experimentales. Cada uno de los experimentos se repitió un mínimo de 2 veces por grupo.

- *TBI* (total body irradiation): Control de irradiación.
- *MO*: Control de MO (infusión de 5×10^6 células de MO).
- *EICH ocular*: Infusión de 5×10^6 células de MO + 5×10^6 esplenocitos

	Grupo	850cGy	MO 5×10^6	BAZO 5×10^6	Número de ratones
1.	TBI	SI	-	-	2
2.	MO	SI	SI	-	2

3.	EICHo	SI	SI	SI	8
----	-------	----	----	----	---

Todos los ratones trasplantados con MO y con MO y esplenocitos se mantuvieron durante 60 días en el animalario. Transcurrido ese tiempo se sacrificaron. **Tabla 7:** subgrupos experimentales de tratamiento para generar un modelo EICHo murino. para el estudio anatomopatológico.

Grupo 2: Animales sanos tratados con inyección subconjuntival de CSM. Análisis inmunohistoquímico y ultraestructural de la superficie ocular.

Con el propósito de valorar el efecto de una inyección subconjuntival de 2×10^5 CSM GFP+ en la superficie anterior del ojo de ratones BALB/C, trabajamos con 2 subgrupos experimentales. Los experimentos se repitieron como mínimo 2 veces por grupo.

- *Control*: Control al que no se infundió CSM.
- *Control + CSM*: Inyección subconjuntival de 2×10^5 CSM.

Grupo	850cGy	MO 5×10^6	BAZO 5×10^6	Número de ratones
1. Control	-	-	-	2
2. Control +CSM	-	-	-	20

Tabla 8: subgrupos de tratamiento en ratones control tratados con inyección subconjuntival de CSM.

Empleamos 20 ratones BALB/C a los que se les inyectaron subconjuntivalmente 2×10^5 células mesenquimales. Las CSM se inyectaron en el ojo derecho de los ratones. Los 20 ratones se dividieron en 5 grupos que se colocaron en 5 jaulas que contenían 4 ratones cada una. Se sacrificaron 5, 10, 20, 30 y 40 días

Métodos

después de la inyección subconjuntival. Y seguidamente se realizó la enucleación de los ojos y el procesamiento histológico para valorar la existencia de CSM en córnea y limbo esclerocorneal en cada uno de los grupos.

Grupo 3: Animales con EICHo tratados con inyección subconjuntival de CSM. Análisis inmunohistoquímico de la superficie ocular.

Con el propósito de valorar el efecto de una inyección subconjuntival de 2×10^5 CSM GFP+ en la superficie ocular de ratones BALB/c a los que previamente se les había generado EICHo, trabajamos con 3 subgrupos experimentales. Los experimentos se repitieron como mínimo 2 veces por grupo.

- *TBI* (total body irradiation): Control de irradiación.
- *MO*: Control de MO (infusión de 5×10^6 células de MO).
- *EICH* ocular + CSM: (Infusión de 5×10^6 células de MO + 5×10^6 esplenocitos) Inyección subconjuntival de 2×10^5 CSM.

Grupo	850cGy	MO 5×10^6	BAZO 5×10^6	Número de ratones
1. TBI	SI	-	-	2
2. MO	SI	SI	-	2
3. EICHo +CSM	SI	SI	SI	16

Tabla 9: sugrupos de tratamiento del modelo de ratón realizados con el fin de analizar el efecto de una inyección subconjuntival de 2×10^5 CSM GFP+ en la superficie anterior de ratones BALB/c a los que previamente se les había generado EICHo.

Empleamos 16 ratones BALB/c a los que previamente se les había generado EICHo. Se inyectaron subconjuntivalmente 2×10^5 células mesenquimales 60 días después del trasplante de MO y esplenocitos, con el fin de asegurarnos que los ratones tenían signos de EICHo. Las CSM se inyectaron en el ojo derecho de los ratones. Los 16 ratones se dividieron en 4 grupos que se colocaron en 4 jaulas que contenían 4 ratones cada una. Se sacrificaron 5 y 10 días después de

la inyección subconjuntival. Y seguidamente se realizó la enucleación de los ojos y el procesamiento histológico para valorar la existencia de CSM en córnea y limbo esclerocorneal.

4.

Resultados

4.1. ANIMALES CON EICH_o. ANÁLISIS CLÍNICO Y ANATOMOPATOLÓGICO DE LA SUPERFICIE OCULAR.

El ojo es un órgano diana de la EICH. Entre el 60 y el 90% de los pacientes con EICH presentan afectación ocular. No se conoce con exactitud la fisiopatología de la EICH_o, está escasamente estudiada. La mayoría de los artículos describen sólo las alteraciones que se producen en la glándula lagrimal y la conjuntiva^{3,5}. Por eso, el primer objetivo de esta Tesis Doctoral fue el desarrollar un modelo murino de EICH_o que permitiera definir las características histopatológicas de la superficie ocular, incluidos córnea y limbo esclerocorneal, de ratones con EICH_o con el fin de profundizar en el conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad.

4.1.1. Signos clínicos de EICH y EICH_o

Para la generación del modelo de EICH y de EICH_o se emplearon como donantes ratones macho C57BL/6 y como receptores ratones hembra BALB/C a los que después de una irradiación letal se les infundió una suspensión celular de 5×10^6 células de MO asociada a 5×10^6 esplenocitos que procedían de ratones donantes. Los distintos signos clínicos de EICH y de EICH_o se valoraron individualmente en cada ratón 2 veces a la semana hasta el día 60 postrasplante.



Fig.14. Ratón con EICHo. A los 27 días postrasplante mostraba un blefarospasmo en los ojos. La gradación de los signos clínicos se realizó a los 30-60 días postrasplante, observándose en todos los animales pérdida de peso, postura “encorvada”, disminución de actividad y pérdida de pelo¹⁷².

Fig.15. Úlcera corneal (flecha) en un ojo enucleado. Los animales con puntuación ≥ 1 a los 30 días post-trasplante.

Los hallazgos clínicos oculares de los ratones con EICH se graduaron teniendo en cuenta: pelo periocular, borde palpebral y blefarospasmo. La escala de valoración fue la siguiente:

- 0: Los ratones no presentaban pérdida de pelo alrededor de los ojos, ni costras ni enrojecimiento del borde palpebral, no existía blefarospasmo.
- 1: Los ratones presentaban una de las siguientes características:
 - ✓ Pérdida de pelo periocular,
 - ✓ Costras o enrojecimiento del borde palpebral,
 - ✓ Blefarospasmo
- 2: Los ratones que presentaban dos o tres de las características mencionadas anteriormente.

Todos los animales presentaron una puntuación ≥ 1 en al menos uno de los ojos a los 30 días post-trasplante. Los signos clínicos se mantenían hasta los 60 días post-trasplante.

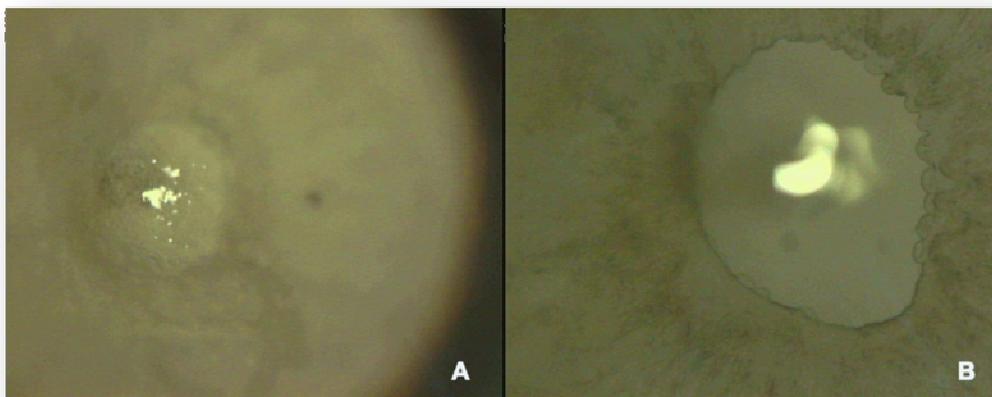


Fig.16. Imagen macroscópica de úlcera corneal. En la fotografía **A** está enfocado el epitelio corneal donde se observa una irregularidad de la superficie del mismo. En la fotografía **B** está enfocado el iris y sólo se observa una borrosidad central debido a la pérdida de transparencia por



Fig.17. Ratones con EICHo. **A:** ratón con EICHo a los 12 días post-trasplante, presenta una úlcera en el borde libre del párpado inferior del OI. **B:** ratón con EICHo a los 26 días post-trasplante, se puede observar una pérdida de pelo periorcular y una pérdida de la regularidad del párpado inferior por úlceras en el borde libre palpebral. **C:** 28 días post-trasplante, se objetiva una pérdida de pelo periorcular y úlceras importantes en el borde libre palpebral, con costras sobre el borde libre. **D:** 40 días post-trasplante, el ratón muestra una pérdida de pelo periorcular en OD y una pequeña herida en la piel del párpado inferior junto a canto interno.

Los signos clínicos oculares comenzaron a aparecer a los 10-15 días después del trasplante con signos leves, como blefarospasmo o pequeñas alteraciones en el borde palpebral. A los 30 días del trasplante la afectación ocular ya era grave, con gran pérdida de pelo periocular e importantes costras y heridas en el borde palpebral.

Se observó un alto grado de correlación entre las alteraciones macroscópicas oculares y los signos sistémicos de EICH.

Los animales fueron sacrificados a los 60 días del trasplante, e inmediatamente después se realizó la enucleación. Los ojos enucleados fueron examinados mediante estereomicroscopio (Leica MZ6) observándose úlceras corneales, pannus corneal y neovascularización corneal en todos los casos de EICHo.

4.1.2. Examen histológico de la superficie ocular en el modelo de EICHo

En el examen mediante microscopía óptica de las muestras procesadas y teñidas con hematoxilina-eosina se apreciaron lesiones características de EICH en la piel de los párpados, la glándula lagrimal, la conjuntiva, la córnea y el limbo esclerocorneal, existiendo un alto grado de correlación entre la histología y los signos macroscópicos previamente descritos. Las lesiones histológicas observadas son las siguientes principalmente:

- Vacuolización citoplasmática: caracterizada por la aparición de una o más vacuolas en el citoplasma de las células en las muestras teñidas con hematoxilina-eosina.
- Satelitosis: denominando así al conjunto de linfocitos (células inflamatorias) que aparecen rodeando células en apoptosis (células individuales dañadas) en muestras teñidas con hematoxilina-eosina.
- Infiltrado inflamatorio mononuclear linfocitario en capas basales y suprabasales, perivascular y dispuesto en pequeños grupos.

Resultados

- Células y cuerpos apoptóticos: se observan de manera más frecuente como células aisladas y ocasionalmente en pequeños grupos de células apoptóticas, que en general se separan de las células sanas vecinas, y se rodean de un espacio claro o pseudo-halo. La célula apoptótica tiene un tamaño menor con citoplasma denso y organelas condensadas. La cromatina se agrega en la periferia, por debajo de la membrana nuclear en masas densas bien delimitadas de diversas formas y tamaños. El núcleo puede romperse, produciendo dos o más fragmentos. Las células apoptóticas muestran al principio una intensa vesiculación en la superficie, después sufren fragmentación en numerosos cuerpos apoptóticos rodeados por membrana y compuestos por citoplasma y organelas muy agrupadas, con o sin un fragmento nuclear. Se confirmó la existencia de los cuerpos apoptóticos empleando el método de la Caspasa 3 (Novocastra™ Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody CPP32).

En las muestras analizadas observamos lo siguiente:

- En la piel de los párpados se encontró un infiltrado linfocítico inflamatorio en dermis y epidermis. Vacuolización de las células del epitelio de la epidermis y satelitosis en toda la epidermis. También se observó apoptosis entre los queratinocitos de la basilar. Lo que demuestra la existencia de una dermatitis inducida por el EICH. (Fig. 17)
- En las muestras de glándula lagrimal se observó un infiltrado eosinófilo focal en el área interlobular en ocho de diez secciones analizadas de cada muestra de glándula lagrimal de los distintos ratones, no se observaron células mononucleares en el área acinar. Se confirmó la existencia de eosinófilos en el epitelio de los conductos junto a cuerpos apoptóticos. Y fibrosis alrededor de los conductos de la glándula lagrimal. (Fig.18)
- En la córnea de los ratones con EICHo, el epitelio corneal se mostraba atrófico, con pérdida de continuidad del epitelio en algunas muestras, observándose vacuolización en los estratos basal e intermedio del epitelio. Dos o más cuerpos apoptóticos con infiltrado leucocitario se observaban en el epitelio corneal en, al menos ocho de diez secciones

analizadas de cada ojo enucleado. También se objetivó la existencia de satelitosis de los queratocitos, identificados como linfocitos rodeando queratocitos en apoptosis. Por otra parte, en el estroma corneal se observó un edema difuso con neovascularización e infiltrado inflamatorio. El endotelio corneal era normal. (Fig. 21)

- En la conjuntiva tarsal y bulbar se encontró una disqueratosis con pérdida de epitelio conjuntival, exocitosis linfocítica, satelitosis y necrosis celular con cuerpos apoptóticos en el epitelio en ocho de diez muestras analizadas. También se observaron microvesículas subepiteliales y mononucleares en la sustancia propia de la conjuntiva (Fig. 19 y 20).
- En el limbo esclerocorneal se observaron los mismos cambios histológicos que en el epitelio corneal, con satelitosis, vacuolización de las células y cuerpos apoptóticos, en al menos ocho de diez secciones de limbo analizadas en cada ojo enucleado de ratones con EICHo. El número de estratos celulares del epitelio era normal, conservándose normal la estructura del mismo. Se observó edema en el estroma del limbo junto a los cambios celulares característicos de EICH (vacuolización de los queratocitos y cuerpos apoptóticos en estroma). (Fig. 22)

Tras el examen histológico se pudo comprobar, por tanto, que todos los ratones sometidos a una irradiación letal, a los que se les había inyectado células procedentes de médula ósea y bazo mostraban alteraciones anatomopatológicas características de EICH a nivel ocular.

Ninguno de los hallazgos macroscópicos, ni histológicos se observaron en los ratones control que habían sido sometidos a irradiación y se les había trasplantado únicamente con células de médula ósea. Por tanto, podemos decir que estos cambios macroscópicos e histológicos no están causados por la irradiación, el estrés, ni ninguno de los factores a los que son sometidos los ratones control; si no que, estos hallazgos son específicos de la EICH. (Fig. 24)

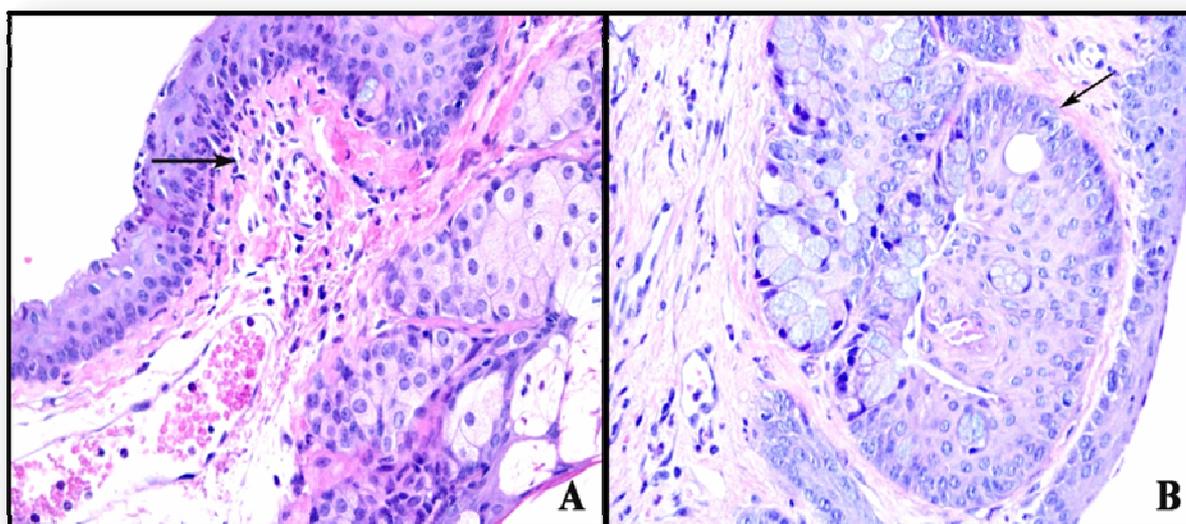


Fig.18. Párpado. Alteraciones anatomopatológicas palpebrales en un ratón con EICHO. **A:** En la imagen se observan cuerpos apoptóticos y vacuolización basal e infiltrado linfocitario inflamatorio intra y subepitelial (flecha). **B:** Cambios histológicos en las glándulas de Meibomio en un ratón con EICHO. Existe una metaplasia escamosa e infiltrado inflamatorio. Se observa, además, vacuolización en algunas células (flecha). Imagen de microscopio óptico. Tinción con hematoxilina-eosina. Magnificación 40x.

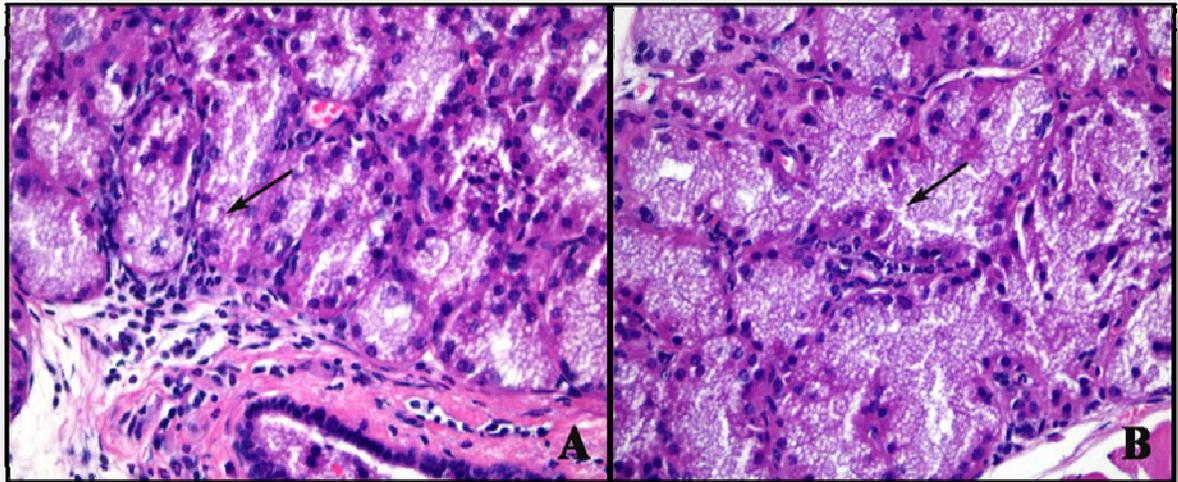


Fig.19. Glándula lagrimal de ratón con signos clínicos de EICHo. **A:** Infiltrado inflamatorio (flecha) en torno al conducto excretor que se extiende al área interacinar adyacente. Magnificación 40x **B:** Infiltrado inflamatorio (flecha) en otras áreas de la glándula lagrimal. Magnificación 100x. Tinción con hematoxilina eosina. Imagen de

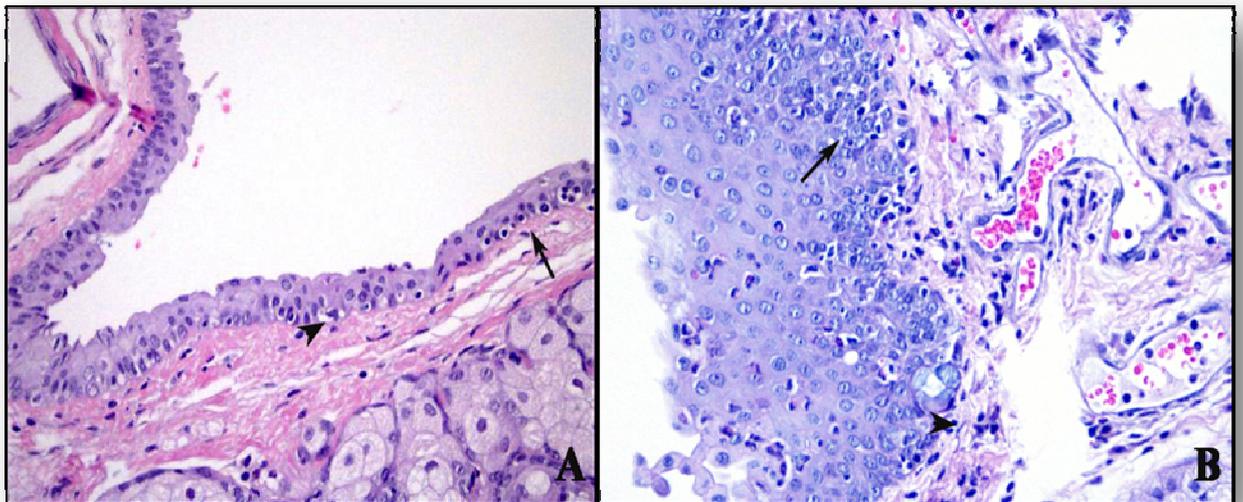


Fig.20. Conjuntiva tarsal. Cambios histológicos en la conjuntiva tarsal de dos ratones con EICHo. Tinción con hematoxilina-eosina. Imagen de microscopía óptica. Magnificación 40x. **A:** Se observan cuerpos apoptóticos (punta de flecha) y vacuolización de los estratos basales del epitelio (flecha). **B:** Pérdida parcial de células secretoras (punta de flecha), en el epitelio superficial existe una vacuolización de las células y apoptosis (flecha)

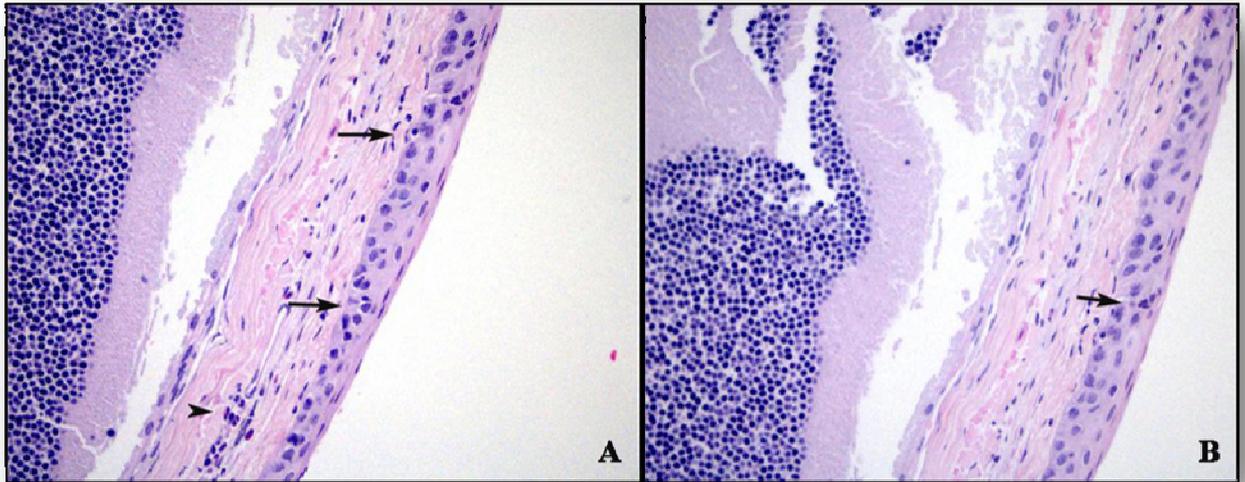


Fig.21. Conjuntiva bulbar de ratón con signos clínicos de ECIHo. Tinción con hematoxilina-eosina. Imagen de microscopio óptico. **A:** Infiltrado inflamatorio (punta de flecha) y cuerpos apoptóticos (flecha). Magnificación 40x. **B:** Detalle de cuerpo apoptótico. Magnificación 100x.

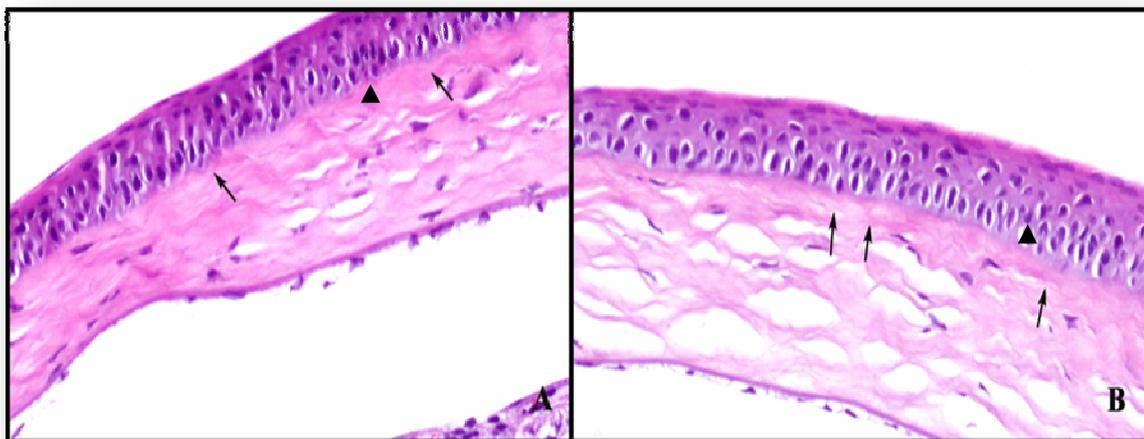


Fig.22. Córnea. Imagen de microscopía óptica de los cambios histológicos en la córnea de dos ratones con ECIHo. Se observa una vacuolización citoplasmática en el epitelio corneal (flechas), cuerpos apoptóticos (puntas de flecha) y gran edema estromal. Tinción con hematoxilina-eosina. Magnificación 40x.

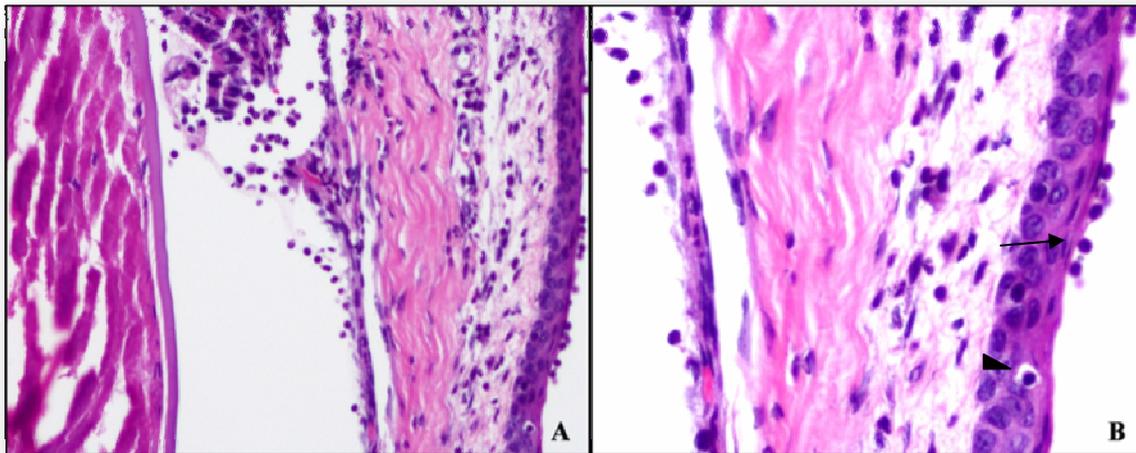
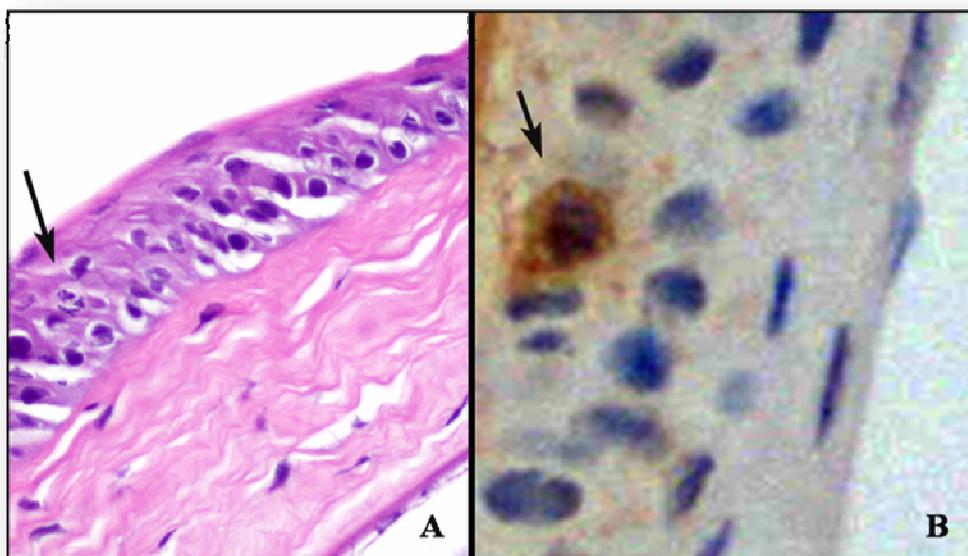


Fig.23.Limbo. Cambios anatomopatológicos en limbo esclerocorneal en un ratón con EICHo. Tinción con hematoxilina eosina. Microscopía óptica. En la imagen **A** se puede observar la existencia de infiltrado linfomonocítico y eosinófilo y vacuolización citoplasmática de células epiteliales. Magnificación 40x. La imagen **B**,

Fig.24. Cuerpo apoptótico en el epitelio corneal. En la imagen **A** tinción con hematoxilina eosina. En la imagen **B** tinción con Caspasa 3.



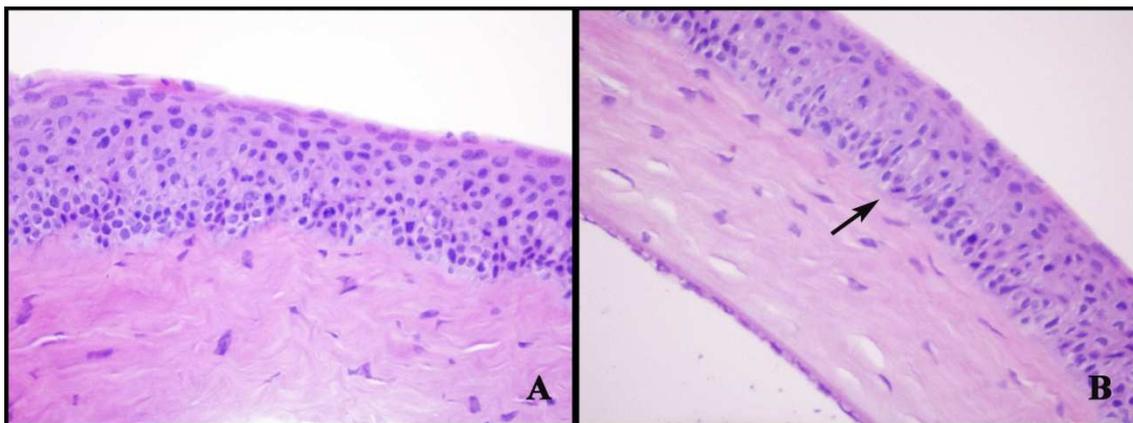


Fig.25. A: Epitelio y estroma corneal normales en un ratón irradiado, no sometido a trasplante de células hematopoyéticas. No se observan las alteraciones histológicas características de EICH. Hematoxilina-eosina, magnificación 40x. **B:** Imagen de córnea de otro ratón irradiado. Todas las capas son normales, existe mitosis en la capa basal del epitelio (flecha). Tinción con hematoxilina-eosina, magnificación 40x

4.2. WESTERN BLOT.

Para identificar y caracterizar las CSM humanas inyectadas subconjuntivalmente en ratones BALB/C, y evaluar su distribución y la capacidad de diferenciación, las CSM humanas se marcaron con GFP (Green Fluorescent Protein). La GFP es una proteína que emite bioluminiscencia en la zona verde del espectro visible, el gen celular que expresa esta proteína puede ser introducido y mantenido en el genoma de las células normales con un vector viral. De manera que una vez introducido el gen en la célula, esta puede ser localizada gracias a la fluorescencia que emite la proteína GFP. En la transducción de las CSM se empleó sobrenadante con partículas lentivirales que contenían el vector pLV-CMV-Luc2-ires-GFP, lo que nos permitía el seguimiento de las CSM mediante fluorescencia debido a la expresión de GFP. Además se empleó el anticuerpo anti-GFP (AB5450, Abcam) específico de la proteína GFP, para localizar las CSM en la córnea de los ratones.

Se empleó también el anticuerpo anti-mitocondria humana (MAB1273, Millipore), que marca las células humanas, lo que nos permite localizar las CSM en las muestras de tejido de ratón.

De manera que para identificar las CSM se emplearon: la fluorescencia emitida por la proteína GFP, el anticuerpo anti-GFP y el anticuerpo anti-mitocondria humana.

Por otra parte, se realizó un inmunomarcaje con anticuerpo anti-MIF. El anticuerpo anti-MIF es un anticuerpo policlonal que reacciona exclusivamente con las células de ratón. De esta forma, se podían diferenciar las células de ratón de las CSM humanas.

Con el fin de comprobar la especificidad *ex vivo* del anticuerpo anti-GFP (AB-5450, Abcam) y el anticuerpo anti-mitocondria humana (MAB-1273, Millipore), frente a anticuerpos GFP y mitocondria respectivamente localizados en CSM humanas se hicieron estudios de Western blot. Las CSM humanas que se inyectaron subconjuntivamente a los ratones BALB/C dieron una única banda de 65 kDa, que se corresponde con el peso molecular del epítipo localizado en la mitocondria intacta, y una banda de 27kDa que se corresponde con el peso molecular descrito para GFP. Ambas bandas se localizan exclusivamente en el extracto proteico total de las CSM humanas. Las bandas sin marcaje inmunohistoquímico fueron las de células de córnea, retina, resto de estructuras oculares y cerebro de ratón con los anticuerpos específicos.

Por otra parte, se confirmó mediante Western blot que el anticuerpo anti-MIF es específico de la proteína MIF de las células de ratón. Mediante esta técnica se puede diferenciar las células de ratón de las CSM humanas inyectadas subconjuntivamente a los ratones. En todos los tejidos murinos analizados (estructuras del ojo y cerebro) se obtuvo una única banda de 12,5 kDa que se correspondía con la proteína MIF (P34884, NBI data base). En el extracto de proteínas correspondientes a las CSM humanas, como era de esperar, no se encontró ninguna banda que se correspondiera con la proteína MIF.

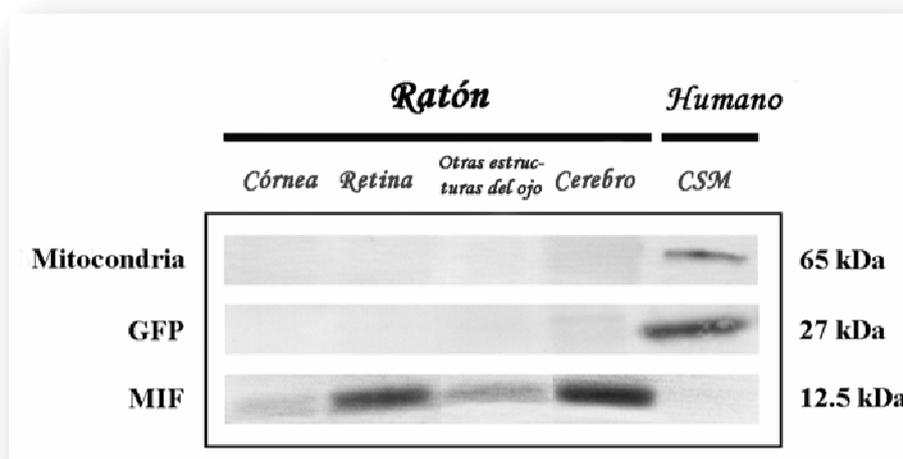


Fig.26. Análisis de Western blot de Mitocondria, GFP y MIF en tejidos de ratón y CSM

4.3. ANIMALES SANOS TRATADOS CON INYECCIÓN SUBCONJUNTIVAL DE CSM. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO Y ULTRAESTRUCTURAL DE LA SUPERFICIE OCULAR.

Las CSM humanas procedentes de MO y cultivadas *ex vivo* tienen la capacidad de diferenciarse hacia distintos tipos celulares, presentan propiedades inmunológicas y son capaces de liberar diferentes factores tróficos^{12-14,149-151}. En animales de experimentación se han descrito cuatro métodos de administración de CSM para reparar la superficie ocular: tópica, intracorneal, intravenosa y con

geles de fibrina¹⁷³⁻¹⁷⁶. El método de administración empleado en el presente trabajo fue la inyección subconjuntival, que permite la llegada de las CSM a córnea y limbo esclerocorneal y no entraña riesgo de lesión ocular. Consideramos un objetivo muy importante de esta Tesis investigar la capacidad de las CSM humanas inyectadas subconjuntivalmente y caracterizar su distribución en la superficie ocular de ratones BALB/C sanos.

4.3.1. Localización de CSM GFP⁺ inyectadas subconjuntivalmente en ratones sanos -

Con el fin de localizar las CSM humanas que expresan la proteína GFP (CSM GFP⁺) que habían sido inyectadas subconjuntivalmente a ratones control BALB/C, se emplearon el anticuerpo anti-GFP (AB-5450, Abcam) y el anticuerpo anti-mitocondria humana (MAB-1273, Millipore). La coexpresión de los dos marcadores, GFP y mitocondria, hace implícito el origen humano y mesenquimal.

Todas las células positivas a GFP, eran también positivas a mitocondria humana.

Por otra parte, se realizó una inmunohistoquímica contra MIF, empleando el anticuerpo anti-MIF (AB-7207, Abcam). La proteína MIF se encuentra exclusivamente en las células de ratón, de esta manera se pueden localizar las células murinas.

Con el objeto de descartar que las células GFP⁺ fueran el resultado de una fusión de CSM con las células del endotelio, estroma o epitelio de la córnea del ratón, se realizó un doble marcaje MIF-GFP. Según nuestros resultados las células GFP⁺ no coexpresan MIF, de lo que deducimos que no se produce fusión celular y se confirma que estas células GFP⁺ son las de origen humano.

**Localización de las CSM humanas a los 5-10 días post-inyección:
(Fig.27 y 28)**

Resultados

El primer grupo de ratones sanos BALB/C que recibieron por vía subconjuntival CSM GFP+ humanas fueron sacrificados a los 5 días post-inyección y el segundo grupo a los 10 días post-inyección, realizándose la enucleación a continuación. Tras procesar los tejidos, se realizó una inmunohistoquímica contra GFP, mitocondria humana y MIF.

El análisis microscópico del tejido demostró que las CSM positivas a GFP y mitocondria humana y negativas a MIF (GFP+/Mitocondria+/MIF-) se distribuyen por la totalidad de la córnea y limbo esclerocorneal y en todas sus capas. La estructura y la densidad celular de la córnea y el limbo esclerocorneal son normales.

Las células GFP+/Mitocondria+/MIF- se concentran principalmente en la perifería de la córnea y limbo esclerocorneal. En número mucho menor, también se observan en el área central de la córnea.

Cuantitativamente la migración de células GFP+/Mitocondria+/MIF- a las distintas capas de córnea y limbo (endotelio, estroma y epitelio) era similar.

La morfología de las células GFP+/Mitocondria+/MIF- observadas en el limbo, en la perifería de la córnea y en el área central de esta variaba en función de su localización en las distintas capas. De manera que se observaron células GFP+/Mitocondria+/MIF- cúbicas en la profundidad del epitelio y más aplanadas en los estratos más superficiales del mismo; en el estroma corneal la morfología de las células GFP+/Mitocondria+/MIF- era similar a la de los queratocitos y se observaron células GFP+/Mitocondria+/MIF- de aspecto aplanado formando parte de la única capa de células que conforman el endotelio.

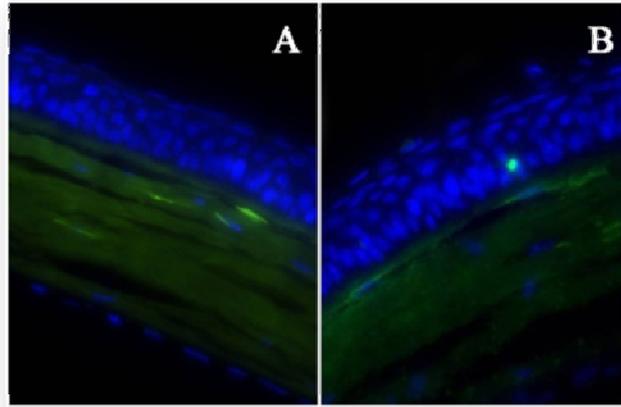


Fig.27. Inmunohistoquímica de fluorescencia contra GFP. Córnea extraída a los 10 días postinyección. En la imagen A se observan células GFP+ en el estroma corneal, con morfología característica de queratocito. En la imagen B se observa una célula GFP+ formando parte de las capas basales del epitelio corneal.

No se observaron diferencias entre los resultados de los tejidos analizados de los ratones sacrificados a los 5 días post-inyección y los de los ratones sacrificados a los 10 días post-inyección.

Según nuestros resultados, las CSM inyectadas subconjuntivalmente migran a las capas corneales antes de los 5 días post-inyección.

Localización de las CSM humanas a los 20-30 días post-inyección: (Fig. 28, 29 y 30)

El tercer y cuarto grupo de ratones sanos BALB/C que recibieron por vía subconjuntival CSM GFP+ humanas fueron sacrificados a los 20 y 30 días post-inyección respectivamente. También se realizaron inmediatamente la enucleación y el procesamiento de los tejidos, para aplicar a continuación la inmunohistoquímica contra GFP, mitocondria humana y MIF.

En la córnea y limbo de los ojos analizados la distribución de las células GFP+/Mitocondria+/MIF- es similar en áreas periféricas y centrales de la córnea y en el limbo esclerocorneal, a diferencia de los tejidos analizados a los 5 o 10

Resultados

días después de la inyección de CSM en los que las células GFP⁺/Mitocondria⁺/MIF⁻ se distribuyen fundamentalmente en la periferia corneal y en el limbo.

El patrón de expresión de las CSM a los 20 y 30 días post-inyección también es distinto en cuanto a localización al observado a los 5-10 días post-inyección. Se detectaron células GFP⁺/Mitocondria⁺/MIF⁻ en todas las capas de la córnea. Pero, el número de CSM que migran tras 20-30 días post-inyección es mayor en el epitelio, a diferencia de lo observado a los 5 y 10 días post-inyección donde la cantidad de CSM que detectadas es similar en todas las capas (endotelio, estroma y epitelio).

La morfología de las células GFP⁺/Mitocondria⁺/MIF⁻ observadas varia, igualmente, en función de la capa a la que migra la célula, de manera que en el epitelio se observan células con forma columnar característica del estrato celular basal, células con formas intermedias y aplanados en los estratos más superficiales. De forma aislada, se observaron células GFP⁺/Mitocondria⁺/MIF⁻ en estroma y endotelio con morfología característica de las células del estrato celular al que habían migrado.

Además, a simple vista el número de CSM migradas es superior a los 20-30 días postinyección.

Localización de las CSM humanas a los 40 días post-inyección: (Fig.31)

Por último, el quinto grupo de ratones sanos BALB/C que recibieron CSM GFP⁺ humanas por vía subconjuntival fueron sacrificados a los 40 días post-inyección. Igualmente que en los casos anteriores, seguidamente se realizó la enucleación, el procesamiento de los tejidos y la inmunohistoquímica contra GFP, Mitocondria humana y MIF.

El análisis microscópico del tejido demostró que no existían diferencias, ni en el número de células GFP⁺/Mitocondria⁺/MIF⁻ ni en su localización, entre los tejidos analizados 40 días post-inyección y los analizados a los 20 y 30 días post-inyección. De manera que las células GFP⁺/Mitocondria⁺/MIF⁻ se

distribuyen por toda la córnea (central y periférica) y el limbo y en todas sus capas, concentrándose mayoritariamente en el epitelio de la córnea y del limbo esclerocorneal. Las encontramos en todos los estratos celulares del epitelio, variando su morfología en función de su localización concreta.

Por lo tanto después de 40 días, las células GFP⁺/Mitocondria⁺/MIF⁻ permanecen todavía en córnea y limbo.

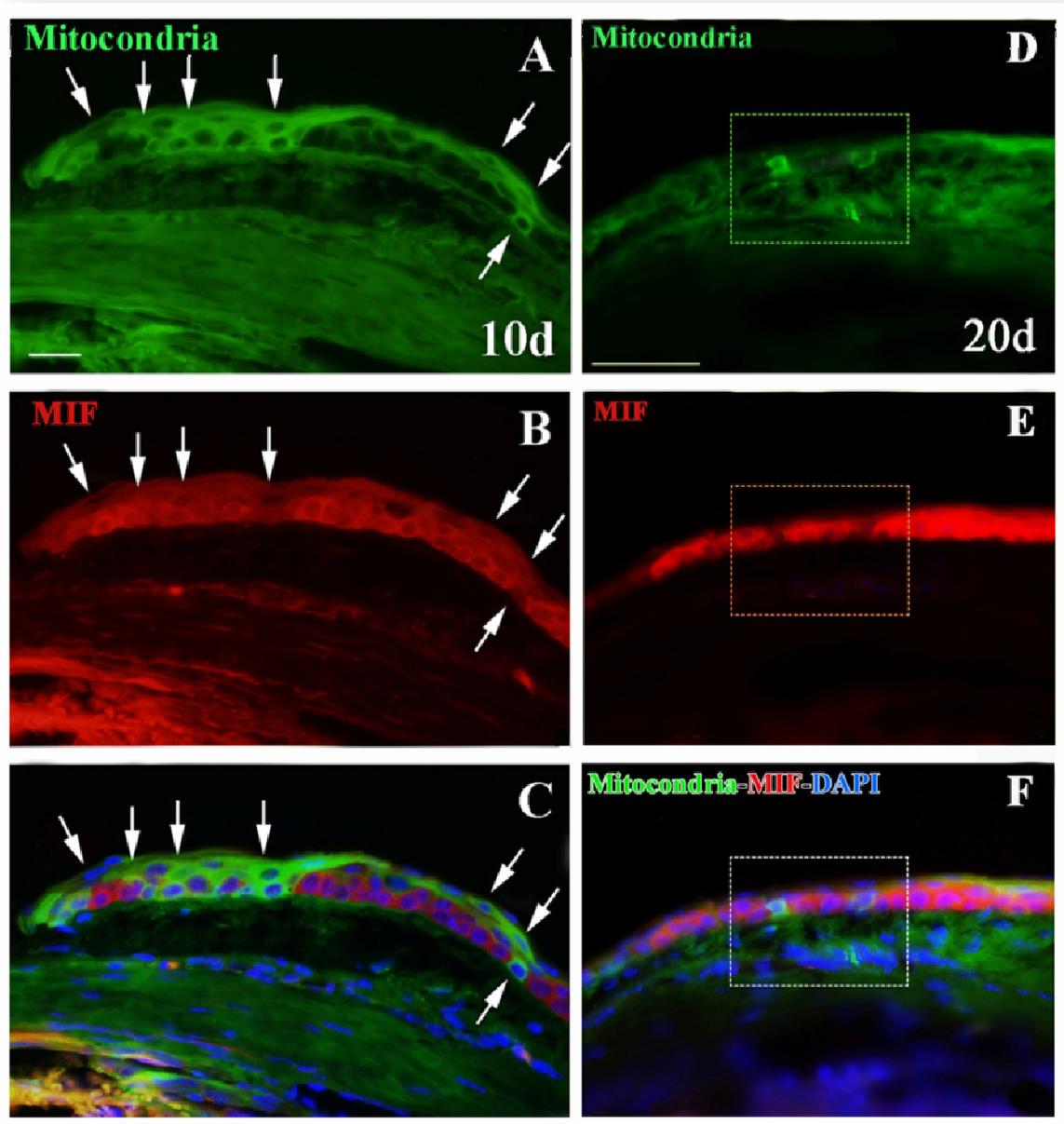


Fig.28. Inmunofluorescencia para Mitocondria y MIF. Localización de las células en epitelio corneal. **A, B y C:** Muestras procesadas a los 10 días postinyección. **D, E y F:** Muestras procesadas a los 20 días postinyección. **A y D:** Inmunofluorescencia para Mitocondria. **B y E:** marcaje inmunofluorescente para MIF. **C y F:** se combinan ambas tinciones, la tinción azul corresponde a DAPI que marca los núcleos celulares. Las flechas indican las células Mitocondria ⁺/MIF⁻ que son las CSM.

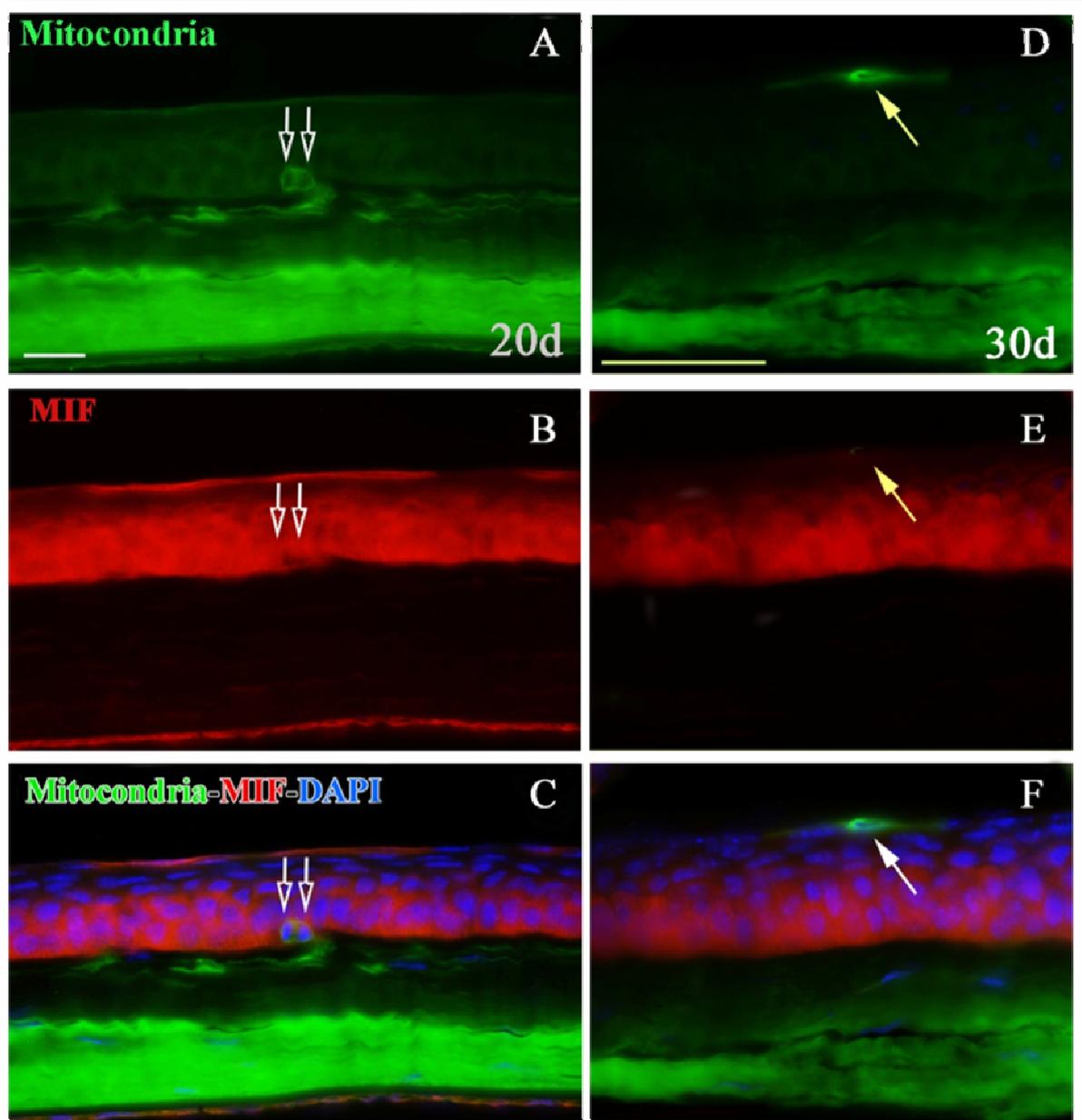


Fig.29. Inmunofluorescencia para Mitochondria y MIF. A, B, y C: Muestras procesadas a los 20 días postinyección. Células Mitochondria +/MIF- localizadas en estratos basales del epitelio corneal. D, E y F: Muestras procesadas a los 30 días postinyección. CSM localizadas en estratos superficiales del epitelio corneal. **A y D:** inmunofluorescencia para Mitochondria. **B y E:** marcaje inmunofluorescente para MIF. **C y F:** se combinan ambas tinciones, la tinción azul corresponde a DAPI que marca los núcleos celulares. Las flechas indican las células Mitochondria +/MIF-, que son las CSM.

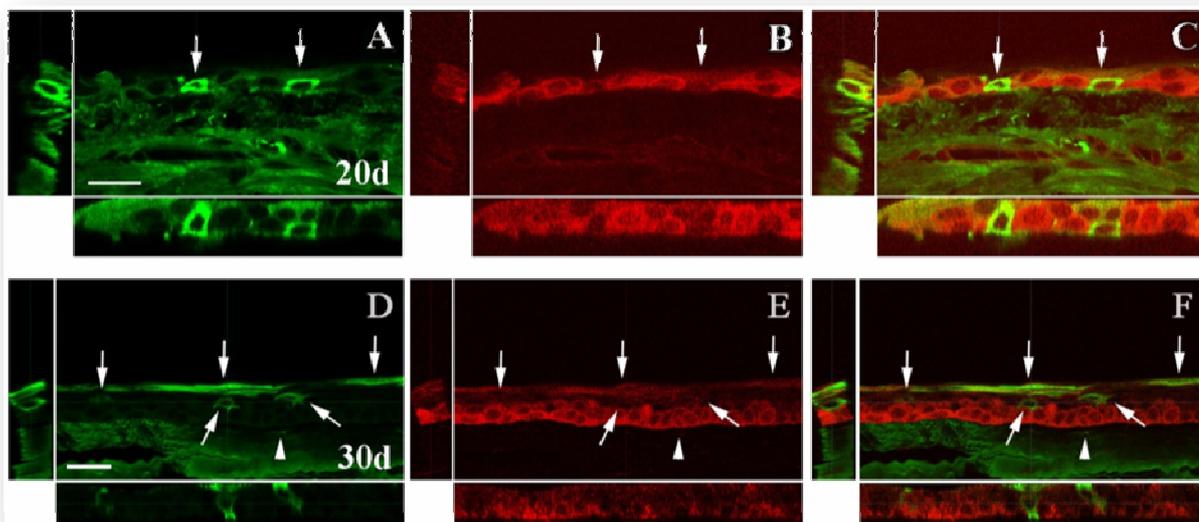


Fig.30. Microscopía confocal. A, B y C: Muestras procesadas a los 20 días post-inyección. D, E y F: Muestras procesadas a los 30 días post-inyección. Localización de las células en el epitelio corneal. **A:** inmunofluorescencia para Mitocondria. **B:** Inmunofluorescencia para MIF. **C:** se combinan ambas tinciones. Las flechas en todas las imágenes indican las células Mitocondria +/MIF-, que son las CSM.

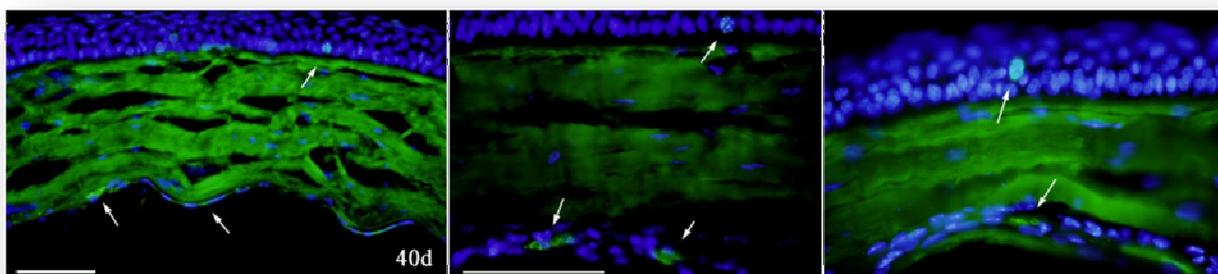


Fig.31. Inmunofluorescencia para Mitocondria. Muestras procesadas a los 40 días postinyección. CSM localizadas en epitelio y en endotelio en distintas muestras. La tinción azul corresponde a DAPI, marca los núcleos celulares. Las flechas en todas las imágenes indican las células Mitocondria +.

4.3.2. Análisis Ultraestructural. Microscopía Electrónica.

Realizamos el estudio de microscopía electrónica con el fin de conocer las características ultraestructurales de las CSM GFP+ localizadas en córnea y limbo esclerocorneal, y compararlas con las células corneales del ratón.

En las muestras analizadas la estructura corneal es normal, formada por cinco capas: epitelio, capa de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio, con la siguiente morfología:

1. En el epitelio corneal y limbar las células tienen unas características propias que las hace diferentes entre sí en función del estrato celular en que se encuentren, algunas células del estrato basal son mitóticamente activas y las células hijas a las que dan lugar se desplazan en sentido apical para formar los estratos intermedios y las células planas de la superficie. Además, en el estrato basal las células muestran abundantes desmosomas en las uniones intercelulares y hemidesmosomas que unen el epitelio a la membrana basal²⁰. La morfología del epitelio de córnea y limbo de los tejidos analizados es normal, formado por cinco estratos celulares aproximadamente, con tres clases de células, de superficie a profundidad: superficiales planas, intermedias o alares y basales o columnares. Formando parte de todos los estratos celulares se observan CSM GFP+/Mitocondria+/MIF-.
 - En los tejidos analizados el estrato celular superficial está formado por dos capas de células aplanadas entre las que se observan CSM GFP+/Mitocondria+/MIF-.
 - En la capa de células intermedias, cuanto más superficial es la célula más aplanada, con los núcleos paralelos a la superficie. Se observan entre estas células uniones desmosómicas de las CSM GFP+/Mitocondria+/MIF- con otras células GFP+/Mitocondria+/MIF- y con células GFP-/Mitocondria-/MIF+.

- El estrato celular basal está formado por una única capa de células columnares sobre la membrana basal, entre las que se observan células GFP⁻/Mitocondria⁻/MIF⁺ y células GFP⁺/Mitocondria⁺/MIF⁻ con morfología columnar. Se pudo objetivar la existencia de filamentos intermedios en las células GFP⁺/Mitocondria⁺/MIF⁻. Además estas células presentan desmosomas en las caras laterales formando uniones intercelulares entre células GFP⁺/Mitocondria⁺/MIF⁻ y entre estas y células GFP⁻/Mitocondria⁻/MIF⁺. Además se observan hemidesmosomas en la cara basal de las células GFP⁺/Mitocondria⁺/MIF⁻ del estrato celular basal del epitelio hacia la membrana basal del mismo.
2. En el estroma la densidad celular es normal; y las células GFP⁺/Mitocondria⁺/MIF⁻ dispuestas entre las fibras de colágeno y la sustancia fundamental muestran una morfología similar a queratocitos normales.
 3. El endotelio está compuesto por una sola capa de células planas hexagonales entre las que observamos células GFP⁺/Mitocondria⁺/MIF⁻ con características similares a las GFP⁻/Mitocondria⁻/MIF⁺, como en un endotelio corneal normal.

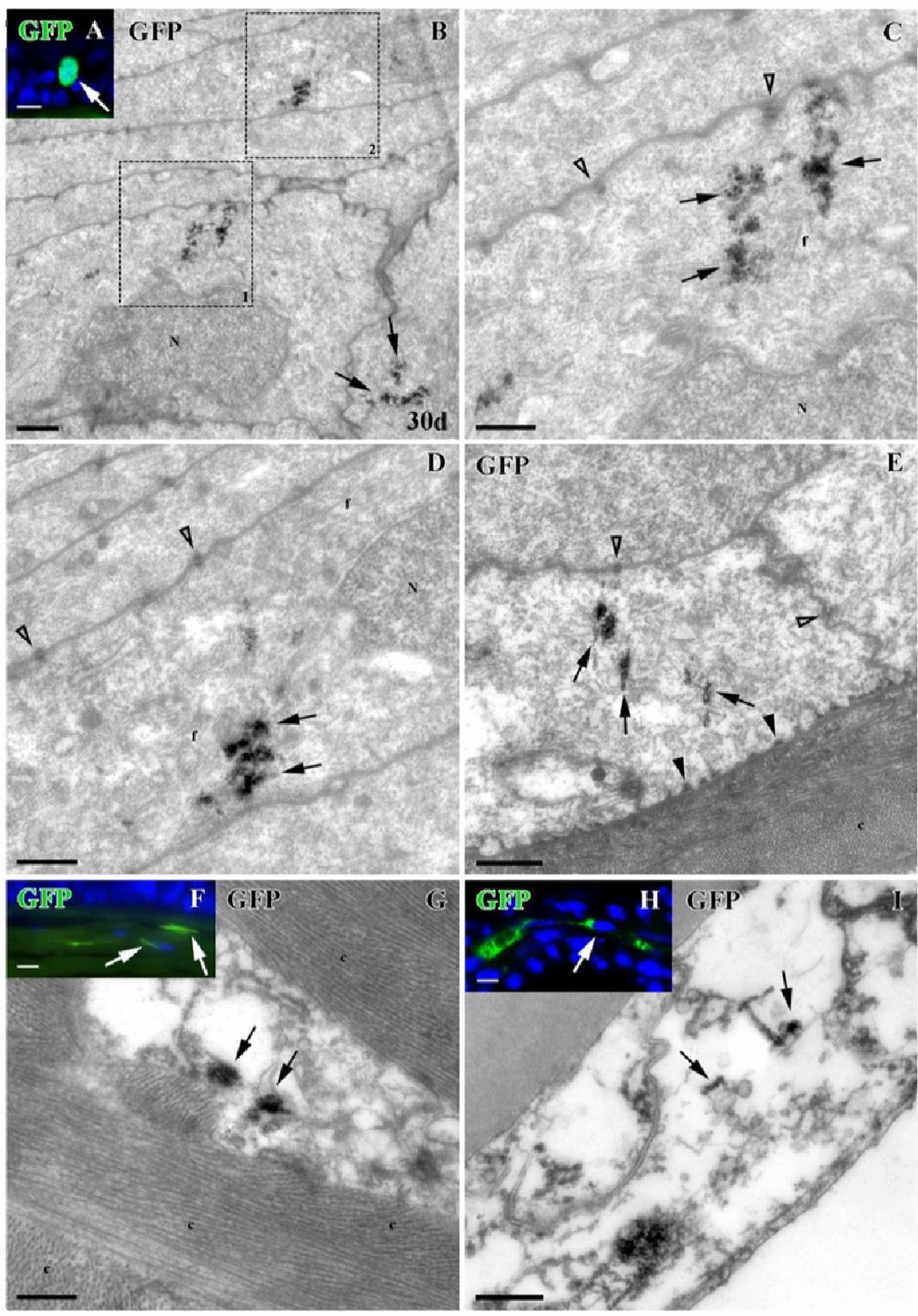


Fig.32. Inmunohistoquímica de fluorescencia (A, F y H) e inmunohistoquímica de microscopía electrónica (B, C, D, E, G e I) para CSM GFP+ en córnea de un ratón 30 días después de la inyección. **A:** Células GFP+ (flecha) en epitelio corneal. **B:** Células GFP+ (flechas) en epitelio. Los recuadros 1 y 2 están aumentados en las figuras C y D respectivamente. **C:** detalle de una célula GFP+ (flecha) con filamentos intermedios (f) y desmosomas (cabezas de flecha transparentes) en estratos basales del epitelio. **D:** detalle de una célula epitelial GFP+ (flechas) en la que se observan filamentos intermedios (f) y desmosomas (cabezas de flecha transparentes) en estratos intermedios del epitelio. **E:** Detalle de una célula GFP+ epitelial (flechas) del estrato celular basal, se pueden observar desmosomas (cabezas de flecha) y hemidesmosomas (cabezas de flecha). **F:** queratocitos GFP+ (flecha) en el estroma corneal. **G:** Queratocitos GFP+ (flechas) rodeados de paquetes de colágeno (c) en estroma corneal. **H:** Células GFP+ (flecha) en el endotelio. **I:** células GFP+ en endotelio (flechas). Barras de escala: A, H, F: 10µm; B, E: 1000nm;

ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA SUPERFICIE OCULAR.

El uso de CSM expandidas *ex vivo* puede ser una buena alternativa para la profilaxis y el tratamiento de la EICHo debido a su capacidad para diferenciarse hacia células de tejidos dañados y a sus propiedades inmunológicas^{9-11,142-144}. Por tanto, la inyección subconjuntival de CSM humanas puede convertirse en una herramienta terapéutica clave en el tratamiento de esta patología.

En este Trabajo pretendemos valorar la distribución y el efecto de las CSM humanas inyectadas subconjuntivalmente en ratones con EICHo.

Empleamos 16 ratones BALB/C que fueron trasplantados con MO y esplenocitos de ratones donantes C57BL/6 para la generación de una EICHo y se mantuvieron en el animalario durante 60 días, en este momento todos los ratones presentaban signos de EICH y EICHo. La puntuación de la gradación de EICH sistémica era ≥ 1 y en la escala de valoración de la EICHo era ≥ 1 en ambos ojos. En el día 60 post-trasplante se realizó la inyección subconjuntival de CSM GFP+ humanas en el OD a todos los ratones. Después de 5 días se sacrificaron 8 y a los 10 días otros 8 ratones, en ambos casos se realizó inmediatamente la enucleación y el procesamiento de los tejidos.

Las CSM inyectadas en los ratones a los que previamente se había generado una EICHo eran las mismas que las empleadas en ratones sanos. Por lo tanto son células GFP+/ Mitocondria+/MIF-.

También se realizó un doble marcaje MIF-GFP para descartar una posible fusión de las CSM GFP+ humanas inyectadas con las células propias de la córnea y limbo esclerocorneal del ratón. Los resultados obtenidos, exactamente igual que en ratones sanos, muestran que las células positivas para GFP son negativas para MIF (GFP+/ Mitocondria+/MIF-), y las células positivas para MIF son negativas para GFP (GFP-/Mitocondria-/MIF+), lo que confirma que no se produce fusión celular.

**Localización de las CSM humanas a los 5-10 días post-inyección:
(Fig.33,34,35 y 36)**

El análisis microscópico del tejido demostró que las células GFP⁺/Mitocondria⁺/MIF⁻ se distribuyen por la córnea central y periférica, y en el limbo esclerocorneal sin existir diferencias entre el centro y la perifería.

Se detectan células GFP⁺/Mitocondria⁺/MIF⁻ en todas las capas de la córnea (epitelio, estroma y endotelio). Pero el número de CSM que migran es mucho mayor en el epitelio que en las otras capas.

Cuantitativamente la migración de las CSM en todas las capas de córnea y limbo en ratones con EICHo es claramente mayor que en ratones control sanos.

En las muestras obtenidas en algunas áreas de la córnea se observan defectos epiteliales (úlceras corneales) y un importante edema estromal, que justificamos por la EICHo avanzada que presentaban los ratones. En la córnea periférica y en el limbo esclerocorneal se observan neovasos de forma aislada en todas las muestras de tejido.

La morfología de las células GFP⁺/Mitocondria⁺/MIF⁻, igual que en el caso de los ratones sanos, varía en función de su localización en las distintas capas de la córnea y limbo y en los distintos estratos del epitelio.

Finalmente, no observamos diferencias entre los resultados de los tejidos correspondientes a los ratones sacrificados a los 5 días post-inyección y los de los ratones sacrificados a los 10 días post-inyección.

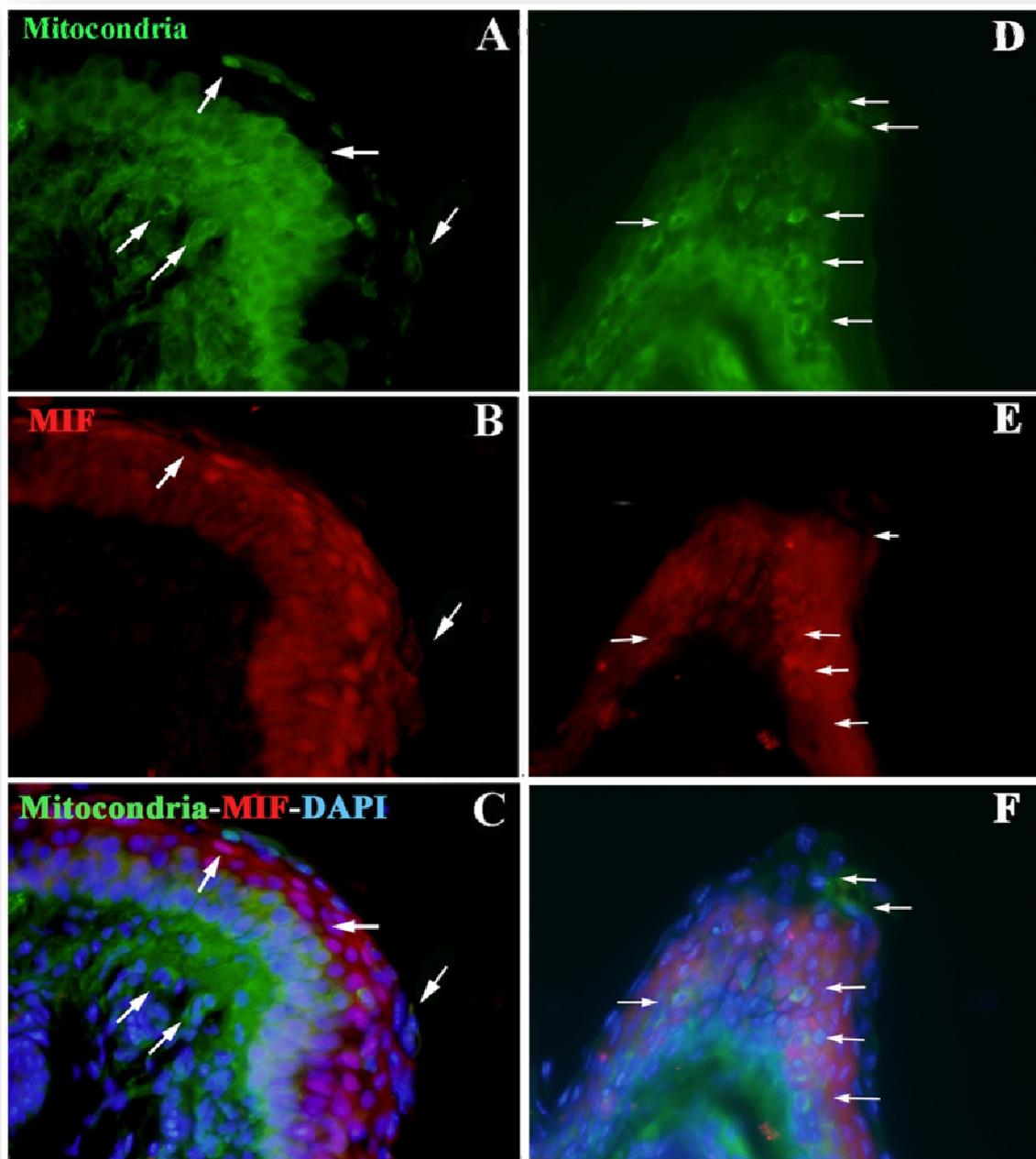


Fig.33. Inmunofluorescencia para Mitochondria y MIF. Muestras de córnea de ratones con EICHo, procesadas a los 10 días postinyección. Localización de las células en todas las capas de la córnea. **A y D:** inmunofluorescencia para Mitochondria, marca las CSM. **B y E:** marcaje inmunofluorescente para MIF (células de ratón). **C y F:** se combinan ambas tinciones (GFP+/Mitochondria+/MIF-), la tinción azul corresponde a DAPI que marca los núcleos celulares. Las flechas en todas las imágenes indican las células Mitochondria +/MIF-, que son las CSM.

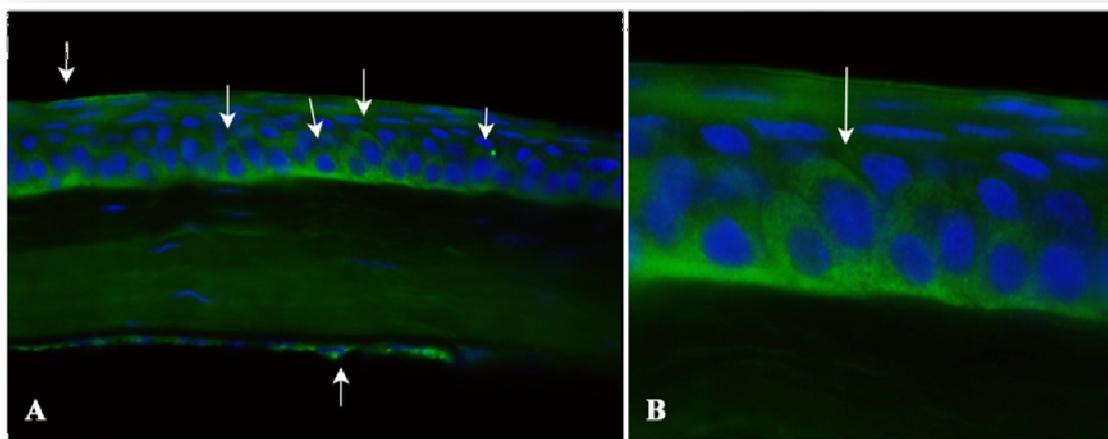


Fig.34. Inmunofluorescencia para Mitocondria. Muestras de córnea de ratones con EICHo **A:** Localización de CSM en capas basales y epiteliales en epitelio y endotelio. **B:** detalle de CSM formando parte de la capa basal del epitelio. La tinción azul corresponde a DAPI que marca los núcleos celulares. Las flechas en

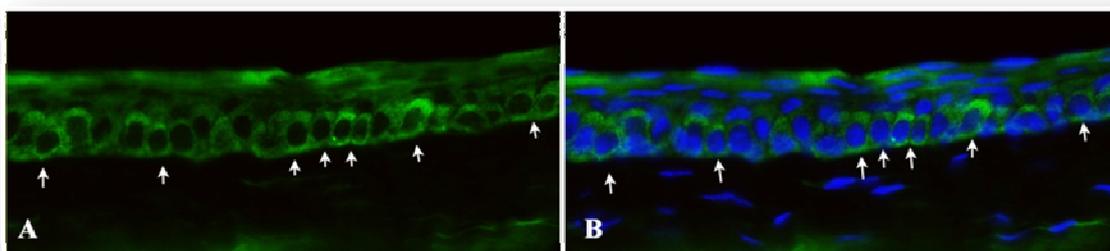


Fig.35. Inmunofluorescencia para Mitocondria. Muestras de córnea de ratones con EICHo. Localización de las células en el epitelio de la córnea. **A:** inmunofluorescencia para Mitocondria, marca las CSM. **B :** inmunofluorescencia para Mitocondria y DAPI (tinción azul) que marca los núcleos celulares. Las

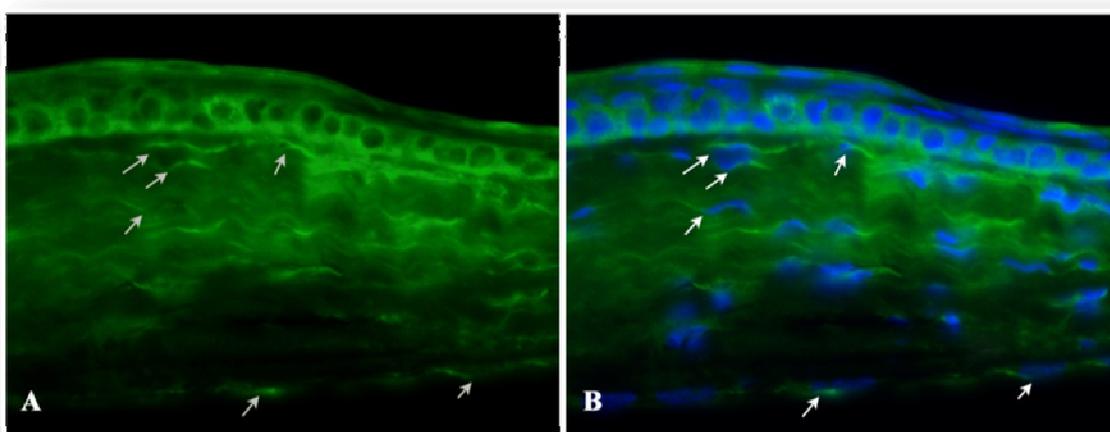


Fig.36. Inmunofluorescencia para Mitocondria. Muestras de córnea de ratones con EICHo. Localización de las células en el estroma y epitelio de la córnea. **A:** inmunofluorescencia para Mitocondria, marca las CSM. **B:** inmunofluorescencia para Mitocondria y DAPI (tinción azul) que marca los núcleos celulares. Las

5.

Discusión

5.1. ANIMALES CON EICH_o. ANÁLISIS CLÍNICO Y ANATOMOPATOLÓGICO DE LA SUPERFICIE OCULAR.

La EICH es un proceso inmunológico complejo debido al efecto citotóxico de los linfocitos T del donante sobre múltiples órganos vitales del paciente. Se considera la mayor causa de morbilidad y mortalidad entre los pacientes sometidos a trasplante de células madre hematopoyéticas. La incidencia es de hasta el 80% en series de pacientes sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos de donante no emparentado^{1,41,50}. El ojo es un órgano diana de la EICH. Entre el 40-90% de los pacientes con EICH presenta afectación ocular⁶⁴. No se conoce con exactitud la fisiopatología de la EICH_o^{3,64,66}, se encuentra escasamente estudiada, lo cual ha motivado nuestro interés para intentar generar un modelo murino que reprodujera las características clínicas y anatomopatológicas de la EICH_o. Para ello decidimos definir las alteraciones a nivel ocular a partir de un modelo establecido de generación de EICH murino, en el cual ya han sido ampliamente descritas las alteraciones clínicas, morfológicas y anatomopatológicas de los animales en otros órganos diana^{172,177,178}.

En nuestro estudio hemos descrito los cambios anatomopatológicos de la superficie ocular en el modelo murino de EICH_o. Posiblemente, estas alteraciones no habían sido descritas debido a la ausencia de un modelo animal establecido. Diferentes autores habían descrito previamente algunos de los hallazgos de EICH_o, que también estudiamos en nuestro trabajo, como la afectación de la glándula lagrimal, la conjuntiva, la piel periocular y en menor medida, córnea^{65,77,81,88}. Sin embargo, hemos observado que en la EICH_o existe una afectación de córnea y limbo, escasamente descrita, similar a la que ocurre en otros órganos diana, de manera que presentan cambios anatomopatológicos característicos de EICH.

Intentamos establecer un modelo animal para la evaluación de la EICH_o en la que el limbo y la córnea se han identificado como órganos diana.

5.1.1. Párpados y piel periocular

Macroscópicamente, se observó una irregularidad del borde libre palpebral, en la mayoría de los casos asociado a úlceras y costras, en párpado superior e inferior de ambos ojos, enrojecimiento periocular y todos los ratones en algún momento del proceso presentaron un blefarospasmo.

Por otra parte, en el examen anatomopatológico de los párpados y de la piel periocular de los ratones BALB/C a los que previamente se había generado una EICH, se observó la existencia de infiltración linfocítica inflamatoria en epidermis y dermis, acompañada de vacuolización, satelitosis y apoptosis celular en la epidermis. Estos signos coinciden con los descritos por *Howard M. Shulman y cols.* y son compatibles con los criterios histológicos diagnósticos de EICH en humanos. Según el “*National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: II. Pathology Working Group Report*” para realizar el diagnóstico de EICH cutáneo es necesaria la existencia apoptosis junto a inflamación y/o vacuolización celular¹⁷⁹. En nuestro modelo de EICH encontramos los criterios suficientes para el diagnóstico de EICH.

Los hallazgos macro y microscópicos observados a nivel palpebral podrían contribuir, asociados a los signos específicos hallados en la superficie ocular, a la clínica de la EICHo y a los signos encontrados en la superficie ocular de los animales, ya que para mantener la transparencia corneal es esencial la indemnidad de los párpados⁶.

5.1.2. Glándula lagrimal

En las muestras de glándula lagrimal de los ratones a los que previamente se había generado una EICHo, se objetivó bajo microscopía óptica, la existencia de

Discusión

fibrosis periductal asociada a una infiltración linfocítica. Estos hallazgos coinciden con lo descrito en los trabajos de Ogawa y cols. donde describen la afectación de la glándula lagrimal en humanos. Según estos autores la aparición de una marcada fibrosis en el intersticio y un notable incremento de fibroblastos con una moderada infiltración linfocítica es la característica histológica principal encontrada en la glándula lagrimal de pacientes con EICH. Estos cambios son más numerosos en los pacientes con EICHo severo que en los casos moderados. Además se ha visto que la severidad del ojo seco se correlaciona directamente con la extensión de los cambios fibróticos, más que con la infiltración linfocítica^{67,69,71,90}.

Anderson y cols. observaron que los fibroblastos del donante se encontraban en la glándula lagrimal, sugiriendo que estos participaban en el exceso de fibrosis existente en paciente con EICHo crónico⁷⁰.

Por otra parte, Hassan y cols. también describieron en un modelo murino de EICH los cambios en la glándula lagrimal, coincidiendo con nuestros resultados y los de Ogawa y cols. en la existencia de una fibrosis e infiltrado inflamatorio periductal en los casos de EICHo^{68,76}.

En nuestro modelo murino de EICHo se confirmó la existencia de cuerpos apoptóticos, descrito igualmente por Hassan y cols⁷⁷.

La afectación de la glándula lagrimal en la EICHo en pacientes contribuiría a la aparición de signos y síntomas por la reducción de la secreción lacrimal. La película lagrimal es la primera superficie refractiva del ojo, constituye un agente esencial en la oxigenación e hidratación del epitelio corneal, actúa como un agente lubricante de la superficie ocular y juega un papel fundamental en la defensa frente a la invasión bacteriana. Una disminución de la cantidad o calidad de la lágrima puede provocar una disminución de la agudeza visual, aparición de defectos epiteliales, queratitis e infecciones corneales^{22,23,37}.

5.1.3.

Conjuntiva

En el modelo de EICHo generado en esta trabajo observamos cambios histológicos a nivel de conjuntiva tarsal y bulbar compatibles con los cambios de los órganos diana que desarrollan EICH, en las muestras examinadas observamos exocitosis linfocítica, satelitosis y apoptosis, cambios característicos de EICH de acuerdo con *National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease*⁴⁶.

Existen pocos trabajos que describen las características macroscópicas de la conjuntiva en pacientes o modelos animales de EICH. *Rojas y cols.* observaron en pacientes con EICHo que en la conjuntiva tras el trasplante alogénico existen más células CD3+ y CD14+ en el epitelio y en el estroma, además de una mayor expresión de moléculas de adhesión en el estroma. En los pacientes con trasplante alogénico que presentaban signos o síntomas de ojo seco había un aumento de células CD14+ en epitelio y estroma comparado con los pacientes sin estos signos o síntomas. Observaron también que en los pacientes con queratoconjuntivitis sicca existía un cociente CD4/CD8 mayor que en los pacientes que no tenían queratoconjuntivitis sicca⁶⁵.

Por otra parte, *Aronni y cols.* demostraron en pacientes con EICHo que existía una apreciable disminución de la densidad de células calciformes que está directamente correlacionada con una disminución del test de Schirmer y un aumento en la expresión de los marcadores inflamatorios⁶⁷. En nuestro modelo de EICHo observamos también un aumento de células inflamatorias.

5.1.4. Córnea y limbo esclerocorneal

En el análisis anatomopatológico de la córnea y limbo del modelo murino empleado en este estudio, los cambios observados, al igual que en el caso de la conjuntiva, son signos histológicos que se consideran diagnósticos de EICH cuando se observan en otros órganos diana de EICH según *The National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease*⁴⁶. Tanto en el limbo como en la córnea se ha descrito la existencia de satelitosis, cuerpos apoptóticos, vacuolización e

Discusión

infiltrado inflamatorio en epitelio y estroma, manteniéndose el endotelio normal. Estos cambios anatomopatológicos que se producen a nivel corneal pueden ser la causa del Síndrome de ojo seco severo y la queratitis que aparece en los pacientes.

Hemos observado un edema estromal en las muestras de córnea y limbo analizadas, esto provoca una pérdida de transparencia corneal y por tanto una disminución de la agudeza visual.

Las alteraciones en epitelio provocan una pérdida de la regularidad de la córnea y por tanto, la aparición de defectos persistentes, queratitis y úlceras corneales recidivantes, que permitan la aparición de infecciones. La aparición de las úlceras corneales puede ser debida a las lesiones histológicas halladas en epitelio corneal o la consecuencia del roce mecánico por la alteración del borde libre palpebral y/o la disminución de la lágrima por afectación de la glándula lagrimal.

El limbo tiene una gran importancia en la regeneración del epitelio corneal. El epitelio límbico posee un mayor potencial de proliferación que el epitelio corneal central o periférico²⁴ y contiene una población de células madre cuyas células hijas poblarán la córnea²⁶ [ENREF 23](#)²², aunque existen estudios que demuestran la localización de células madre por toda la córnea²⁸.

En este sentido, la destrucción total del limbo provoca una disminución de la capacidad de regeneración epitelial, lo que indica que las células madre localizadas en el limbo son en su mayor parte, las responsables de la regeneración corneal²².

Por otra parte, el limbo es la zona de transición entre la conjuntiva y esclerótica por un lado y la córnea por otro, impide la invasión de la córnea por conjuntiva, de manera que cuando el número de células madre en el limbo disminuye, las células epiteliales de la conjuntiva invaden la córnea, acompañados de tejido fibrovascular que altera la transparencia corneal, e induce un proceso inflamatorio crónico, con defectos epiteliales persistentes y cicatrización estromal⁶ [ENREF 4](#). Si consideramos el limbo una estructura diana de EICH por los cambios histológicos observados en esta Tesis, los daños celulares a nivel límbico, podrían suponer una disminución de la población de las células madre

y de células con gran capacidad de regeneración, por lo que primero aparecerían defectos epiteliales persistentes y segundo una invasión conjuntival de la córnea con el resultado de un proceso inflamatorio crónico, pérdida de la transparencia corneal y úlceras corneales, que es exactamente lo que hemos observado en el modelo murino de EICHo.

5.2. ANIMALES SANOS TRATADOS CON INYECCIÓN SUBCONJUNTIVAL DE CSM. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO Y ULTRAESTRUCTURAL DE LA SUPERFICIE OCULAR.

Se dispone de escasas opciones terapéuticas en el tratamiento de la EICHo, y además, son poco eficaces. Actualmente la mayoría de los tratamientos que se pueden aplicar se centran en aliviar la sintomatología y controlar la respuesta inmunológica.

Es, por tanto, muy importante el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a la prevención y al tratamiento de la EICHo. El uso de CSM puede ser una buena alternativa gracias a su capacidad para migrar y diferenciarse a otros tejidos y a sus propiedades inmunológicas.

5.2.1. Administración de CSM

Discusión

La vía de administración de las CSM humanas GFP+ en el ojo en el presente estudio fue subconjuntival. Es una vía sencilla, segura y poco invasiva. No hemos observado ninguna complicación en las inyecciones realizadas.

Actualmente existe un gran interés en la búsqueda de nuevas vías de administración de CSM con el fin de mejorar su efecto local. Un ejemplo es la inyección local de CSM intra-coronaria, intraútero, en riñón o en piel, cuyos resultados muestran una alta capacidad de injerto. También se pueden administrar con diversas matrices, obteniéndose muy buenos resultados en la reparación de defectos craneofaciales, de huesos largos o de cartílago articular, nariz, oreja y tráquea^{164,166}.

En la literatura hemos encontrado otras cinco formas de administración de CSM para estudiar su efecto a nivel ocular en modelos animales:

1. Administración tópica: limita la disponibilidad de las células y su injerto duradero, Oh y cols emplean esta forma de administración para demostrar el efecto antiinflamatorio y antiangiogénico de estas células en ratas debido a las propiedades paracrinas de las CSM, no describen si injertan o no, y únicamente comprueban su presencia en la córnea¹⁷³.
2. La inyección intracorneal de CSM umbilicales empleada por Liu y cols. en ratones, en nuestra opinión es una forma de administración más agresiva que puede provocar daños a nivel corneal. Estos autores comprobaron que mediante esta vía las CSM se localizaban forma difusa por toda la córnea y adquirirían una forma dendrítica similar a los queratinocitos iniciales (previo a su diferenciación) y mejoraban la transparencia y aumentaba el grosor corneal¹⁷⁶.
3. Nakamura y cols. emplean la vía intravenosa en ratones. Consiguen detectar CSM en la córnea, pero el número es escaso en el epitelio. Observaron que dos semanas después de la inyección se observaban CSM en la córnea. Igual que en nuestro trabajo, en primer lugar aparecían en la periferia del estroma y después aumentaban en el centro, pero en su caso la mayoría de las CSM se localizaron en la periferia del estroma ¹⁷⁵.

4. Shaofeng Gu y cols. administran las CSM con geles de fibrina en conejos, un método más complejo y más agresivo que la inyección subconjuntival. Encontraron CSM en epitelio tres días después del injerto¹⁷⁴.
5. Jiang y cols. realizan un trasplante de membrana amniótica con CSM en ratones a los que previamente le provocan un daño corneal, consiguen el injerto de algunas CSM y mejorar levemente el daño epitelial. Se trata de una forma de administración más compleja.

En esta Tesis, hemos observado que mediante la inyección subconjuntival de CSM, éstas migran a la córnea antes de 5 días, localizándose en todas las capas de la córnea, desarrollando características típicas del estrato corneal en el que anidan. Demostramos que la inyección local permite el injerto de CSM hasta 40 días después de la inyección, en contra de algunos estudios previos que indican que las CSM no injertan a largo plazo y sólo son detectables pocos días después de la inyección sistémica. Sin embargo, en el trabajo de Nakamura y cols.¹⁷⁵, al igual que en nuestro caso demuestran la existencia de CSM a largo plazo. Así, con fines terapéuticos, la administración local de CSM en los órganos dañados puede facilitar el injerto y la diferenciación.

5.2.2. Migración de las CSM

A través de diferentes vías de señalización las CSM pueden ser movilizadas y diferenciadas a distintas estirpes del tejido conectivo. Estas señales de estrés son inducidas por daño traumático, como fracturas, inflamación, necrosis o tumores. Tanto la quimiotaxis como el microambiente local influyen en la capacidad de migración y diferenciación de las CSM¹⁴⁹.

Se ha estudiado en ratones que las CSM procedentes de MO trasfundidas por vía intravenosa llegan a la córnea (Nakamura y cols). Transcurridas dos semanas de la infusión las células se localizan en la córnea a nivel de limbo esclerocorneal proliferando en el estroma corneal hasta alcanzar un máximo que se mantiene hasta 6 meses después. Las células en primer momento se detectaron en la periferia del estroma y posteriormente en el centro. La mayoría de las células de

Discusión

MO se localizaron en la periferia del estroma, sólo un 7% en el centro del estroma y muy pocas en el epitelio corneal y epitelio conjuntival¹⁷⁵.

En nuestros experimentos las CSM GFP+ humanas infundidas por vía subconjuntival en ratones BALB/C control se localizaron en todas las capas corneales 5 días después de la inyección. Durante los primeros días post-infusión se localizaron en limbo, endotelio, estroma y epitelio y a medida que fue transcurriendo el tiempo se incrementó el número de CSM GFP+ en epitelio, en el centro de la córnea; y fue descendiendo el número de CSM GFP+ en endotelio y estroma. Estos resultados son totalmente concordantes con la teoría de migración de las células madre del limbo esclerocorneal por dos vías: por desplazamiento centrípeto de las células madre desde el limbo hacia el centro de la córnea, y en dirección vertical desde abajo hacia arriba. La teoría X Y Z de Thoft resume el desplazamiento de las células epiteliales en tres fases, siendo X el desplazamiento centrípeto, Y el desplazamiento vertical, y Z la descamación de las células en la superficie²⁹. Coincide además con la forma de migración de las células descrita por Nakamura y cols.

5.2.3. Tratamiento del daño tisular: diferenciación vs fusión

Las CSM tienen muchas propiedades que le permitiría influir en la recuperación del daño tisular:

1. Tienen la capacidad de secretar determinados factores solubles que alteran la funcionalidad del microambiente y de este modo actúan en la reparación del daño¹⁴⁹.
2. Las CSM pueden suprimir algunas funciones de linfocitos T, B y células NK y en algunos casos también afectar a la función de las células dendríticas¹⁵⁰.

3. Producen una variedad de factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas y proteasas que juegan un papel importante en su inmunomodulación y migración¹⁵¹.
4. La capacidad de diferenciación. Las CSM son capaces de diferenciarse a células de tejidos de estirpe mesodérmico. Para confirmar las características de las CSM se debe confirmar su capacidad de diferenciación hacia adipocitos, osteoblastos y condrocitos tanto en cultivos *in vitro*^{12,13} como en modelos *in vivo*¹⁴. Además, se ha puesto de manifiesto también su capacidad para diferenciarse hacia células de cartílago, tendón y músculo. Pero además de la diferenciación a tejidos de origen mesodérmico, algunos grupos han descrito que bajo determinadas condiciones de cultivo, las CSM son capaces de adquirir características morfológicas y/o funcionales de células hepáticas, renales, cardíacas e incluso neurales¹⁴⁵, por lo que se podría hablar de pluripotencialidad de las CSM. Existe numerosa bibliografía que indica que las CSM expandidas *ex vivo* son capaces de diferenciarse hacia células de diferentes estirpes de los tejidos dañados^{9,160-163,165}.

No obstante, existe cierta controversia acerca de la capacidad de injerto, migración y pluripotencialidad de las CSM *in vivo*. En este sentido, parece que las CSM tendrían un efecto beneficioso en pacientes con infarto de miocardio, no por regeneración de los cardiomiocitos, sino por la secreción de proteínas como TNFG6 (Tumor necrosis factor- α -induced protein 6). Se trata de una proteína antiinflamatoria que reduce el tamaño del infarto y mejora la función cardíaca.

Durante el proceso experimental de esta Tesis se detectaron CSM GFP⁺ muy pocos días después de ser administradas subconjuntivalmente (antes de los 5 primeros días). Pero lo que resultó determinante fue que estas CSM adquirieron características morfológicas de células epiteliales, estromales y endoteliales. Además, aparecieron en distintas capas y con diferentes morfologías (desde formas cúbicas a formas aplanadas), dependiendo de su localización en el epitelio. Las CSM GFP⁺ presentaron propiedades ultraestructurales tales como

Discusión

filamentos intermedios, interdigitaciones, hemidesmosomas y desmosomas lo cual apoya la hipótesis de que puedan ejercer un efecto beneficioso/terapéutico debido a la capacidad de migración y diferenciación de las CSM GFP⁺ a células epiteliales.

Por otro lado, el injerto y la diferenciación de CSM también ha sido motivo de crítica debido a la posible fusión entre células del tejido receptor y las CMS infundidas^{180,181}. Datos recientes sugieren que la fusión puede ser es el mecanismo mediante el cual las CSM adquieran características de células epiteliales. Para descartar la fusión entre CSM GFP⁺ humanas y células de la córnea del ratón:

- En primer lugar comprobamos ex vivo mediante Western-blot, la especificidad del anticuerpo anti-GFP y el anticuerpo anti-mitocondria humana, frente a anticuerpos GFP y mitocondria localizados en células mesenquimales humanas. También confirmamos que el anticuerpo anti-MIF era específico de células de ratón.

- En segundo lugar mediante técnicas de inmunohistoquímica de fluorescencia realizamos un doble marcaje MIF-GFP, donde confirmamos que las células GFP⁺ eran MIF⁻, lo que pone de manifiesto el origen humano de las células diferenciadas GFP⁺.

Teniendo en cuenta que las CSM humanas son células GFP⁺, Mitocondria⁺ y MIF⁻, y que estas células adquirirían una morfología acorde al estrato celular en el que se detectaron y que además desarrollaban características ultraestructurales características de ese estrato celular, podemos concluir que: las imágenes de inmunohistoquímica obtenidas no se deben a fusión celular, sino a un verdadero proceso de migración y diferenciación celular.

Este resultado representa un importante hallazgo, que confirma que las CSM pueden inducir un efecto terapéutico, no sólo por las propiedades paracrinas de las CSM, sino también por su capacidad de migración y diferenciación contribuyendo de este modo a la regeneración de tejidos dañados.

5.3. ANIMALES CON EICHo TRATADOS CON INYECCIÓN SUBCONJUNTIVAL DE CSM. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA SUPERFICIE OCULAR.

Youn Oh y cols. han descrito la aplicación de CSM tópicas en córneas dañadas por causticaciones oculares demostrando que tienen efectos antiinflamatorio y antiangiogénico debido a las propiedades paracrinas de las CSM. Observaron que las CSM aplicadas de forma tópica mejoraban clínicamente la transparencia de la córnea y disminuían la neovascularización, aumentaban la expresión de IL-10, TGF- β 1, IL-6 y TSP-1 y se reducía la de IL-2, IFN γ , con la consiguiente disminución de la inflamación¹⁷³.

Liu y cols previamente habían descrito que las CSM umbilicales inyectadas directamente en el estroma corneal en ratones mejoraban la transparencia y aumentaba el grosor corneal. Este efecto está relacionado con la mejoría de la organización de la matriz de colágeno y de la diferenciación local a células estromales¹⁷⁶.

En el diseño experimental de esta tesis hemos podido constatar la capacidad de las CSM tanto para migrar hacia las diferentes capas de la córnea, como para diferenciarse a células endoteliales, estromales y epiteliales, tras su administración mediante inyección subconjuntival en ratones BALB/C control. Al igual que en los ratones BALB/C control, en los ratones a los que se les generó EICHo comprobamos la misma capacidad de migración y diferenciación, sin embargo, el porcentaje de CSM GFP⁺ en la córnea de los ratones con EICHo se incrementó significativamente, hecho que confirma que las CSM pueden migrar y diferenciarse a distintas estirpes celulares al recibir señales inducidas por daño tisular¹⁴⁹. Del mismo modo el daño histológico de la córnea en los ratones con EICHo puede generar señales que favorecen la migración/diferenciación de las CSM GFP⁺ y por tanto el aumento de células GFP⁺/Mitocondria⁺/MIF⁻ en todas las capas de la córnea en ratones con EICHo.

Discusión

Después de la inyección subconjuntival, las CSM se distribuyeron por toda la córnea y adquirieron *in vivo* características tisulares de cada capa: epitelio, estroma y endotelio. Por lo que la inyección subconjuntival de CSM podría ejercer su efecto terapéutico e inmunomodulador por migración y diferenciación celular y de este modo justificar su posible aplicación clínica en el tratamiento de la EICHo.

6. Conclusiones

Conclusiones

De acuerdo con los objetivos planteados en este Trabajo de Tesis Doctoral y como consecuencia de los resultados obtenidos y su discusión, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1. El modelo animal empleado en esta Tesis, se podría establecer como modelo de EICHo, permitiendo profundizar en la patofisiología de la EICHo y evaluar las posibles opciones terapéuticas.
2. La superficie ocular, incluidos la córnea y el limbo esclerocorneal son un órgano diana en la EICH. Hemos descrito signos característicos de EICH en párpados, glándula lagrimal, conjuntiva, córnea y limbo esclerocorneal. Ninguno de los hallazgos macroscópicos, ni histológicos se observaron en los ratones control que habían sido sometidos a irradiación y se les había trasplantado únicamente con células de médula ósea. Por tanto, estos cambios macroscópicos e histológicos no están causados por la irradiación, el estrés, ni ninguno de los factores a los que son sometidos los ratones control, si no que son específicos de la EICH.
3. La inyección subconjuntival de CSM es una forma de administración sencilla y segura, que permite el injerto y migración de las CSM hacia otras estructuras oculares, incluyendo la córnea o el limbo esclerocorneal. Dicha migración es más evidente ante una situación de daño o inflamación como la que se produce en la EICHo a ese nivel.
4. Las CSM tienen capacidad de diferenciación hacia células corneales, lo que unido a su capacidad de migración podría ser de utilidad para el tratamiento de la EICHo [ENREF 29](#).

7. Bibliografía

Bibliografía

1. Perez-Simon JA, Sanchez-Abarca I, Diez-Campelo M, Caballero D, San Miguel J. Chronic graft-versus-host disease: Pathogenesis and clinical management. *Drugs* 2006;66:1041-57.
2. de la Parra-Colin P, Agahan AL, Perez-Simon JA, et al. Dry eye disease in chronic graft-versus-host disease: results from a Spanish retrospective cohort study. *Transplant Proc* 2011;43:1934-8.
3. Mencucci R, Rossi Ferrini C, Bosi A, Volpe R, Guidi S, Salvi G. Ophthalmological aspects in allogeneic bone marrow transplantation: Sjogren-like syndrome in graft-versus-host disease. *Eur J Ophthalmol* 1997;7:13-8.
4. Bray LC, Carey PJ, Proctor SJ, Evans RG, Hamilton PJ. Ocular complications of bone marrow transplantation. *Br J Ophthalmol* 1991;75:611-4.
5. Ogawa Y, Shimmura S, Kuwana M, Yamazaki K, Kawakami Y, Tsubota K. Inflammation and pathogenic fibrosis in human ocular chronic graft versus host disease. *Inflammation and Regeneration* 2008;28:529-36.
6. Benítez del Castillo J, Durán de la Colina, JA., Rodríguez Ares, MT. *Superficie Ocular*. Madrid: Sociedad Española de OFtalmología; 2004.
7. Leite SC, de Castro RS, Alves M, et al. Risk factors and characteristics of ocular complications, and efficacy of autologous serum tears after haematopoietic progenitor cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2006;38:223-7.
8. Couriel D, Carpenter PA, Cutler C, et al. Ancillary therapy and supportive care of chronic graft-versus-host disease: national institutes of health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic Graft-versus-host disease: V. Ancillary Therapy and Supportive Care Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12:375-96.
9. Hou L, Hong T. Stem cells and neurodegenerative diseases. *Sci China C Life Sci* 2008;51:287-94.
10. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004;363:1439-41.
11. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008;371:1579-86.
12. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 1999;181:67-73.
13. Villaron EM, Almeida J, Lopez-Holgado N, et al. Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2004;89:1421-7.
14. Aslan H, Zilberman Y, Kandel L, et al. Osteogenic differentiation of noncultured immunoisolated bone marrow-derived CD105+ cells. *Stem Cells* 2006;24:1728-37.
15. Kaufman PL, Alm A. *Adler's Physiology of the Eye*. 10ª ed. St Louis: Mosby; 2003.
16. Fine BS, Yanoff M. *Ocular Histology*. 2ª ed. Hagerstown: Harper & Row Publisher; 1979.
17. Forrester JV, Dick AD, McMenamin PG, Lee WR. *The eye: Basic Sciences in Practice*. 2ª ed. Philadelphia; 2002.
18. Holland EJ, Mannis MJ. *Ocular Surface Disease*. New-York; 2002.
19. Klyce SD, Beuerman RW. *Structure and function of the cornea*. New York; 1988.
20. Peris C, Menezo JL. *Membrana Amniótica y Superficie Ocular*. 1 ed. Valencia; 2004.
21. Saika S, Ohnishi Y, Ooshima A, Liu CY, Kao WW. Epithelial repair: roles of extracellular matrix. *Cornea* 2002;21:S23-9.
22. Arffa R. *Enfermedades de la cornea*. 4ª ed. Madrid; 1999.
23. Barraquer RI, De Toledo MI, Torres E. *Distrofia y Degeneraciones Corneales*. Barcelona; 2004.
24. Ebato B, Friend J, Thoft RA. Comparison of limbal and peripheral human corneal epithelium in tissue culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29:1533-7.
25. Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 1986;103:49-62.

26. Thoft RA, Wiley LA, Sundarraj N. The multipotential cells of the limbus. *Eye (Lond)* 1989;3 (Pt 2):109-13.
27. Lauweryns B, van den Oord JJ, Missotten L. The transitional zone between limbus and peripheral cornea. An immunohistochemical study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:1991-9.
28. Chang CY, McGhee JJ, Green CR, Sherwin T. Comparison of stem cell properties in cell populations isolated from human central and limbal corneal epithelium. *Cornea* 2011;30:1155-62.
29. Lehrer MS, Sun TT, Lavker RM. Strategies of epithelial repair: modulation of stem cell and transit amplifying cell proliferation. *J Cell Sci* 1998;111 (Pt 19):2867-75.
30. Thoft RA. The role of the limbus in ocular surface maintenance and repair. *Acta Ophthalmol Suppl* 1989;192:91-4.
31. Nichols B, Dawson CR, Togni B. Surface features of the conjunctiva and cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983;24:570-6.
32. Dutton J. *The lacrimal systems*. Philadelphia: WB Saunders; 1994.
33. Duane's. *Ophthalmology*; 2006.
34. Lemke BN. *Anatomy of the ocular adnexa, orbit, and related facial structures*. 2nd ed. St. Louis: Mosby; 1998.
35. Fine B, Yanoff M. 2 ed. *New York; Ocular Histology: A Text and Atlas*.
36. Egeberg J, Jensen OA. The ultrastructure of the acini of the human lacrimal gland. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1969;47:400-10.
37. Prydal JI, Campbell FW. Study of precorneal tear film thickness and structure by interferometry and confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:1996-2005.
38. Prydal JI, Artal P, Woon H, Campbell FW. Study of human precorneal tear film thickness and structure using laser interferometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:2006-11.
39. Pavletic SZ, Khouri IF, Haagenson M, et al. Unrelated donor marrow transplantation for B-cell chronic lymphocytic leukemia after using myeloablative conditioning: results from the Center for International Blood and Marrow Transplant research. *J Clin Oncol* 2005;23:5788-94.
40. Bensinger WI, Buckner CD, Anasetti C, et al. Allogeneic marrow transplantation for multiple myeloma: an analysis of risk factors on outcome. *Blood* 1996;88:2787-93.
41. Martino R, Caballero MD, Perez-Simon JA, et al. Evidence for a graft-versus-leukemia effect after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning in acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2002;100:2243-5.
42. Perez-Simon JA, Martino R, Alegre A, et al. Chronic but not acute graft-versus-host disease improves outcome in multiple myeloma patients after non-myeloablative allogeneic transplantation. *Br J Haematol* 2003;121:104-8.
43. Bacigalupo A. Antithymocyte globulin for prevention of graft-versus-host disease. *Curr Opin Hematol* 2005;12:457-62.
44. Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol* 2007;25:139-70.
45. Kernan NA, Collins NH, Juliano L, Cartagena T, Dupont B, O'Reilly RJ. Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-versus-host disease. *Blood* 1986;68:770-3.
46. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:945-56.
47. Carlens S, Ringden O, Remberger M, et al. Risk factors for chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation: a retrospective single centre analysis. *Bone Marrow Transplant* 1998;22:755-61.
48. Carlens S, Ringden O, Aschan J, et al. Risk factors in bone marrow transplant recipients with leukaemia. Increased relapse risk in patients treated with ciprofloxacin for gut decontamination. *Clin Transplant* 1998;12:84-92.

Bibliografia

49. Baird K, Pavletic SZ. Chronic graft versus host disease. *Curr Opin Hematol* 2006;13:426-35.
50. Perez-Simon JA, Encinas C, Silva F, et al. Prognostic factors of chronic graft-versus-host disease following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: the national institutes health scale plus the type of onset can predict survival rates and the duration of immunosuppressive therapy. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14:1163-71.
51. Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, et al. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 1999;285:412-5.
52. Ferrara JLM, Antin J. The pathophysiology of graft-versus-host disease. En Thomas´Hematopoietic Cell Transplantation. USA; 2004.
53. Toubai T, Sun Y, Reddy P. GVHD pathophysiology: is acute different from chronic? *Best Pract Res Clin Haematol* 2008;21:101-17.
54. Jun JE, Goodnow CC. Scaffolding of antigen receptors for immunogenic versus tolerogenic signaling. *Nat Immunol* 2003;4:1057-64.
55. Hess AD, Bright EC, Thoburn C, Vogelsang GB, Jones RJ, Kennedy MJ. Specificity of effector T lymphocytes in autologous graft-versus-host disease: role of the major histocompatibility complex class II invariant chain peptide. *Blood* 1997;89:2203-9.
56. Miklos DB, Kim HT, Miller KH, et al. Antibody responses to H-Y minor histocompatibility antigens correlate with chronic graft-versus-host disease and disease remission. *Blood* 2005;105:2973-8.
57. Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT, et al. High levels of B-cell activating factor in patients with active chronic graft-versus-host disease. *Clin Cancer Res* 2007;13:6107-14.
58. Vogelsang GB, Lee L, Bensen-Kennedy DM. Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annu Rev Med* 2003;54:29-52.
59. Ferrara JL, Deeg HJ. Graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 1991;324:667-74.
60. Nevo S, Enger C, Swan V, et al. Acute bleeding after allogeneic bone marrow transplantation: association with graft versus host disease and effect on survival. *Transplantation* 1999;67:681-9.
61. Ogawa Y, Shigeto S, Masataka K, Kazuto Y, Yutaka K, Kazuo T. Inflammation and pathogenic fibrosis in human ocular chronic graft versus host disease. *Inflammation and Regeneration* 2008;28:7.
62. Sale GE, Shulman HM, Schubert MM, et al. Oral and ophthalmic pathology of graft versus host disease in man: predictive value of the lip biopsy. *Hum Pathol* 1981;12:1022-30.
63. Abesada-Terk G, Jr., Quintero M, Przepiorka D, Shapiro S. Diminished tear production in BMT recipients not receiving radiation. *Bone Marrow Transplant* 1990;6:151.
64. Kim SK. Update on ocular graft versus host disease. *Curr Opin Ophthalmol* 2006;17:344-8.
65. Rojas B, Cuhna R, Zafirakis P, et al. Cell populations and adhesion molecules expression in conjunctiva before and after bone marrow transplantation. *Exp Eye Res* 2005;81:313-25.
66. Kim SK. Ocular Graft versus Host Disease. St Louis; 2004.
67. Aronni S, Cortes M, Sacchetti M, et al. Upregulation of ICAM-1 expression in the conjunctiva of patients with chronic graft-versus-host disease. *Eur J Ophthalmol* 2006;16:17-23.
68. Ogawa Y, Yamazaki K, Kuwana M, et al. A significant role of stromal fibroblasts in rapidly progressive dry eye in patients with chronic GVHD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:111-9.
69. Ogawa Y, Kuwana M, Yamazaki K, et al. Periductal area as the primary site for T-cell activation in lacrimal gland chronic graft-versus-host disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:1888-96.
70. Anderson BE, McNiff JM, Jain D, Blazar BR, Shlomchik WD, Shlomchik MJ. Distinct roles for donor- and host-derived antigen-presenting cells and costimulatory molecules in murine

chronic graft-versus-host disease: requirements depend on target organ. *Blood* 2005;105:2227-34.

71. Ogawa Y, Kodama H, Kameyama K, et al. Donor fibroblast chimerism in the pathogenic fibrotic lesion of human chronic graft-versus-host disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:4519-27.

72. Jack MK, Jack GM, Sale GE, Shulman HM, Sullivan KM. Ocular manifestations of graft-versus-host disease. *Arch Ophthalmol* 1983;101:1080-4.

73. West RH, Szer J, Pedersen JS. Ocular surface and lacrimal disturbances in chronic graft-versus-host disease: the role of conjunctival biopsy. *Aust N Z J Ophthalmol* 1991;19:187-91.

74. Jabs DA, Hirst LW, Green WR, Tutschka PJ, Santos GW, Beschorner WE. The eye in bone marrow transplantation. II. Histopathology. *Arch Ophthalmol* 1983;101:585-90.

75. Jack MK, Hicks JD. Ocular complications in high-dose chemoradiotherapy and marrow transplantation. *Ann Ophthalmol* 1981;13:709-11.

76. Johnson DA, Jabs DA. The ocular manifestations of graft-versus-host disease. *Int Ophthalmol Clin* 1997;37:119-33.

77. Hassan AS, Clouthier SG, Ferrara JL, et al. Lacrimal gland involvement in graft-versus-host disease: a murine model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:2692-7.

78. Franklin RM, Kenyon KR, Tutschka PJ, Saral R, Green WR, Santos GW. Ocular manifestations of graft-vs-host disease. *Ophthalmology* 1983;90:4-13.

79. Ogawa Y, Okamoto S, Wakui M, et al. Dry eye after haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Ophthalmol* 1999;83:1125-30.

80. Atkinson K. Chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 1990;5:69-82.

81. Hirst LW, Jabs DA, Tutschka PJ, Green WR, Santos GW. The eye in bone marrow transplantation. I. Clinical study. *Arch Ophthalmol* 1983;101:580-4.

82. Anderson NG, Regillo C. Ocular manifestations of graft versus host disease. *Curr Opin Ophthalmol* 2004;15:503-7.

83. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf* 2007;5:75-92.

84. Calonge M, Enriquez-de-Salamanca A, Diebold Y, et al. Dry eye disease as an inflammatory disorder. *Ocul Immunol Inflamm* 2010;18:244-53.

85. Lee SH, Tseng SC. Rose bengal staining and cytologic characteristics associated with lipid tear deficiency. *Am J Ophthalmol* 1997;124:736-50.

86. Donate J, Benitez del Castillo JM, Fernandez C, Garcia Sanchez J. [Validation of a questionnaire for the diagnosis of dry eye]. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2002;77:493-500.

87. Vitali C BS, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, Daniels TE, Fox PC, Fox RI, Kassan SS, Pillemer SR, Talal N, Weisman MH, . Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002;61:554-8.

88. Jabs DA, Wingard J, Green WR, Farmer ER, Vogelsang G, Saral R. The eye in bone marrow transplantation. III. Conjunctival graft-vs-host disease. *Arch Ophthalmol* 1989;107:1343-8.

89. Robinson MR, Lee SS, Rubin BI, et al. Topical corticosteroid therapy for cicatricial conjunctivitis associated with chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 2004;33:1031-5.

90. Ogawa Y, Kuwana M. Dry eye as a major complication associated with chronic graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Cornea* 2003;22:S19-27.

91. Calonge M. The treatment of dry eye. *Surv Ophthalmol* 2001;45 Suppl 2:S227-39.

92. Diaz-Valle D, Arriola-Villalobos P, Garcia-Vidal SE, et al. Effect of lubricating eyedrops on ocular light scattering as a measure of vision quality in patients with dry eye. *J Cataract Refract Surg* 2012;38:1192-7.

Bibliografia

93. Hart DE, Simko M, Harris E. How to produce moisture chamber eyeglasses for the dry eye patient. *J Am Optom Assoc* 1994;65:517-22.
94. Frucht-Pery J, Sagi E, Hemo I, Ever-Hadani P. Efficacy of doxycycline and tetracycline in ocular rosacea. *Am J Ophthalmol* 1993;116:88-92.
95. Cosar CB, Cohen EJ, Rapuano CJ, et al. Tarsorrhaphy: clinical experience from a cornea practice. *Cornea* 2001;20:787-91.
96. Rosenthal P, Cotter JM, Baum J. Treatment of persistent corneal epithelial defect with extended wear of a fluid-ventilated gas-permeable scleral contact lens. *Am J Ophthalmol* 2000;130:33-41.
97. Altan-Yaycioglu R, Gencoglu EA, Akova YA, Dursun D, Cengiz F, Akman A. Silicone versus collagen plugs for treating dry eye: results of a prospective randomized trial including lacrimal scintigraphy. *Am J Ophthalmol* 2005;140:88-93.
98. Hutnik CM, Probst LE. Argon laser punctal therapy versus thermal cautery for the treatment of aqueous deficiency dry eye syndrome. *Can J Ophthalmol* 1998;33:365-72.
99. Punctal occlusion for the dry eye. Three-year revision. *American Academy of Ophthalmology. Ophthalmology* 1997;104:1521-4.
100. Marsh P, Pflugfelder SC. Topical nonpreserved methylprednisolone therapy for keratoconjunctivitis sicca in Sjogren syndrome. *Ophthalmology* 1999;106:811-6.
101. Lelli GJ, Jr., Musch DC, Gupta A, Farjo QA, Nairus TM, Mian SI. Ophthalmic cyclosporine use in ocular GVHD. *Cornea* 2006;25:635-8.
102. Pfau B, Kruse FE, Rohrschneider K, et al. [Comparison between local and systemic administration of cyclosporin A on the effective level in conjunctiva, aqueous humor and serum]. *Ophthalmologie* 1995;92:833-9.
103. Morgan RV, Abrams KL. Topical administration of cyclosporine for treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1991;199:1043-6.
104. Sall K, Stevenson OD, Mundorf TK, Reis BL. Two multicenter, randomized studies of the efficacy and safety of cyclosporine ophthalmic emulsion in moderate to severe dry eye disease. *CsA Phase 3 Study Group. Ophthalmology* 2000;107:631-9.
105. Kunert KS, Tisdale AS, Gipson IK. Goblet cell numbers and epithelial proliferation in the conjunctiva of patients with dry eye syndrome treated with cyclosporine. *Arch Ophthalmol* 2002;120:330-7.
106. Kiang E, Tesavibul N, Yee R, Kellaway J, Przepiorka D. The use of topical cyclosporin A in ocular graft-versus-host-disease. *Bone Marrow Transplant* 1998;22:147-51.
107. Ogawa Y, Okamoto S, Kuwana M, et al. Successful treatment of dry eye in two patients with chronic graft-versus-host disease with systemic administration of FK506 and corticosteroids. *Cornea* 2001;20:430-4.
108. Kojima T, Ishida R, Dogru M, et al. The effect of autologous serum eyedrops in the treatment of severe dry eye disease: a prospective randomized case-control study. *Am J Ophthalmol* 2005;139:242-6.
109. Tsubota K, Satake Y, Shimazaki J. Treatment of severe dry eye. *Lancet* 1996;348:123.
110. Tsubota K, Goto E, Shimmura S, Shimazaki J. Treatment of persistent corneal epithelial defect by autologous serum application. *Ophthalmology* 1999;106:1984-9.
111. Ogawa Y, Okamoto S, Mori T, et al. Autologous serum eye drops for the treatment of severe dry eye in patients with chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 2003;31:579-83.
112. Tananuvat N, Daniell M, Sullivan LJ, et al. Controlled study of the use of autologous serum in dry eye patients. *Cornea* 2001;20:802-6.
113. Murphy PT, Sivakumaran M, Fahy G, Hutchinson RM. Successful use of topical retinoic acid in severe dry eye due to chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 1996;18:641-2.
114. Design and conduct of clinical trials: report of the Clinical Trials Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul Surf* 2007;5:153-62.

115. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood* 1980;56:289-301.
116. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976;4:267-74.
117. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000;100:157-68.
118. Friedenstein AJ, Piatetzky S, Il, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966;16:381-90.
119. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968;6:230-47.
120. Friedenstein AJ. Marrow stromal fibroblasts. *Calcif Tissue Int* 1995;56 Suppl 1:S17.
121. Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG. Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. *Br J Haematol* 1997;97:561-70.
122. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol* 2004;32:414-25.
123. Peng L, Jia Z, Yin X, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev* 2008;17:761-73.
124. Fukumoto T, Sperling JW, Sanyal A, et al. Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11:55-64.
125. De Bari C, Dell'Accio F, Luyten FP. Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis Rheum* 2001;44:85-95.
126. Jankowski RJ, Deasy BM, Huard J. Muscle-derived stem cells. *Gene Ther* 2002;9:642-7.
127. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000;109:235-42.
128. Erices AA, Allers CI, Conget PA, Rojas CV, Minguell JJ. Human cord blood-derived mesenchymal stem cells home and survive in the marrow of immunodeficient mice after systemic infusion. *Cell Transplant* 2003;12:555-61.
129. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 2001;98:2396-402.
130. Pountos I, Giannoudis PV. Biology of mesenchymal stem cells. *Injury* 2005;36 Suppl 3:S8-S12.
131. Chang YJ, Shih DT, Tseng CP, Hsieh TB, Lee DC, Hwang SM. Disparate mesenchyme-lineage tendencies in mesenchymal stem cells from human bone marrow and umbilical cord blood. *Stem Cells* 2006;24:679-85.
132. Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 1991;78:55-62.
133. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
134. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;276:71-4.
135. Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, Niemeyer GP, Baker HJ. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp Hematol* 2002;30:879-86.
136. Sun S, Guo Z, Xiao X, et al. Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method. *Stem Cells* 2003;21:527-35.
137. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 1992;13:69-80.

Bibliografia

138. Kobune M, Kawano Y, Ito Y, et al. Telomerized human multipotent mesenchymal cells can differentiate into hematopoietic and cobblestone area-supporting cells. *Exp Hematol* 2003;31:715-22.
139. Mauney JR, Volloch V, Kaplan DL. Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue engineering applications: current status and future prospects. *Tissue Eng* 2005;11:787-802.
140. Bruder SP, Ricalton NS, Boynton RE, et al. Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. *J Bone Miner Res* 1998;13:655-63.
141. Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, Haynesworth SE. Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone* 1997;21:225-35.
142. Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, Murphy JM, Zaia J. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun* 1999;265:134-9.
143. Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, et al. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci* 2003;10:228-41.
144. Dennis JE, Carbillet JP, Caplan AI, Charbord P. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs* 2002;170:73-82.
145. Jackson L, Jones DR, Scotting P, Sottile V. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *J Postgrad Med* 2007;53:121-7.
146. Pittenger MF, Mosca JD, McIntosh KR. Human mesenchymal stem cells: progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;251:3-11.
147. Isern J, Mendez-Ferrer S. Stem cell interactions in a bone marrow niche. *Curr Osteoporos Rep* 2011;9:210-8.
148. 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;8:315-7.
149. Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem* 2003;89:1235-49.
150. Le Blanc K, Ringden O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:321-34.
151. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol* 2006;36:2566-73.
152. Friedman MS, Long MW, Hankenson KD. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6. *J Cell Biochem* 2006;98:538-54.
153. Post S, Abdallah BM, Bentzon JF, Kassem M. Demonstration of the presence of independent pre-osteoblastic and pre-adipocytic cell populations in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Bone* 2008;43:32-9.
154. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004;22:233-41.
155. Nuttall ME, Gimble JM. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. *Curr Opin Pharmacol* 2004;4:290-4.
156. Taylor SM, Jones PA. Changes in phenotypic expression in embryonic and adult cells treated with 5-azacytidine. *J Cell Physiol* 1982;111:187-94.
157. Lee JH, Kosinski PA, Kemp DM. Contribution of human bone marrow stem cells to individual skeletal myotubes followed by myogenic gene activation. *Exp Cell Res* 2005;307:174-82.
158. Wolfman NM, Hattersley G, Cox K, et al. Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF-beta gene family. *J Clin Invest* 1997;100:321-30.
159. Altman GH, Horan RL, Martin I, et al. Cell differentiation by mechanical stress. *FASEB J* 2002;16:270-2.

160. Caplan AI. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng* 2005;11:1198-211.
161. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000;28:875-84.
162. Horwitz EM. MSC: a coming of age in regenerative medicine. *Cytotherapy* 2006;8:194-5.
163. Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000;18:307-16.
164. Caplan AI. Osteogenesis imperfecta, rehabilitation medicine, fundamental research and mesenchymal stem cells. *Connect Tissue Res* 1995;31:S9-14.
165. Koc ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant* 2002;30:215-22.
166. Centeno CJ, Busse D, Kisiday J, Keohan C, Freeman M, Karli D. Increased knee cartilage volume in degenerative joint disease using percutaneously implanted, autologous mesenchymal stem cells. *Pain Physician* 2008;11:343-53.
167. Minguell JJ, Erices A. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006;231:39-49.
168. Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005;11:389-98.
169. Le Blanc K, Ringden O. Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation. *Curr Opin Immunol* 2006;18:586-91.
170. Carrancio S, Lopez-Holgado N, Sanchez-Guijo FM, et al. Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. *Exp Hematol* 2008;36:1014-21.
171. Yuan J, Horvitz HR. A first insight into the molecular mechanisms of apoptosis. *Cell* 2004;116:S53-6, 1 p following S9.
172. Cooke KR, Kobzik L, Martin TR, et al. An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood* 1996;88:3230-9.
173. Oh JY, Kim MK, Shin MS, et al. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. *Stem Cells* 2008;26:1047-55.
174. Gu S, Xing C, Han J, Tso MO, Hong J. Differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells into corneal epithelial cells in vivo and ex vivo. *Mol Vis* 2009;15:99-107.
175. Nakamura T, Ishikawa F, Sonoda KH, et al. Characterization and distribution of bone marrow-derived cells in mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:497-503.
176. Liu H, Zhang J, Liu CY, et al. Cell therapy of congenital corneal diseases with umbilical mesenchymal stem cells: lumican null mice. *PLoS One* 2010;5:e10707.
177. Sanchez-Abarca LI, Gutierrez-Cosio S, Santamaria C, et al. Immunomodulatory effect of 5-azacytidine (5-azaC): potential role in the transplantation setting. *Blood* 2010;115:107-21.
178. Caballero-Velazquez T, Sanchez-Abarca LI, Gutierrez-Cosio S, et al. The novel combination of sirolimus and bortezomib prevents graft-versus-host disease but maintains the graft-versus-leukemia effect after allogeneic transplantation. *Haematologica* 2012.
179. Shulman HM, Kleiner D, Lee SJ, et al. Histopathologic diagnosis of chronic graft-versus-host disease: National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: II. Pathology Working Group Report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12:31-47.

Bibliografia

180. Togel F, Westenfelder C. Adult bone marrow-derived stem cells for organ regeneration and repair. *Dev Dyn* 2007;236:3321-31.
181. Terada N, Hamazaki T, Oka M, et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002;416:542-5.