

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



**EFFECTO DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES
SOBRE EL SEGMENTO POSTERIOR DEL OJO
EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE
ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA
HUESPED OCULAR**

Cristina Nieto Gómez

DIRECTORES

Emiliano Hernández Galilea

Almudena Velasco Arranz

TUTOR

José Aijón Noguera

Salamanca 2016



D. **Francisco Santiago Lozano Sánchez**, Director del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada **“Efecto de las células mesenquimales sobre el segmento posterior del ojo en un modelo experimental de enfermedad de injerto contra huésped ocular”**, realizada por Dña. **Cristina Nieto Gómez**, para la obtención del título de Doctor por la Universidad de Salamanca, reúne todas las condiciones necesarias para su presentación y defensa ante el Tribunal Calificador.

Para que conste y a petición de la interesada, expido el presente certificado en Salamanca a 2 de diciembre de dos mil dieciseis.

Fdo. Prof. D. Francisco Santiago Lozano Sánchez



D. **Emiliano Hernández Galilea**, Profesor Titular del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca

Dña. **Almudena Velasco Arranz**, Profesora Titular del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca

D. **José Aijón Noguera**; Catedrático del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada **“Efecto de las células mesenquimales sobre el segmento posterior del ojo en un modelo experimental de enfermedad de injerto contra huésped ocular”**, realizada por Dña. **Cristina Nieto Gómez**, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, para su evaluación y obtención del título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que conste donde fuera necesario, expiden y firman el presente certificado en Salamanca a 2 de diciembre de dos mil dieciséis.

Fdo. Prof. Emiliano Hernández Galilea

Fdo. Prof. Almudena Velasco Arranz

Fdo. Prof. José Aijón Noguera

Esta tesis ha sido realizada gracias a la financiación de:

- FIS (PI11/02366)
- FIS (PI12/00939)
- Red de Terapia Celular de la Junta de Castilla y León

A todos aquellos que sienten suyo un trocito de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

A los directores, al **Prof. Dr. D. Emiliano Hernández Galilea**, por sus enseñanzas durante mi formación como oftalmóloga y en este trabajo de investigación, a la **Prof. Dra. D^a Almudena Velasco Arranz** por su ayuda y dedicación y todo el trabajo realizado durante horas para sacar este proyecto adelante. Al tutor, el **Prof. D. José Aijón Noguera** por sus consejos a nivel científico e interés. A los tres les doy las gracias por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo de investigación

A **D. Rafael Martínez-Carrasco Pérez** por toda esa paciencia que ha tenido conmigo para enseñarme a hacer absolutamente todo, porque sin él este Trabajo no hubiese sido posible. Este Trabajo es tan suyo como mio, gracias.

Al **Dr. D. Ignacio Sánchez Abarca** por todo el tiempo y dedicación que ha invertido en este proyecto y sobre todo por la ayuda recibida para la elaboración del modelo animal experimental, necesaria para la realización de este Trabajo.

A la **Prof. Dra. D^a Rebeca Lorenzo Pérez** por su apoyo moral, y por facilitarme la realización de esta tesis con el legado del trabajo realizado por ella años anteriores.

A **D^a Maite Sánchez Montero** por ayudar a hacer que el trabajo de laboratorio sea más fácil y por todas las horas que ha dedicado al corte de las muestras en el criostato.

A **D^a. Elisabeth Martín García** y **Dra. D^a Teresa Lopes Ramos** por la ayuda y las horas compartidas en el animalario.

A la **Prof. Dra. D^a Consuelo del Cañizo Fernández-Roldán** y al **Prof. Dr. D. Fermín Sánchez-Guijo Martín** por la colaboración en este proyecto y las facilidades que nos han proporcionado.

A **mis amigas** por estar siempre ahí, tanto en los buenos como en los malos momentos, y hacerme olvidar durante largos ratos el duro trabajo de esta Tesis.

A **mis padres** por todos los esfuerzos que han realizado para darme la educación que he recibido, porque gracias a ella me puedo sentir orgullosa de cómo soy. Gracias por estar siempre presentes.

“Siempre hay que empezar por algún sitio para llegar a alguna parte”

ABREVIATURAS

BAFF: B-cell activating factor

CCG: Capa de las células ganglionares

CDs: Células dendríticas

CFNO: Capa de fibras del nervio óptico

CNE: Capa nuclear externa

CNI: Capa nuclear interna

CPE: Capa plexiforme externa

CPI: Capa plexiforme interna

CNO: Cabeza del Nervio Óptico

CSM: Células Stem Mesenquimales

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

EICH: Enfermedad de Injerto contra Huésped

EICHo: Enfermedad de Injerto contra Huésped Ocular

EICL: Efecto injerto contra leucemia

EP: Epitelio pigmentario

EPR: Epitelio pigmentario de la Retina

GABA: ácido γ -aminobutírico

GFAP: Proteína glial fibrilar ácida

GFP: Green Fluorescent Protein

GS: Glutamina sintetasa

HLA: Antígenos leucocitarios humanos

IBA-1: Ionized calcium-binding adapter molecular

ICE: Enzima convertidora de interleuquina

MLE: Membrana limitante externa

MLI: Membrana limitante interna

MO: Médula ósea

PBS: Tampón fosfato salino (Phosphate Buffer Saline)

PKC α : Proteína Kinasa C Alpha

SF: Capa de los segmentos externos de los fotorreceptores

TA: Temperatura ambiente

TBI: Total body irradiation

TMO: Trasplante médula ósea

ÍNDICE

RESUMEN	23
----------------------	-----------

SUMMARY	25
----------------------	-----------

1. INTRODUCCIÓN	27
------------------------------	-----------

1.1. Anatomía del ojo.....	30
1.1.1. Retina.....	30
1.1.1.1. Epitelio pigmentario.....	31
1.1.1.2. La retina neurosensorial.....	32
1.1.1.2.1. Tipos celulares de la retina.....	33
1.1.1.2.2. Vascularización de la retina.....	37
1.2. Enfermedad de Injerto Contra Huésped (EICH).....	39
1.2.1. Fisiopatología de la EICH.....	40
1.2.2. Manifestaciones clínicas.....	41
1.3. Complicaciones oculares del trasplante de medula ósea. Enfermedad de Injerto Contra Huesped ocular (EICHo).....	43
1.3.1. Unidad funcional lagrimal.....	44
1.3.2. Segmento posterior.....	46
1.3.3. Criterios diagnósticos de EICHo.....	49
1.3.4. Opciones terapéuticas actuales frente a la EICHo.....	50
1.3.4.1. Lagrimas artificiales sin conservantes.....	51
1.3.4.2. Control del drenaje de la lágrima.....	51
1.3.4.3. Disminución de la inflamación de la superficie ocular.....	51
1.3.4.4. Otros tratamientos.....	52
1.3.4.5. Tratamiento sistémico de la EICHo.....	53
1.4. Las células stem mesenquimales.....	54
1.5. Marcadores inmunohistoquímicos.....	58
1.5.1. Marcadores de células neurales.....	58
1.5.1.1. PAX 6.....	58
1.5.1.2. Proteína Kinasa C Alpha (PKC α).....	58
1.5.2. Marcadores de células gliales.....	59

1.5.2.1. Glutamina sintetasa (GS).....	59
1.5.2.2. Proteína glial fibrilar ácida (GFAP).....	59
1.5.2.3. Iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecular).....	59
1.5.3. Marcador de vascularización.....	60
1.5.3.1. Isolectina B4.....	60
1.5.4. Marcador de apoptosis.....	60
1.5.4.1. Caspasa 3.....	60
1.5.5. Marcador de inflamación.....	61
1.5.5.1. Antígeno TCR/CD3 ⁺	61
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	63
<hr/>	
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	67
<hr/>	
3.1. Material.....	69
3.1.1. Animales de experimentación.....	69
3.1.2. Obtención de CSM para cultivo.....	69
3.1.3. Material no biológico (reactivos).....	69
3.2. Métodos.....	73
3.2.1. Generación del modelo murino de EICHo.....	73
3.2.2. Obtención, aislamiento y expansión de CSM.....	74
3.2.3. Administración de CSM mediante inyección subconjuntival.....	76
3.2.4. Experimentos murinos.....	76
3.2.5. Extracción de los ojos, polo posterior y retina.....	80
3.2.6. Técnicas inmunohistoquímicas.....	80
3.2.6.1. Inmunohistoquímica de fluorescencia.....	81
3.2.7. Medida y análisis de la osmolaridad de la película lagrimal.....	83
3.2.8. Cuantificación y análisis de las células Iba1 ⁺	83
4. RESULTADOS.....	85
<hr/>	
4.1. Animales con EICHo. Análisis clínico de la superficie ocular e inmunohistoquímico de la retina.....	87
4.1.1. Signos clínicos de la EICH y EICHo.....	87

4.1.2. Análisis inmunohistoquímico de la retina de los ratones con EICHo y los tratados con inyección subconjuntival de CSM.....	89
4.1.2.1. PAX6.....	90
4.1.2.2. Proteína Kinasa C Alpha (PKC α).....	90
4.1.2.3. Glutamina sintetasa (GS).....	91
4.1.2.4. Proteína glial fibrilar ácida (GFAP).....	92
4.1.2.5. Iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecular).....	92
4.1.2.6. Isolectina B4.....	97
4.1.2.7. Caspasa 3.....	97
4.1.2.8. Antígeno TCR/CD3 ⁺	98
4.2. Animales tratados con CSM. Análisis de la migración de CSM hacia la retina.....	99
5. ICONOGRAFÍA.....	101
<hr/>	
6. DISCUSIÓN.....	131
<hr/>	
6.1. Animales con EICHo. Análisis clínico de la superficie ocular.....	133
6.2. Animales con EICHo sin tratar y tratados con CSM. Análisis inmunohistoquímico de la retina y la CNO.....	134
6.2.1. Marcadores de inflamación y apoptosis.....	135
6.2.2. Marcadores de células neurales.....	136
6.2.3. Marcadores de células gliales.....	137
6.2.4. Marcador de vascularización.....	141
6.3. Animales tratados con CSM. Análisis de la migración de CSM hacia la retina.....	143
7. CONCLUSIONES.....	145
<hr/>	
8. BIBLIOGRAFÍA.....	149
<hr/>	

RESUMEN

La Enfermedad de Injerto contra Huésped (EICH), es una complicación, que ocurre en pacientes sometidos a un trasplante alogénico. Entre un 40-90% de los pacientes con EICH presentan afectación ocular, caracterizada principalmente por un síndrome de ojo seco severo. En un 12,8% de los pacientes sometidos a trasplantes alogénicos aparecen complicaciones del segmento posterior del ojo. No se conoce con exactitud si son debidas a la EICH ocular (EICHo) o a otras causas, como la irradiación corporal total (TBI) o el uso de ciclosporina. Por otro lado, se ha visto que el uso de células stem mesenquimales (CSM) extraídas de la médula ósea (MO) puede convertirse en una alternativa para el tratamiento de la afectación corneal en la EICHo, pero es importante conocer si estas células se restringen a esta localización o migran hacia la retina, lo que podría ser un factor de riesgo en el tratamiento de la EICHo.

Los objetivos de esta tesis son: evaluar, en un modelo animal de EICHo, la posible afectación del segmento posterior del ojo debido a la EICHo, la TBI o al trasplante de médula ósea y analizar si las CSM humanas inyectadas a nivel subconjuntival son capaces de migrar a la retina y afectar a la misma.

Para generar el modelo animal de EICHo los ratones receptores BALB/C (H2d) fueron sometidos a una TBI y después realizamos un trasplante de médula ósea y esplenocitos de ratones donantes C57BL/6. Caracterizamos y puntuamos las alteraciones macroscópicas oculares. Realizamos un estudio de la osmolaridad de la película lagrimal. Obtuvimos CSM humanas de donantes sanos y se inyectaron subconjuntivalmente en ratones. Por último, realizamos estudios de inmunohistoquímica de fluorescencia en las retinas.

Los animales a los que se les había generado EICHo presentaban signos clínicos de EICH en párpados, conjuntiva y córnea, asociado a un aumento de osmolaridad de la película lagrimal. No se encontraron signos de inflamación y apoptosis a nivel retiniano, ni alteraciones en células neurales, astrocitos y células de Müller, ni vasculares que se puedan atribuir a la EICHo. Sin embargo, existe un aumento de la población de la microglía y un cambio en su morfología que se podría atribuir a los efectos de la TBI y del trasplante de MO. Por otra parte, no hemos localizado migración de CSM hacia la retina tras su inyección por vía subconjuntival.

La inyección subconjuntival de CSM es una opción segura para el tratamiento de la EICHo a nivel de la córnea ya que se restringen a esta localización y no migran hacia la retina. Las alteraciones en las poblaciones neuronales y en la vascularización de la retina en la EICHo son inexistentes o muy leves, como para ser capaces de atraer a las CSM hacia ella.

PALABRAS CLAVE

Enfermedad de Injerto contra Huésped ocular (EICHo), Células Stem Mesenquimales (CSM), Segmento Posterior Ocular, Retina, Microglía, Irradiación Corporal Total (TBI).

SUMMARY

Graft-versus-host disease (GVHD) is an allogeneic hematopoietic stem cell transplantation complication. Ocular involvement has been reported in 40-90% of patients, dry eye is the main complication. Posterior segment ocular disease has been reported in 12, 8% of patients who had been done an hematopoietic stem cell transplantation. The causes of this posterior segment ocular diseases are unknown, the reasons may be ocular graft-versus-host disease (oGVHD), total body irradiation (TBI), and cyclosporine. On the other hand, mesenchymal stem cells (MSC) extracted from bone marrow, could be useful in the treatment of corneal disease because of oGVHD, but it is very important to know if these cells can go toward the retina and make it get ill because of oGVHD treatment.

The aims of this thesis are on the one hand to evaluate, in an oGVHD animal model, the hypothetical posterior segment ocular diseases due to oGVHD, TBI or bone marrow cells transplantation. And, on the other hand to evaluate if the human MSC can go toward the retina after subconjunctival injection.

To generate the oGVHD animal model, BALB/C (H2d) mice received total body irradiation and an intravenous infusion of C57BL/6 allogeneic donor bone marrow cells with splenocytes. The degree of oGVHD was assessed by a scoring system. We studied the tear osmolarity. Human MSC were isolated from bone marrow cells of healthy donors. We administered a subconjunctival injection of MSC in mice. We carried out retinal immunohistochemistry analysis.

All mice that had received donor splenocytes exhibited clinical features of GVHD at lids, conjunctiva and cornea with a tear hyerosmolarity associated. There were not inflammatory signs and apoptosis in the retina. There were not changes in the neural cells, glial cells and vascular variation because of oGVHD. Nevertheless, there was an increment in the number of Iba1⁺ cells and morphology changes due to TBI and bone marrow transplantation. There were not MSC in the retina after subconjunctival injection.

Subconjunctival injection of CSM is a safe option to the cornea in oGVHD treatment because they do not go toward the retina. The changes in the retina are nonexistent or too mild to attract them.

KEYWORDS

Graft-versus-host disease (GVHD), Mesenchymal stem cells (MSC), Posterior Segment Ocular, Retina, Microglia, Total Body Irradiation (TBI).

1. INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Injerto contra Huésped (EICH), es una complicación, que ocurre en pacientes sometidos a un trasplante alogénico y 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 pacientes sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos de donante no emparentado (Pérez-Simón et al, 2006).

Entre un 40-90% de los pacientes con EICH presentan afectación ocular. Dicha patología se caracteriza principalmente por un síndrome de ojo seco severo (Bray et al, 1991; Mencucci et al, 1997; de la Parra-Colin et al, 2011), pudiendo resultar afectados párpados, glándula lagrimal, conjuntiva, córnea, vítreo, coroides, retina y nervio óptico (Kim, 2004). En un 12,8% de los pacientes con EICH ocular (EICHo) aparecen complicaciones del segmento posterior del ojo (Cokuncan et al, 1994). La afectación del polo posterior debido al EICH ocurre con menos frecuencia, pero, si sucede, podría tener un impacto negativo sobre la visión del paciente (Arocker-Mettinger et al, 1991). Forman parte del polo posterior ocular todas las estructuras situadas en posición posterior al iris: cuerpo ciliar, esclera, coroides, retina, vítreo y cabeza del nervio óptico.

No se conocen con exactitud los efectos de la EICHo, que está escasamente estudiada. No obstante, hay diversas investigaciones que describen los efectos de la EICH en la conjuntiva, córnea, limbo esclerocorneal, y glándula lagrimal (Benitez del Castillo et al, 2004; Mencucci et al, 1997; Pérez et al, 2011); pero, apenas se ha descrito la afectación a nivel del polo posterior.

Las opciones terapéuticas frente a la EICHo son escasas e ineficaces (Leite et al, 2006). Actualmente la mayoría se centran en aliviar los síntomas del ojo seco (Couriel et al, 2006) que se produce como consecuencia de la EICHo. Por ello el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas hacia la prevención y el tratamiento de la EICHo son un objetivo esencial. El uso de células madre o *stem mesenquimales* (CSM) se ha propuesto como una buena alternativa para la profilaxis y el tratamiento de la EICHo, debido a sus propiedades inmunológicas y a su capacidad para diferenciarse hacia otros tejidos (Aslan et al, 2016; Conget y Minguell, 1999; Hou et al, 2010; Le Blanc et al, 2004, 2008; Villaron et al, 2004). El grupo de investigación en el que se ha realizado este trabajo ha estudiado los efectos que puede producir la inyección subconjuntival de CSM, en un modelo murino de EICHo, en la córnea y limbo esclerocorneal (Sanchez-Abarca et al, 2015). Sin embargo, resulta pertinente ampliar el análisis del efecto a otras estructuras oculares tras la inyección de CSM, con el fin de delimitar sus posibilidades terapéuticas.

1.1. ANATOMÍA DEL OJO

El globo ocular es una estructura más o menos esférica que pesa, aproximadamente 7,5g, con un volumen de 6,5-7 cm³ y un diámetro anteroposterior de 23,5 mm, encontrándose alojado en la cavidad orbitaria.

Está constituido por tres capas:

- Externa: formada por la esclera y la córnea, que se unen en una zona de transición denominada limbo esclero-corneal.
- Media: denominada úvea. Constituida por una porción posterior o coroides y una anterior formada por el cuerpo ciliar e iris.
- Interna: constituida por la retina.

1.1.1. Retina

La retina está localizada entre la coroides y el vítreo y se extiende desde la cabeza del nervio óptico, donde las fibras nerviosas se agrupan y salen del ojo, hasta la ora serrata. La retina deriva embriológicamente del neuroectodermo. Es el lugar en el que la energía luminosa se transforma en impulso nervioso. Contiene diversos tipos celulares, neuronas y glía, tres de ellos, muy importantes en la función visual: los fotorreceptores, las células bipolares y las células ganglionares. Los fotorreceptores transforman la luz en señal neurológica a través del proceso de fototransducción. Posteriormente, la señal se transmite a las células bipolares que sinaptan con las células ganglionares, cuyos axones la conducen hacia el encéfalo. El resto de células de la retina (células horizontales, amacrinas, e interplexiformes) modifican e integran la señal antes de que esta abandone el ojo.

La retina, en los humanos, puede dividirse topográficamente en varias zonas (Green, 1996):

❖ *Retina central o mácula*

Región especializada situada en el polo posterior, entre las arcadas temporal superior o inferior.

En el centro de la misma se encuentra la mácula lútea, de color amarillento por su riqueza en pigmento xantófilo. A su vez, en el centro de la mácula existe un área deprimida y avascular, la llamada fovea, donde

sólo existen conos y no hay células de asociación, ni ganglionares, ni bipolares. Representa la zona de máxima visión.

❖ **Retina periférica**

Situada entre la retina central y la ora serrata. En esta área los fotorreceptores son principalmente bastones.

❖ **Ora serrata**

Es la terminación anterior de la retina sensorial, a unos 6-7 mm del limbo, un poco por delante del ecuador del globo. Forma una franja festoneada y representa una zona de transición donde la retina sensorial se va transformando en las dos capas de epitelio que forman parte del cuerpo ciliar.

❖ **Papila óptica o cabeza del nervio óptico (CNO)**

Es un área ovalada situada medialmente a 3 mm de la fóvea. Estructuralmente no se trata de retina ya que está constituida por los axones de las células ganglionares en su salida del globo ocular, la membrana limitante interna, y por los grandes vasos centrales de la retina, arteria y vena en su salida del globo ocular. En esta zona no existen fotorreceptores y por eso, su traducción en el campo visual es la llamada mancha ciega.

El color de la papila blanco-rosáceo es debido a la lámina cribosa de la esclera y la red de capilares.

La retina está formada por dos componentes básicos, la retina neurosensorial y el epitelio pigmentario (EP o EPR), entre los que existe un espacio virtual, el espacio subretiniano.

1.1.1.1. Epitelio pigmentario

Está formado por una sola capa de células cúbicas que descansan sobre la coroides. Son células pigmentarias y poseen microvellosidades en la superficie apical relacionadas con los segmentos de los fotorreceptores, aunque no están en contacto directo con ellos (Fawcett, 1995; Geneser, 1994; Ross y Romrell, 2001). Sus funciones son:

- a) Absorción de la luz que atraviesa la retina, para impedir la reflexión y el brillo.
- b) Forma parte de la barrera hematorretiniana, por lo que contribuye a aislar a la retina de las sustancias transportadas por la sangre.

- c) Participa en la restauración de la fotosensibilidad en respuesta a la luz puesto que sintetiza pigmentos visuales.
- d) Sus células fagocitan parte de los segmentos de los fotorreceptores, participando en su recambio.

1.1.1.2. La retina neurosensorial

La retina neurosensorial se estructura en diversas capas (Fawcett, 1995; Geneser, 1994; Ross y Romrell, 2001) en la que se alternan capas de somas neuronales con capas de conexiones sinápticas. Desde la región más escleral (externa) a la más vitreal (o interna) se estructura de la siguiente forma:

- A) **Capa de los segmentos externos de los fotorreceptores (SF).** Formada por los segmentos externos de conos y bastones
- B) **Membrana limitante externa (MLE).** Constituida por los procesos esclerales de las células de Müller.
- C) **Capa nuclear externa (CNE).** Formada por los cuerpos celulares de las células fotosensibles, conos y bastones.
- D) **Capa plexiforme externa (CPE)** Contiene el neuropilo integrado por las prolongaciones de los fotorreceptores y de las células horizontales y bipolares que contactan con ellas. También la forman parte de los procesos esclerales de las células de Müller.
- E) **Capa nuclear interna (CNI).** Formada por los somas de las neuronas horizontales, bipolares, amacrinas y células de Müller.
- F) **Capa plexiforme interna (CPI).** Compuesta por las dendritas de las células amacrinas y ganglionares, los axones de la bipolares y por parte de los procesos vitreales de las células de Müller.
- G) **Capa de las células ganglionares (CCG).** En la que se encuentran los somas de las células que le dan nombre y células amacrinas desplazadas.
- H) **Capa de fibras del nervio óptico (CFNO).** Formada por los axones de las células ganglionares, que se dirigen hacia el encéfalo. Estos axones abandonan la retina por la CNO y forman el nervio óptico.

- I) **Membrana limitante interna (MLI).** Constituida por los procesos vitreales o pies de las células de Müller y por astrocitos.

La luz entra al ojo atravesando la córnea, la cámara anterior, el cristalino y el humor vítreo hasta llegar a la retina. Una vez aquí debe atravesar todas las capas de la retina antes de interactuar con la región donde se encuentran los elementos fotosensibles: los segmentos externos de conos y bastones (Fawcett, 1995; Geneser, 1994; Ross y Romrell, 2001).

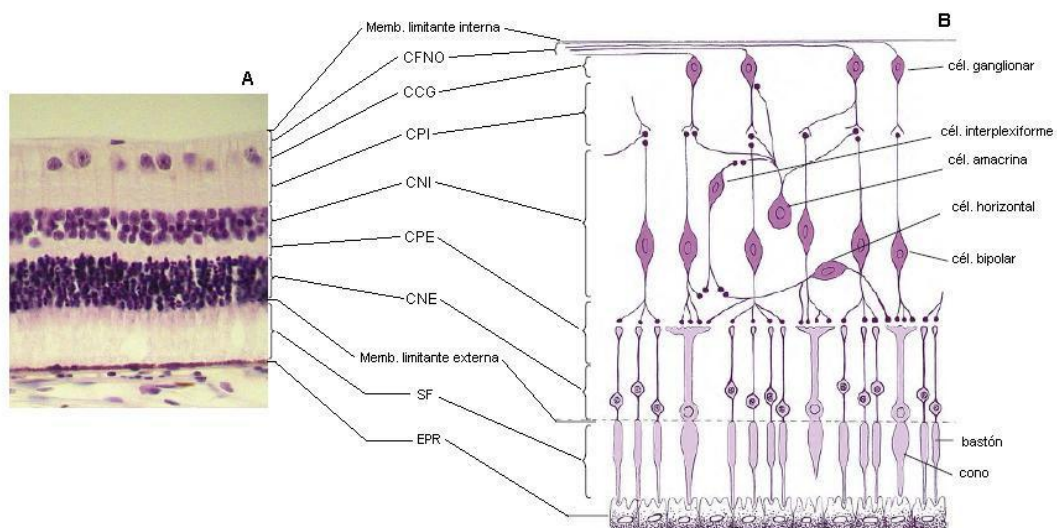


Figura 1: **A.** Sección transversal de retina, tinción con hematoxilina y eosina. **B.** Esquema de la disposición de las capas de la retina. CFNO, capa de las fibras del nervio óptico; CCG, capa de células ganglionares; CPI, capa plexiforme interna; CNI, capa nuclear interna; CPE, capa plexiforme externa; CNE, capa nuclear externa, SF, capa de los segmentos externos de los fotorreceptores; EPR, epitelio pigmentario de la retina (Remington, 2011).

1.1.1.2.1. Tipos celulares de la retina

I. Neuronas

Existen dos tipos de **fotorreceptores** en la retina de vertebrados, conos y bastones. En los ratones, los conos constituyen solamente el 1% de los fotorreceptores (Jeon et al, 1998), estando formada principalmente por bastones, lo que origina una visión en condiciones escotópicas (visión en oscuridad) (Fawcett, 1995; Djamgoz et al, 1998; Geneser, 1994; Kolb et al, 2000; Ross y Romrell, 2001).

Los bastones tienen como pigmento visual la rodopsina. Son muy sensibles y por eso son responsables de la visión nocturna. Sus segmentos externos son estructuras delgadas con forma de bastón. Sus segmentos internos y externos alcanzan el EP y los cuerpos celulares ocupan la CNE por debajo de los somas de los conos.

Los conos contienen diferentes opsinas que presentan su máxima sensibilidad en diferentes zonas del espectro electromagnético, por lo que son responsables de la visión en color. Estos conos de diferente “color” tienen conexiones con células bipolares, horizontales y ganglionares específicas de ese “color”. Su segmento externo tiene forma cónica y están situados en una fila de somas justo por debajo de la MLE.

Las **células horizontales** son células de asociación. En vertebrados existen varias subpoblaciones, según tengan o no axón y contacten con diferentes tipos de fotorreceptores. En la retina del ratón se han encontrado células horizontales de un solo tipo, el B, al que pertenecen aquellas que tienen axón (Peichl y González-Soriano, 1994). Forman sinapsis recíprocas con los fotorreceptores y producen una sumación espacial de los estímulos, colaborando en la organización centro/periferia de los campos receptores de las células ganglionares (Djamgoz et al, 1998; Fawcett, 1995; Geneser, 1994; Kolb et al, 2000; Ross y Romrell, 2001).

Las **células bipolares** conectan con los terminales axónicos de los fotorreceptores y transmiten las señales hacia las células ganglionares. Presentan un cuerpo celular situado en la CNI desde donde parte una dendrita que se dirige hacia la CPE, donde contacta con las terminaciones sinápticas de los fotorreceptores, y un axón, más largo que termina a nivel de la CPI, haciendo sinapsis con las dendritas de las células ganglionares. Las células bipolares son de cono y de bastón, según contacten con un tipo u otro de fotorreceptor (Djamgoz et al, 1998; Fawcett, 1995; Geneser, 1994; Kolb et al, 2000; Ross y Romrell, 2001).

Las **células amacrinas** son también células de asociación y presentan un cuerpo celular situado en la CNI y unas prolongaciones que se extienden por la CPI. No reciben conexiones directas de los fotorreceptores,

sino sólo de células bipolares y de otras células amacrinas, estableciendo a su vez conexiones con células ganglionares y retroalimentando también a las células bipolares. Por tanto, forman la vía de asociación lateral a nivel de la CPI. Algunos tipos de amacrinas presentan largos procesos, que pueden actuar como verdaderos axones aunque estos permanecen siempre dentro de la retina. Sin embargo, la mayoría de las células amacrinas no tienen axón. Existen de 20 a 30 tipos en la retina de mamíferos pero todas ellas pertenecen a dos grandes subdivisiones (Djamgoz et al, 1998; Fawcett, 1995; Geneser, 1994; Haverkamp y Wäsle, 2000; Kolb et al, 2000; Ross y Romrell, 2001; Strettoi y Masland, 1996):

- *Células glicinérgicas*; que son células amacrinas con un campo dendrítico pequeño (Menger et al, 1998; Pourcho y Goebel, 1985).
- *Células gabaérgicas*, que tienen el campo amplio, y además de ser inmunorreactivas para GABA (ácido γ -aminobutírico), lo son también para otras sustancias neuroactivas como algunos péptidos y marcadores colinérgicos y dopaminérgicos (Jeon et al, 1998; Versaux-Botteri et al, 1984; Wulle y Schinitzer, 1989).

Las **células interplexiformes** son consideradas por la mayoría de los autores un tipo especial de célula amacrina. Son células de asociación, con cuerpo celular situado en la CNI y unas prolongaciones que se extienden por ambas capas plexiformes conectándolas (Kolb y West, 1977; Kolb et al, 1992). En la CPI reciben aferencias de células amacrinas y hacen sinapsis con algunos axones de células bipolares de cono y de bastón. En la CPE realizan numerosas sinapsis con el soma y las dendritas de las células bipolares de bastón (Kolb y West, 1997; Nakamura et al, 1980). En la retina de mamíferos se han descrito dos tipos de células interplexiformes, las dopaminérgicas y las gabaérgicas (Fawcett, 1995; Geneser, 1994; Kolb et al, 2000; Ross y Romrell, 2001).

Las **células ganglionares** poseen un soma voluminoso y ramificaciones dendríticas que forman sinapsis a nivel de la CPI con las terminaciones de las células bipolares y amacrinas. Sus axones forman la CFNO y sólo se mielinizan en el nervio óptico, ya fuera del globo ocular. Estos axones llegan hasta el cuerpo geniculado lateral, donde ocurre la siguiente sinapsis de la vía visual. Son las únicas células de proyección de la retina (Fawcett, 1995; Geneser, 1994; Kolb et al., 2000; Ross y Romrell, 2001).

II. Células gliales

Las **células de Müller** tienen localizado su núcleo en la CNI y sus procesos se extienden verticalmente a través de todas las capas de la retina. La MLE constituye una barrera entre el espacio subretiniano y la retina neural y está formada por uniones adherentes entre estas células de Müller y los segmentos internos de los fotorreceptores. La MLI se sitúa a nivel de la superficie de contacto entre la retina y el humor vítreo, actuando como barrera de difusión entre ambos. Está formada por uniones de los procesos terminales vitreales (pies) de las células de Müller, que se extienden lateralmente y forman una lamina basal (Djamgoz et al, 1998; Kolb et al, 2000; Reichenbach et al, 1995).

Las células de Müller tienen funciones imprescindibles para la viabilidad y supervivencia neuronal de la retina (Djamgoz et al, 1998; Kolb et al, 2000; Newman y Reichenbach, 1996; Reichenbach et al, 1995).

Los **astrocitos** se encuentran casi exclusivamente a nivel de la CFNO y de la CNO (Bussow, 1980; Lillo et al, 2002). Se caracterizan por su cuerpo celular aplanado y una serie de procesos radiales que están llenos de filamentos intermedios. Su morfología cambia según su localización, de manera que pasan de ser muy elongados en la retina central a una morfología estrellada en la retina periférica.

Los astrocitos forman tubos gliales a través de los cuales discurren los axones de las células ganglionares y también están relacionados con los vasos sanguíneos (Triviño et al, 1997). Además, tienen funciones relacionadas con la nutrición del resto de tipos celulares y la homeostasis iónica de la retina (Höllander et al, 1991; Kolb et al, 2000).

La **microglía** deriva del mesodermo circundante a las vesículas ópticas, por lo que estrictamente no son células neurogliales. Penetran en la retina coincidiendo con los precursores de los vasos sanguíneos en estadios tempranos del desarrollo embrionario (Boya et al, 1979). Estas células pueden encontrarse a cualquier nivel de la retina, aunque principalmente se localizan en el límite de la CNE y la CPE, en la CNI y en la CPI. Son células multipolares, con pequeños cuerpos celulares y unos procesos irregulares y cortos (Kolb et al, 2000; Río-Hortega, 1932). La microglía puede encontrarse en un estado de reposo o quiescente, en estado reactivo en respuesta a una lesión y por último, otro en el que la célula se encuentra activa y además presenta capacidad fagocítica (Kettenmann et al, 2011). La microglía quiescente se

caracteriza, morfológicamente, por poseer un cuerpo celular pequeño del que emergen varias prolongaciones profusamente ramificadas (Kreutzberg et al, 1996). La microglía reactiva presenta un aumento del tamaño de su soma y un engrosamiento y retracción de sus prolongaciones celulares, además de una disminución del número de las ramificaciones más distales (Beynon y Walker, 2012). Por último, la microglía activa o fagocítica se caracteriza por tener un soma redondeado y una gran retracción o ausencia de sus prolongaciones, conociéndose como morfología ameboide (Beynon y Walker, 2012; Kolb et al, 2000; Thanos, 1991; Thanos y Thiel, 1991; Thanos y Richter, 1993).

1.1.1.2.2. Vascularización de la retina

La vascularización de la retina se distribuye en dos capas:

- a) Las capas **más externas** de la retina reciben nutrición de la capa más profunda de la coroides o coriocapilar; los metabolitos difunden a través de la membrana de Bruch's y el EPR dentro de la retina.
- b) Las capas **internas** se nutren de la arteria central de la retina, que penetra por el nervio óptico y se divide en una rama superior y otra inferior, cada una de las cuales se divide en una nasal y otra temporal. Los vasos están localizados en la capa de fibras nerviosas debajo de la MLI. Existen dos redes de capilares. La profunda está en la CNI cerca de la CPE y la superficial en la capa de células ganglionares. La retina externa a la CPE es avascular. La CPE recibe aporte sanguíneo a través de los nutrientes de ambas regiones, de la retina y la coroides.

Los capilares de la retina están formados por una sola capa de endotelio no fenestrado, rodeado de una membrana basal y una capa de pericitos (Cogan y Kubawara, 1967; Fine y Yanoff, 1979). Los pericitos son células que rodean a la membrana basal con función contráctil que facilitan el flujo sanguíneo (Chakravarthy y Gardiner, 1999). Las células endoteliales forman parte de la barrera hematorretiniana ya que están unidas por uniones estrechas.

La arteria cilioretiniana es un vaso inconstante que entra por el disco óptico pero tiene su origen en la vascularización coroidea, existe en un 15-20% de la población y nutre el área macular (Hayrech, 1963).

La barrera hematorretiniana es una estructura que limita el intercambio de moléculas entre el torrente sanguíneo y el parénquima nervioso, en función de su tamaño y polaridad (Abbott et al, 2006). Los

principales elementos que la componen son: las células endoteliales capilares, los pericitos perivasculares y los pies terminales o podocitos de los astrocitos (Ballabh et al, 2004).

Es fundamental que la luz que entra en el ojo tenga pocos obstáculos para llegar al segmento externo de los fotorreceptores. En este aspecto la barrera hematorretiniana es muy importante, ya que ayuda a que el plasma sanguíneo no impida la entrada de luz en el ojo. Hay varios factores a tener en cuenta para que esto funcione: la coriocapilar tiene vasos fenestrados que permiten salir a las moléculas grandes de estos, y estas moléculas pueden pasar con facilidad por la membrana de Bruch. Por otro lado las uniones estrechas del epitelio pigmentario de la retina impiden que dichas moléculas se muevan dentro del tejido retiniano.

1.2. ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA HUÉSPED (EICH)

La EICH, es una complicación que puede ocurrir después de un trasplante de médula ósea. Con esta enfermedad, las células del donante recientemente trasplantadas atacan el cuerpo del receptor del trasplante (Besinger et al, 1996).

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 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 (Besinger et al, 1996; Pavletic et al, 2005). En concreto, la EICH, debida 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 series de pacientes sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos de donante no emparentado (Pérez-Simón et al, 2006). Sin embargo, precisamente en este reconocimiento y efecto citotóxico de los linfocitos del donante frente a antígenos extraños reside también el efecto curativo del trasplante alogénico. Los linfocitos desencadenan una respuesta inmune frente al tejido hematopoyético y las células tumorales del paciente, provocando el efecto injerto contra leucemia (EICL) (Martino et al, 2002; Pérez-Simon et al, 2003).

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) de la EICH (perjudicial). En la práctica, los procedimientos más eficaces en la prevención de la 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 postrasplante (Bacigalupo, 2005).

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 incluían afectación de piel, tracto gastrointestinal e hígado.

En 1966, Billingham formuló los tres requerimientos necesarios para el desarrollo de la 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 dichas 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 (Kernan et al, 1986; Welniak et al, 2007).

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 media de aparición de 6-9 meses post-trasplante (Filipovich et al., 2005). 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 supervivencia (Baird et al, 2006; Carlens et al, 1998a, b ; Pérez-Simon et al, 2008).

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) (Ferrara y Antin, 2004; Shlomchik et al, 1999) . 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 periférica. La unión del linfocito T al antígeno se realiza a través de su receptor TCR/CD3 (Jun y Goodnow, 2003; Toubai et al, 2008).

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 negativa (Hess et al, 1997). Por tanto, la EICH crónica depende de la persistencia de linfocitos T que no desarrollan una respuesta inmunotolerante 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-Y 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 crónica, lo que pone de relieve la importancia de la respuesta inmune humoral en su aparición. (Miklos et al, 2005; Sarantopoulos et al, 2007).

Además de la alteración en la función tímica, se aprecian alteraciones funcionales a nivel periférico que pueden contribuir al desarrollo de la EICH crónica. En este sentido, tanto las células dendríticas (CDs) del donante como las del receptor pueden contribuir al desarrollo de la EICH crónica 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 crónica (Shlomchik et al, 1999).

1.2.2. Manifestaciones clínicas

La **EICH aguda** es una entidad clínico-patológica caracterizada por la aparición de erupciones cutáneas, alteraciones intestinales y hepáticas (Ferrara y Antin, 2004; Filipovich et al, 2005).

- 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 epidérmica (Vogelsang et al, 2003).

- 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 (Filipovich et al, 2005). 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 íleo (Ferrara y Deeg, 1991). La presencia de hemorragia digestiva como resultado de la ulceración de la mucosa se asocia con un mal pronóstico (Nevo et al, 1999).

La **EICH crónica** puede afectar prácticamente a cualquier órgano (Tabla 1), remediando diversas enfermedades autoinmunes (Filipovich et al, 2005; Pérez-Simón et al, 2006).

CRITERIOS:	DIAGNÓSTICO	CARACTERÍSTICAS	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 hiperqueratóticas (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 endoscopia o contraste)		Insuficiencia pancreática exocrina	Anorexia, náuseas, vómitos, diarrea, pérdida de peso, retraso del crecimiento (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
Hematológico e inmunológico				Trombocitopenia, eosinofilia, linfopenia, hipo/hipergammaglobulinemia, autoanticuerpos

Tabla 1: Signos y síntomas de la EICH crónica.

1.3. COMPLICACIONES OCULARES DEL TRASPLANTE DE MÉDULA ÓSEA. EICH OCULAR.

La Enfermedad de Injerto contra Huésped Ocular (EICHo) se caracteriza fundamentalmente por la aparición de 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 ceguera (Ogawa et al, 2008). Sin embargo, no se conoce con exactitud la fisiopatología de la EICHo debido a su complejidad y a los numerosos factores implicados (Abesada-Terk et al, 1990; Bray et al, 1991; Mencucci et al, 1997; Sale et al, 1981). La mayoría de los estudios demuestran la afectación de la conjuntiva y la glándula lagrimal, pero las alteraciones que ocurren en el segmento posterior están escasamente descritas (Kim, 2006; Rojas et al, 2005).

Entre el 40 y el 90% de los pacientes con EICH pueden presentar lesiones oculares (Bray et al, 1991; Franklin et al, 1983). Pueden aparecer en pacientes con EICH agudo o crónica, siendo más frecuente en los pacientes con EICH crónica, en los cuales las manifestaciones son más graves (Franklin et al, 1983; Jack et al, 1983).

Se ha descrito afectación ocular prácticamente a todos los niveles, pudiendo resultar afectados los párpados, la glándula lagrimal, la conjuntiva, la córnea, el vítreo, la coroides, la retina y el nervio óptico. La glándula lagrimal y la superficie ocular son las que con más frecuencia resultan afectadas (Kim, 2004). La afectación del polo posterior es muy rara y por ello está poco estudiada.

Las manifestaciones oculares de la fase aguda incluyen la aparición de una conjuntivitis pseudomembranosa, úlceras conjuntivales, queratitis filiforme y pérdida del epitelio corneal (Arocker-Mettinger et al, 1991).

Otras manifestaciones menos frecuentes descritas son la escleritis posterior con desprendimiento coroideo (Mimura et al, 2012) y glaucoma secundario, infecciones por virus del herpes simple (Arocker-Mettinger et al, 1991), hemorragias subconjuntivales, vítreas y retinianas, y dermatitis del borde de los párpados (Ogawa et al, 1999).

Las complicaciones tardías (Atkinson, 1990; Mencucci et al, 1997) descritas en pacientes con EICH son la dermatitis del borde de los párpados, ectropión, entropión, madarosis, triquiasis, cambios pigmentarios de

los párpados, la queratoconjuntivitis seca, la disfunción de las glándulas de Meibomio, complicaciones corneales secundarias a queratoconjuntivitis seca, úlceras corneales y perforación (Ogawa et al, 1999). También se ha descrito la aparición de cataratas y, más raramente, manifestaciones en el segmento posterior como retinopatía isquémica o microvasculopática isquémica (Coskuncan et al, 1994), edema macular quístico, desprendimientos seroso (Atkinson et al, 1990), coriorretinopatía serosa central (Cheng et al, 2002), retinopatía proliferativa, afectación del nervio óptico, úvea, escleritis posterior (Kim et al, 2002; Strouthidis et al, 2003) e incluso afectación de la órbita (Atkinson, 2002; Mencucci et al, 1997).

1.3.1. Unidad funcional lagrimal

La unidad funcional lagrimal está formada por la glándula lagrimal, la superficie ocular (córnea, limbo esclero-corneal, conjuntiva y glándulas de Meibomio), y el borde de los párpados. Su función es proteger el ojo de las agresiones externas y mantener una adecuada transparencia corneal.

En la bibliografía disponible hemos encontrado pocos trabajos que profundicen en la fisiopatología de la EICHo.

A nivel conjuntival, Rojas y cols. demostraron que 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 seca existía un cociente CD4/CD8 mayor que en los pacientes que no tenían queratoconjuntivitis seca (Rojas et al, 2005).

Por otra parte, Aronni y cols. demostraron una disminución de la densidad de células caliciformes en la conjuntiva de pacientes con EICH que se correlacionaba directamente con una disminución del test de Schirmer y un aumento en la expresión de los marcadores inflamatorios (Aronni et al, 2006).

En la glándula lagrimal en pacientes con EICH la característica histológica principal es una marcada fibrosis en el intersticio y un notable incremento de fibroblastos, con una moderada infiltración linfocítica (Ogawa et al, 2001a). Los linfocitos, predominantemente T, se localizan en el área periductal de la

glándula lagrimal (Ogawa et al, 2003b). Estos hallazgos son más frecuentes en los pacientes con EICHo severa que en los casos moderados. 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 linfocítica (Ogawa et al, 2008). La presencia de linfocitos T CD3⁺ (primordialmente CD4⁺, CD8⁺), células T CD154⁺ activadas, mononucleares y fibroblastos que expresan HLA-DR y CD54 y otras moléculas coestimuladoras en la región periductal, lleva a considerar esta región como un sitio de activación de células T en los pacientes con EICH crónico (Ogawa et al, 2003b).

El Síndrome de ojo seco es la complicación más frecuente de la EICH, apareciendo en el 40-76% de los pacientes (de la Parra-Colin et al, 2011; Franklin et al, 1983; Hirst et al, 1983). El ojo seco es una enfermedad multifactorial de la película lagrimal y la superficie ocular que cursa con molestias, trastorno visual e inestabilidad de la película lagrimal, con un posible daño de la superficie ocular. Se acompaña de aumento de la osmolaridad de la película lagrimal e inflamación de la superficie ocular. El ojo seco representa una alteración de la unidad funcional lagrimal y los nervios motores y sensitivos que la conectan. (*Dry Eye WorkShop (DEWS)*, 2007).

La afectación inicial de la superficie ocular en la EICHo se caracteriza por la aparición de una conjuntivitis no infecciosa pseudomembranosa, que puede acompañarse de alteración del epitelio corneal (Jabs et al, 1989; de la Parra-Colin et al, 2011). Por otra parte, es relativamente frecuente en la EICH crónica la cicatrización conjuntival (Robinson et al, 2004).

La disfunción de la glándula lagrimal aparece principalmente en la EICH crónica, pero también puede existir en los casos agudos (Jack et al, 1983). Un test de Schirmer menor o igual a 5 mm o la aparición de queratoconjuntivitis seca con un Schirmer de 6 a 10 mm, es suficiente para hacer el diagnóstico de EICH ocular en pacientes con EICH que afecta al menos a un órgano (Filipovich et al, 2005).

En la mayoría de los pacientes la queratoconjuntivitis seca persiste a pesar de la resolución de la EICH (Hirst et al, 1983; Menucci et al, 1997).

Otros procesos inflamatorios que se han observado en la EICHo, son la queratoconjuntivitis límbica superior y la epiescleritis (Kim, 2006), e incluso uveítis anteriores (Hettinga et al, 2007).

En lo que se refiere a **la córnea y limbo esclero-corneal**, Pérez et al. encontraron, en el análisis anatomopatológico, atrofia y pérdida de continuidad del epitelio corneal con infiltrado inflamatorio en

todos los estratos del epitelio y vacuolización en los estratos basal e intermedio, asociando aparición de cuerpos apoptóticos con infiltrado leucocitario. También se objetivaron linfocitos rodeando células en apoptosis. Además en el estroma corneal se observó un edema difuso con neovascularización e infiltrado inflamatorio. El endotelio corneal era normal. A nivel del limbo esclero-corneal los cambios eran idénticos a los de la córnea. En consecuencia a los hallazgos plantearon que los daños celulares a nivel límbico, podrían suponer una disminución de la población de las células madre localizadas a dicho nivel, por lo que primero aparecerían defectos epiteliales persistentes y por otro lado, podría darse una invasión conjuntival de la córnea con el resultado de un proceso inflamatorio crónico, pérdida de la transparencia corneal y úlceras corneales.

Estos cambios anatomopatológicos que se producen a nivel corneal pueden ser la causa de la queratitis severa que aparece en los pacientes con EICH (Pérez et al, 2011).

1.3.2. Segmento posterior

La afectación del segmento posterior debido al EICH no está claramente demostrada, pero si existiese, el impacto sobre la función visual del paciente sería más deteriorante.

En la literatura está brevemente descrita la afectación del polo posterior tras trasplante de médula ósea (TMO) y no se conoce con exactitud cuáles de estas afectaciones son debidas a la EICHo, y cuáles a la aplicación de irradiación total corporal (Brown et al, 1982) previa al trasplante o al uso de fármacos para la prevención de la EICH, tales como, ciclosporina (Vogelsang et al, 1988) y corticoides (Anderson, 2004; Arockar-Mettinger et al, 1991; Coskuncan et al, 1994; Nassiri et al, 2013).

Entre las complicaciones que pueden ocurrir tras TMO, encontramos: escleritis posterior, desprendimiento coroideo, coriorretinopatía serosa central, desprendimiento seroso de retina, hemorragias en la retina, microvasculopatía retiniana isquémica, edema de papila, vitritis y complicaciones infecciosas (Coskuncan et al, 1994; Nassar et al, 2013).

En un estudio realizado por Coskuncan y cols. se demuestra que el 12,8% de los 397 pacientes incluidos en el estudio desarrollan complicaciones del segmento posterior del ojo tras TMO (Coskuncan et al, 1994). Las alteraciones que describen, las subdividen en: hemorrágicas, retinopatía microvascular, edema del nervio óptico, infecciones y otras.

En cuanto a las **complicaciones hemorrágicas**, en un 3,5% de los pacientes sometidos a un TMO describen la existencia de hemorragia vítrea y hemorragias pre e intrarretinianas de gran tamaño. Estos pacientes tenían asociado una pancitopenia, y al resolverse esta, las hemorragias desaparecían sin dejar ninguna secuela, por lo que no se pueden relacionar con la EICH (Coskuncan et al, 1994).

La **microvasculopatía retiniana oclusiva, isquémica o retinopatía por TMO** consiste en la aparición de exudados algodinosos en la retina, acompañados de una disminución de la agudeza visual. Esta alteración aparece aproximadamente en el 4.3% de los pacientes sometidos a un TMO (Coskuncan et al, 1994). Los exudados algodinosos son lesiones blanquecinas localizadas en la capa de fibras nerviosas de la retina que son debidas a una isquemia localizada. El intervalo medio de aparición de los exudados algodinosos en pacientes con EICH es de 150 días post-trasplante. En el estudio de Coskuncan y cols. , se analizan los factores de riesgo implicados en la aparición de estos exudados, teniendo en cuenta, la EICH crónica, la EICH aguda, la irradiación total corporal, el uso de busulfán y de ciclosporina A, resultando sólo estadísticamente significativa la relación de la retinopatía con la EICH crónica (Coskuncan et al, 1994). Por otra parte, otros autores relacionan estos exudados con la irradiación corporal total (Brown et al, 1982) y el uso de ciclosporina (Bernauer et al, 1991; Gratwohl et al, 1983). Por su parte, Jabs y cols. realizaron un estudio histopatológico en ojos de pacientes sometidos a TMO, y de los 40 pacientes del estudio 28 habían sido diagnosticados de EICH. En los ojos de los pacientes con EICH encontraron alteraciones histopatológicas en la córnea, conjuntiva, coroides y glándula lagrimal. En lo que se refiere a la afectación del polo posterior, los pacientes con EICH aguda y crónica presentaban exudados algodinosos en la retina, e histopatológicamente tenían un infiltrado coroideo infrecuente, que consistía en la presencia de grandes eosinófilos que recordaban a histiocitos y que ocasionalmente se acompañaban de infiltrado celular de inflamación crónica. Este infiltrado se puede relacionar directamente con afectación coroidea por EICH (Jabs et al, 1983).

El **edema de papila** es la tumefacción de la papila o CNO, debido a una edematización de las fibras nerviosas de la retina.

Está documentada la existencia de edema de papila en los pacientes con EICH. Sin embargo, se desconoce su etiología y fisiopatología. No se sabe si está relacionado con la EICH o es debido a la neurotoxicidad producida por la Ciclosporina A que se usa para el tratamiento y la prevención de esta enfermedad (Avery et al, 1991; Nassiri et al, 2013;). También pudiera ser secundaria a otras patologías, tal y como describen Coskuncan y cols. en su estudio en el que relacionan el edema de papila del 2,8% de pacientes con EICH con otras patologías concomitantes como hemorragia cerebral, meningitis y leucemia (Coskuncan et al, 1994).

La **escleritis posterior** es una inflamación de la esclera posterior a la ora serrata. Se manifiesta con disminución de la agudeza visual y a veces, los pacientes refieren dolor o molestia. Puede ir acompañada de escleritis anterior, y afectación de otras estructuras oculares produciendo signos tales como quemosis conjuntival, proptosis, inflamación palpebral, retracción palpebral, o limitación de los movimientos oculares. En la exploración del fondo de ojo podrían visualizarse pliegues coroideos, masas subretinianas, neuritis óptica y edema macular, causados por la extensión de la inflamación escleral y coroidea, y desprendimiento ciliocoroideo o desprendimiento retiniano seroso (Mimura et al, 2012). La aparición de escleritis posterior en pacientes con EICH es rara; sin embargo, algunos autores han demostrado que la escleritis posterior se debe a la EICH (Kim et al, 2002; Strouthidis et al, 2003).

El **desprendimiento coroideo** es la separación de la coroides de la retina por acumulación de fluido en el espacio supracoroideo, que se manifiesta como una pérdida de visión o del campo visual. Es una entidad patológica de etiología multifactorial, que también puede ir asociada a otras patologías como la escleritis posterior. Como complicación del desprendimiento puede producirse una rotación anterior de los procesos ciliares debido a la efusión ciliocoroidea, dando lugar a un aumento de la presión intraocular secundaria a un cierre del ángulo esclero-corneal. Están documentados casos documentados de pacientes con desprendimiento coroideo que se ha relacionado directamente con el EICH (Mimura et al, 2012; Nassar et

al, 2013), algunos de ellos asociados a glaucoma tal y como describe Mimura y cols. , en un paciente en el que relaciona el desprendimiento coroideo con la EICH (Mimura et al, 2012).

En la **coriorretinopatía serosa central** tiene lugar un desprendimiento seroso de la retina neurosensorial, produciendo disminución de la agudeza visual, pérdidas parciales del campo visual y metamorfopsias.

Cuando la coriorretinopatía serosa central se origina en el contexto de la EICH su etiología no está bien aclarada. Algunos autores relacionan esta con el uso de corticoides en el tratamiento o la prevención de la EICH (Karashima et al, 2002). Sin embargo, otros autores han demostrado que en la EICH se produce un aumento de la permeabilidad de los vasos coroideos, lo que daría lugar a una exudación que induce la aparición de la coriorretinopatía serosa central, de la misma forma que esta exudación se podría relacionar con los desprendimientos de retina serosos descritos asociados a EICH (Chen et al, 2012; Strouthidis et al, 2003).

El término **vitritis** hace referencia al acúmulo de células inflamatorias en el vítreo, que puede ser un proceso primario del vítreo en la EICH. Sheidow y cols. publicaron un caso clínico de un paciente con disminución de agudeza visual, en el que se observa una vitritis y una uveítis anterior. En la biopsia vítrea realizada encontraron un infiltrado linfocitario acompañado de algunas células multinucleadas, no había presencia de neutrófilos, y algunos de los histiocitos tenían vacuolas citoplasmáticas. Los resultados de las serologías fueron negativos. Descartaron la vitritis infecciosa y el linfoma, por lo que la vitritis la relacionaron directamente con la EICH (Sheidow et al, 2004).

1.3.3. Criterios diagnósticos de EICHo

Recientemente el *International Chronic Ocular Graft-vs-Host-Disease Consensus Group* ha descrito un sistema de graduación de la severidad de la EICHo basado en el test de Schirmer, la tinción corneal con fluoresceína, la hiperemia conjuntival y el *Ocular Surface Disease Index* (OSDI), cuestionario que indica el grado de sintomatología ocular. Cada uno de estos ítems recibe una puntuación (Tabla 2). Cuando la

EICH sistémica está presente, una puntuación de 0 a 3 indica ausencia EICHo, de 4 a 5 indica EICHo probable, y una puntuación mayor de 6 indica EICHo definitiva (Ogawa et al, 2013).

Grado severidad	Test Schirmer (mm)	Tinción corneal con fluoresceína	OSDI (puntos)	Grado de hiperemia conjuntival (puntos)
0	>15	0	<13	0
0	>15	0	<13	0
1	11-15	1	13-22	1
2	6-10	2	23-32	2
3	<6	3	>32	

Tabla 2: Sistema de graduación de severidad de la EICHo

En esta clasificación no se tiene en cuenta la osmolaridad de la película lagrimal, que es un factor muy importante a tener en cuenta a considerar en el ojo seco. Schargus y cols. realizan un estudio en el que clasifican a pacientes con EICHo según el sistema de gradación del *International Chronic Ocular Graft-vs-Host-Disease Consensus Group* y lo comparan con las osmolaridad de la película lagrimal, encontrando mayor osmolaridad a mayor severidad de la EICHo, por lo que proponen que la osmolaridad de la película lagrimal se incluya como criterio diagnóstico de la EICHo (Schargus et al, 2015).

1.3.4. Opciones terapéuticas actuales frente a 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 (Couriel et al, 2006; Leite et al, 2006).

El tratamiento de primera línea es el empleo frecuente de lágrimas artificiales y esteroides tópicos sin conservantes, asociado a la oclusión del punto lagrimal, que conseguirían controlar un porcentaje significativo de los casos (Calonge, 2001; Ogawa et al, 2003b).

1.3.4.1. 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 visual (Diaz-Valle et al, 2012). Cuando las aplicaciones deben ser muy frecuentes, se pueden emplear lágrimas artificiales más viscosas que permanecen más tiempo en la superficie ocular (Franklin et al, 1983). En la pauta de administración se puede usar una combinación de lágrimas en función de la actividad o necesidades del paciente.

1.3.4.2. 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 reabre (Altan-Yaycioglu et al, 2005; Hutnik y Probst, 1998).

1.3.4.3. Disminución de la inflamación de la superficie ocular

La actuación sobre la inflamación de la superficie ocular es otra consideración terapéutica en la EICHo.

- Los corticoides tópicos, preferiblemente sin conservantes, son el tratamiento de primera línea en las exacerbaciones de la EICHo. Los corticoides tópicos también son beneficiosos en los casos de conjuntivitis cicatricial y la formación de pseudomembranas (Robinson et al, 2004). 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 utilización de ciclosporina A tópica al 1%, como modulador de la respuesta inmune a nivel de la superficie ocular, ha sido eficaz y segura (Lelli et al, 2006). No se conoce bien el mecanismo de acción de la ciclosporina en la función lagrimal, pero se ha comprobado que 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 lágrima (Morgan y Abrams, 1991). Después de 6 meses de tratamiento disminuye la respuesta inmune y las citocinas inflamatorias y aumenta la cantidad de células caliciformes en la conjuntiva (Kunert et al, 2002). Está indicada en el control de cuadros de ojo seco severo con componente inflamatorio de base y en los casos en los que existe una ectasia con necrosis estromal (*melting* corneal) asociada (Kiang et al, 1998).

- Se ha sugerido el empleo de tacrólimus tópico y corticoides como tratamiento de mantenimiento como alternativa terapéutica eficaz y bien tolerada (Ogawa et al, 2001b).

- El suero autólogo también disminuye la inflamación de la superficie ocular (Kojima et al, 2005). 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 (Ogawa et al, 2003b). 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. El suero autólogo es además un fármaco seguro, con pocos efectos adversos. Tiene un efecto bacteriostático porque contiene agentes antimicrobianos como inmunoglobulinas y lisozimas (Tananuvat et al, 2001).

- En casos refractarios al tratamiento inicial, se ha propuesto el tratamiento con ácido retinoico tópico como eficaz para revertir la queratinización conjuntival (Murphy et al, 1996).

1.3.4.4. Otros tratamientos

- Se debe evitar la exposición al viento sin gafas y los ambientes con poca humedad; y si es necesario proteger los ojos con gafas cerradas (Hart et al, 1994).

- Los pacientes deben realizar medidas de higiene palpebral para obtener un correcto funcionamiento de las glándulas de Meibomio productoras de la capa lipídica de la película lagrimal responsable de evitar la evaporación de la lágrima.

- La doxiciclina oral se emplea en el tratamiento de la blefaritis con meibomitis para estabilizar la capa lipídica de la película lagrimal, además tiene propiedades antiinflamatorias (Frucht-Pery et al, 1993).

- En los casos refractarios al tratamiento, puede ser necesario realizar una cirugía para disminuir la exposición de la superficie ocular mediante una tarsorrafia (Cosar et al, 2001).

- 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 severos (Rosenthal et al, 2000).

1.3.4.5. 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, solos o en asociación (Ogawa et al, 2001b).

El tratamiento oral con tetraciclinas se justifica porque, además de su efecto antibiótico, tienen propiedades antiinflamatorias y antiangiogénicas (Frucht-Pery et al, 1993).

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 inflamación (DEWS 2. 2007b).

Es importante tener en cuenta en la evaluación de la respuesta al tratamiento en pacientes con EICHo crónica, a efectos de reducir o suspender el tratamiento inmunosupresor, que las manifestaciones de EICHo y el síndrome de ojo seco no se relacionan necesariamente 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 (Pérez-Simón et al, 2011).

1.4. LAS CÉLULAS STEM MESENQUIMALES

Las células stem mesenquimales (CSM) humanas se consideran células madre multipotentes, que en cultivo constituyen una población heterogénea de células de morfología fusiforme con aspecto fibroblástico (Castro-Malaspina et al, 1980; Friedenstein et al, 1976) en diferentes estadios de maduración. Se ha demostrado su potencialidad para diferenciarse hacia diversas estirpes celulares, así como las condiciones y factores de crecimiento adecuados para llevar a término dicha diferenciación.

Se pueden denominar de diversas formas: células del estroma medular, unidades formadoras de colonias fibroblásticas (CFU-F), células *stem* del estroma medular o células precursoras del estroma. En este trabajo las denominaremos CSM.

Las CSM se localizan principalmente en la médula ósea (MO) y tienen capacidad para dar origen a diversos tipos celulares, como los fibroblastos medulares o células reticulares, adipocitos, osteoblastos y condrocitos (Flores-Figueroa et al, 2006).

La frecuencia de las CSM en la fracción mononuclear de la MO es de 1 de cada $10^4 - 10^5$ células (Friedenstein et al, 1966; 1968; Friedenstein, 1995).

La CSM, además de en la MO, se han aislado en cartílago (Peng et al, 2008), periostio (Fukumoto et al, 2003) y líquido sinovial (de Bari et al, 2001), tejido adiposo (Peng et al, 2008), músculo y tendones (Jankowsky et al, 2002), placenta, vasos y sangre de cordón umbilical (Erices et al, 2000). Existen diferencias entre las CSM obtenidas de distintos tejidos, en este trabajo de Tesis nos referiremos únicamente a CSM obtenidas de aspirado de MO.

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 cumplir (Dominici et al, 2006):

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.

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. Las 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 los 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 inmune (Baddoo et al, 2003).

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 afectar también a la función de las células dendríticas (Le Blanc y Ringden, 2006). Además, producen una variedad de factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas y proteasas que juegan un papel importante en su inmunomodulación y migración (Uccelli et al, 2006).

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* (Conget y Minguell, 1999) como en modelos *in vivo* (Aslan et al, 2006).

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 neurales (Jackson et al, 2002; Recio et al, 2011). 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.

Las CSM también han sido utilizadas para mejorar el injerto de otras células, puesto que mejoran los resultados del trasplante alogénico promoviendo el injerto de las células hematopoyéticas y disminuyendo la enfermedad de injerto contra huésped al suprimir la activación de células T (Maitra et al, 2004).

Otra alternativa importante en la terapia celular es utilizar las CSM para promover la angiogénesis. Al menos dos mecanismos han sido propuestos para explicar esto: por un lado, hay evidencia experimental que indica la generación e incorporación de células endoteliales derivadas de las células troncales mesenquimales a los capilares en formación, y por otra parte, un nuevo estudio ha demostrado que las CSM también promueven la angiogénesis a través de la secreción de citocinas como VEGF-A, FGF-2, IL-6, PlGF y MCP-1 (Kinnaird et al, 2004).

La gran capacidad multipotencial y la plasticidad de las células troncales mesenquimales las hacen un objetivo perfecto para su aplicación clínica. Su uso clínico, presente y futuro, abarca un gran número de enfermedades del sistema nervioso, esquelético, cardíaco, hematopoyético y ocular, entre otros muchos.

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.

En el ámbito de la oftalmología, las terapias regenerativas utilizando CSM se han propuesto también como tratamiento en patologías del segmento anterior del ojo, como la insuficiencia limbar, que conllevan a una incapacidad de las células madre del limbo para mantener la integridad del epitelio corneal originando defectos epiteliales persistentes, opacificación estromal y neovascularización (Nakamura et al, 2005; Nieto-Miguel et al, 2013). También han sido utilizadas de forma experimental como una posible opción terapéutica de la EICHO (Sanchez-Abarca et al, 2015). Existen varios estudios que plantean las CSM como terapia en diversas patologías del segmento posterior, para frenar la pérdida de células ganglionares de la retina que se produce en el glaucoma (Yu et al, 2006); e incluso para el tratamiento de enfermedades de la

retina (Ng et al, 2014), como la degeneración macular asociada a la edad (Nadri et al, 2013), retinopatía diabética (Yang et al, 2010), la retinosis pigmentaria (Huo et al, 2010) y las distrofias de retina de ratones *knockout* para rodopsina (Arnhold et al, 2007).

1.5. MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS

Conocemos como marcadores a aquellas proteínas presentes en determinados tipos celulares que, puestas de manifiesto mediante a unión de anticuerpos específicos, nos permiten identificarlos.

1.5.1. Marcadores de células neurales

1.5.1.1. PAX6

Pax6 es un regulador clave del proceso de desarrollo del ojo, es necesario para la proliferación y la diferenciación de los 7 tipos celulares retinianos básicos. Si se interrumpe la expresión de Pax6 en la retina en desarrollo solo se diferenciarían las células amacrinas (Marquardt et al, 2001).

En la retina del animal adulto hay poblaciones celulares que expresan la proteína Pax6 en la CCG y en la CNI. Son células ganglionares, amacrinas y horizontales y la localización de la proteína es nuclear (Hitchcock et al, 1996; Martin et al, 1992; Püschel et al, 1992).

1.5.1.2. Proteína Kinasa C Alpha (PKC α)

La PKC α pertenece a la familia de las proteínas kinasa, que tienen por función fosforilar otras proteínas (Alberts et al, 1996). Esta proteína es dependiente de Ca²⁺ y se activa por la combinación de este ión con diacilglicerol y fosfatidilserina. En la retina de ratón la PKC α está presente en las células bipolares de bastón, aunque también son positivas algunas células amacrinas (Grünert y Martín, 1991).

La proteína PKC α se localiza a lo largo de toda la célula bipolar de bastón. Así, los anticuerpos frente a la proteína PKC α tiñen el soma de la neurona situado en la CNI y sus terminales axónicos en la CPE y dendríticos en la CPI. Este marcador pone de manifiesto los terminales sinápticos de las células bipolares que contactan con los bastones, lo que permite evaluar indirectamente la función sináptica de los fotorreceptores.

1.5.2. Marcadores de células gliales

1.5.2.1. Glutamina Sintetasa (GS)

Esta enzima cataliza la amidación del glutamato a glutamina. En la retina, las únicas células que la expresan son las células de Müller (Lewis et al, 1988). Si utilizamos un anticuerpo frente a esta proteína podemos marcarlas en toda su extensión (Haverkamp y Wäsle, 2000). Los somas de las células de Müller se localizan en la CNI y presentan dos prolongaciones, una de ellas cruza la CPE y la CNE y termina formando la MLE y la otra recorre la CPI y la CCG y termina en un extremo engrosado que se denomina pie y que forma la MLI.

1.5.2.2. Proteína glial fibrilar ácida (GFAP)

Esta proteína fue descrita por primera vez como el principal componente de los filamentos intermedios de los astrocitos (Eng et al, 1971). Desde entonces se ha encontrado tanto en astrocitos como en endimocitos y glía radial (Dahl y Bignami, 1973).

En la retina adulta existen astrocitos inmunorreactivos a GFAP asociados a los vasos de la CFNO, en el NO los procesos de los astrocitos se colocan paralelamente entre si y al eje del NO. Son también positivos los pies vitreales de las células de Müller (Karim et al, 1996).

1.5.2.3. Iba-1 (Ionized calcium binding adapter molecular)

El anticuerpo contra Iba-1 es un excelente marcador de microglía. Iba-1 es una proteína de membrana en las células del linaje de los monocitos/macrófagos, por lo que marca las células dendríticas, los macrófagos y la microglía, pero no las neuronas, los astrocitos ni la oligodendroglía, a nivel cerebral y de la retina (Fu y Srevatan, 2011). En el cerebro y en la retina, la expresión de Iba-1 aumenta notablemente en la microglía reactiva en condiciones patológicas (Sasaki et al, 2001).

La microglía está presente en todas las capas de la retina, siendo su localización más frecuente en las capas más internas, las CFNO, CPI, Y CPE, pero también puede localizarse en la CCG, siendo menos frecuente su localización en la CNI, y casi ausente en la CNE (Fu y Srevatan, 2011).

1.5.3. Marcador de vascularización

1.5.3.1. Isolectina B4

Las lectinas son proteínas que se unen a los azúcares de las membranas celulares (Boya et al, 1991). La isolectina B4 de *Griffonia simplicifolia* reconoce la galactosa, presente en las células endoteliales de los vasos sanguíneos de la retina y en algunos residuos azucarados de las membranas de microglía (Boya et al, 1991).

1.5.4. Marcador de apoptosis

1.5.4.1. Caspasa 3

Las caspasas son un grupo de proteínas pertenecientes al grupo de las cisteín-proteasas, caracterizadas por presentar un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas (Yuan y Horvitz, 2004). 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) (Yuan y Horvitz, 2004). Las caspasas son mediadores esenciales de los procesos de apoptosis, la muerte celular programada. Otras caspasas 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 la enzima convertidora de interleuquina (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, que incluirían degradación del ADN, condensación de cromatina y desintegración de la membrana plasmática (Yuan y Horvitz, 2004). Gracias a estas características, la tinción de la Caspasa 3 sirve para confirmar la existencia de apoptosis.

1.5.5. Marcador de inflamación

1.5.5.1. Antígeno TCR/CD3⁺

El antígeno TCR/CD3⁺ tiene un papel muy importante en el desarrollo de la EICH (Ogawa et al. 2003b). 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) (Ferrara y Antin, 2004; Sholmchik et al, 1999).

Ese complejo de membrana TCR:CD3 es requerido para la interacción estable de las células T con células presentadoras de antígenos. La unión del linfocito T al antígeno a través de su receptor TCR/CD3 conduce a la activación de diversas tirosinaquinasas, PKC, PLC y a la activación de calcineurina.

Se han encontrado linfocitos T CD3⁺ a nivel de la conjuntiva (Rojas et al, 2005) y en la región periductal de la glándula lagrimal (Ogawa et al, 2003b) en casos de EICHo.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La EICH es la mayor causa de morbilidad y mortalidad entre los pacientes sometidos a trasplante de células madre hematopoyéticas (Pérez-Simón et al, 2006). El ojo es un órgano diana de la EICH. En el 40-90% de los pacientes con EICH existe afectación ocular (Bray et al, 1991; Menucci et al, 1997; de la Parra-Colin et al, 2011).

La afectación del polo posterior del ojo debido al EICH no está claramente establecida, pero si existiese podría tener un impacto muy significativo sobre la visión del paciente.

En la literatura está brevemente descrita la afectación del polo posterior tras trasplante de médula ósea (TMO) y no se conoce con exactitud cuáles de estas afectaciones son debidas a la EICH ocular, y cuáles a la aplicación de irradiación corporal total previa al trasplante o al uso de fármacos para la prevención de la EICH tales como ciclosporina y corticoides.

Entre las complicaciones que pueden ocurrir tras TMO, se han descrito escleritis posterior, desprendimiento coroideo, coriorretinopatía serosa central, desprendimiento seroso de retina, hemorragias en la retina, microvasculopatía retiniana isquémica, edema de papila, vitritis y complicaciones infecciosas (Cokuskan et al, 1994).

Disponer de un modelo animal de EICH ocular nos permitiría profundizar en la fisiopatología de la enfermedad, estudiar si existe una afectación de las estructuras oculares que componen el polo posterior y evaluar *in vivo* como influyen las estrategias terapéuticas como es la utilización de células estromales humanas.

Por otra parte, existen trabajos de investigación, realizados con anterioridad, en los que utilizan la administración de CSM como potencial tratamiento de la afectación corneal de la EICH, lo que nos lleva a preguntarnos si podría existir una migración o algún tipo de efecto derivado de la administración de dichas células sobre el polo posterior ocular.

La hipótesis de partida de este trabajo plantea la existencia de afectación de la retina y la CNO debidas a la EICHo en un modelo murino experimental de EICH y la migración hacia la retina de las CSM administradas subconjuntivalmente en dicho modelo.

Los objetivos concretos de este trabajo son:

1. Evaluar las alteraciones del polo posterior ocular en ratones BALB/C a los que previamente se les genera una EICHo.
2. Evaluar las alteraciones del polo posterior ocular en ratones BALB/C sometidos a la irradiación y trasplante de médula ósea necesario previo a la generación de la EICHo.
3. Evaluar la presencia de CSM humanas, a nivel del polo posterior ocular, y las consecuencias que éstas puedan generar en dicha localización, tras la inyección subconjuntival de CSM en ratones BALB/C a los que previamente se les genera una EICH

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 Servicio de Experimentación animal de la Universidad de Salamanca (SEA), 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 SEA.

3.1.2. Obtención de células stem mesenquimales para cultivo

Para la realización del presente trabajo, se utilizaron CSM humanas procedentes de donantes de MO humana. 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™ (Becton Dickinson Bioscience, San José, CA, EEUU), ModFit LT for Mac (Verity Software House, Inc, ME, EEUU) e Infinicyt 1.1 (Cytognos S.L. Salamanca, España).

- Para la realización de los cultivos de CSM se empleó: el medio Dulbecco's Modified Eagle's medium low glucosa (DMEM, Gibco Invitrogen Paisely, UK), suplementado con Suero Bovino Fetal al 10% (SBF: BioWhittaker® Lonza, Verviers, Belgium) y Penicilina 104U/ml / Estreptomicina 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.

- Para la obtención de muestras para el procesamiento histológico se usó el tampón salino PBS 1X de GIBCO® Invitrogen™ (Paisely, UK), PBS 0.1M, pH 7.4 , el medio OCT®. El criostato CM 3050 S Leica y HM 560 Micron, portas superfrost (Thermo Scientific, Braunschweig, Alemania).

- 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 %, PBS 0.1M, pH 7.4, medio protector de fluorescencia ProLong® Gold antifading y los siguientes anticuerpos y lectinas: (Tablas 3, 4 y 5):

Antígeno	Anticuerpo	Casa comercial	Dilución de uso
PAX-6	Ig G de conejo	Abcam®	1:500
PKCα	Ig G de conejo	Sigma-Aldrich®	1:1000
GS	Ig G de ratón	Merk-Millipore®	1:500
GFAP	Ig G de ratón	Sigma-Aldrich®	1:500
IBA-1	Ig G de conejo	Sigma-Aldrich®	(1:500)
TCR/CD3+	Ig G de conejo	Dako®	1:200
CASPASA 3	Ig G de conejo	Abcam®	1:500
GFP	Ig G de cabra	Abcam®	(1:500)

Tabla 3: Anticuerpos primarios

LECTINA	Conjugada con	Casa Comercial	Dilución
Isolectina B4	Cy2	Sigma-Aldrich®	1:80

Tabla 4: Lectina

Antígeno	Anticuerpo	Conjugado con	Casa comercial	Dilución
IgG de conejo	Ig G de burro	Cy3	Jackson	(1:250)
IgG de ratón	Ig G de burro	Cy2	Jackson	(1:750)

Tabla 5: Anticuerpos secundarios de inmunofluorescencia

- El análisis de imagen se realizó con un microscopio Olympus PROVIS AX70. Las imágenes de microscopía confocal fueron obtenidas con el Microscopio Zeiss Axio Observer Z1 equipado con dispositivo Apotome2 ®. Las imágenes tomadas se procesaron para el contaje celular con el programa Image J y se trataron con el programa Adobe Photoshop® CS4. El análisis estadístico se realizó por el programa SPSS.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Generación del modelo murino 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 edad 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 (Cooke et al, 1996).

Para la obtención de las 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 5×10^6 células del bazo en 300µl 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 0,5mL y una aguja montada de 27x1/2"-0,4x12mm, una infusión de 5×10^6 células de MO asociado o no a 5×10^6 esplenocitos de ratones donantes en 300 μ 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) humana. La extracción de la MO se realizó en todos los casos bajo anestesia local, por punción de la cresta ilíaca o el 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.

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 Minguell171 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 suplementado con suero bovino fetal al 10% y penicilina/estreptomicina 1% (Carrancio et al, 2008). Una vez mezclados los componentes, se filtraron con 0.22 μ m, 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 10^6 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 de GFP (Green Fluorescent Protein) 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. La GFP es una proteína que emite bioluminiscencia en la zona verde del espectro visible, el gen 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.

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.

Para el modelo animal se inyectaron subconjuntivalmente 2×10^5 CSM resuspendidas en 20µl de suero fisiológico en cada ojo sometido a estudio.

3.2.3. Administración de CSM mediante inyección subconjuntival

Las CSM GFP⁺ humanas se inyectaron subconjuntivalmente tanto en ratones sanos control como en ratones trasplantados con MO y esplenocitos. En todos los casos los animales se sedaron con isoflurano al 1.5%. A continuación se instiló una gota de anestésico doble® 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 2×10^5 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 2mm del limbo esclerocorneal aproximadamente (Fig. 2) . La inyección se realizó bajo un estereomicroscopio (Leica MZ6).

Posteriormente se instiló en el saco conjuntival betadine tópico ® (povidona yodada) diluido al 50% con suero fisiológico y ciprofloxacino tópico para evitar posibles infecciones.

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

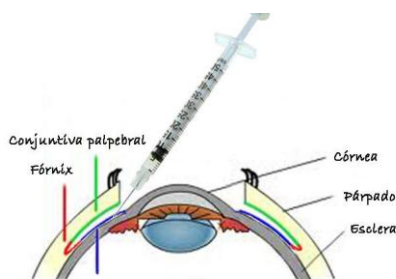


Figura 2: Esquema de la inyección subconjuntival de CSM

3.2.4. 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 0-2 (Cooke et al, 1996).

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 y no existía blefarospasmo; la valoración de 1 se corresponde con una de las siguientes características: pérdida de pelo periocular, costras o enrojecimiento del borde palpebral o 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 características.

Se establecieron 2 grupos de estudio.

Grupo 1: Animales con EICHo. Análisis clínico de la superficie ocular y estudio inmunohistoquímico del polo posterior ocular.

Con el propósito de generar un modelo de EICHo murino, se establecieron 4 subgrupos experimentales (Tabla 6). Cada uno de los experimentos se repitió un mínimo de 2 veces por grupo.

- *Controles*

- *TBI* (total body irradiation): Control de irradiación (850cGy).

- *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 5x106	BAZO 5x106	Número de ratones
<i>Control</i>	–	–	–	6
<i>TBI</i>	<i>SI</i>	-	-	6
<i>MO</i>	<i>SI</i>	<i>SI</i>	-	6
<i>EICHo</i>	<i>SI</i>	<i>SI</i>	<i>SI</i>	6

Tabla 6: Subgrupos de ratones con EICH, realizado con el fin de analizar el efecto de la EICHo en la superficie ocular y el polo posterior ocular.

Todos los ratones trasplantados con MO y con MO y esplenocitos se mantuvieron durante 30 días en el animalario. Transcurrido ese tiempo se sacrificaron e inmediatamente después se realizó la enucleación de los ojos para el estudio inmunohistoquímico. De los TBI, 3 de ellos se sacrificaron a los 10 días, los otros 3 fallecieron alrededor del día 14.

Grupo 2: Animales con EICHo tratados con inyección subconjuntival de CSM. Análisis inmunohistoquímico del polo posterior ocular.

Con el propósito de valorar el efecto de una inyección subconjuntival de 2×10^5 CSM GFP⁺ en el polo posterior de los ratones BALB/C a los que previamente se les había generado EICHo, trabajamos con 4 subgrupos experimentales (Tabla 7). Los experimentos se repitieron como mínimo 2 veces por grupo.

- *Controles*

- *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 en el ojo derecho.

Grupo	850cGy	MO 5x106	BAZO 5x106	Número de ratones
<i>Control</i>	--	--	--	6
<i>TBI</i>	<i>SI</i>	--	--	6
<i>MO</i>	<i>SI</i>	<i>SI</i>	-	6
<i>EICHo +CSM</i>	<i>SI</i>	<i>SI</i>	<i>SI</i>	10

Tabla 7: Subgrupos 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 6 ratones BALB/C a los que previamente se les había generado EICHo, 10 días después del trasplante de MO y esplenocitos, se inyectaron subconjuntivalmente 2×10^5 células mesenquimales. Las CSM se inyectaron en el ojo derecho de los ratones. Los 10 ratones se sacrificaron 20 días después de la inyección subconjuntival. Seguidamente se realizó la enucleación de los ojos y el procesamiento histológico para valorar la existencia de CSM y evaluar posibles cambios a nivel del polo posterior. Los TBI, 3 de ellos se sacrificaron a los 10 días, los otros 3 fallecieron alrededor del día 14.

3.2.5. Extracción de los ojos, polo posterior y retina

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

Una vez que se extrajeron los ojos, se realizó una incisión junto al limbo esclero-corneal para facilitar la entrada del fijador y la conservación de los ojos se llevó a cabo en paraformaldehído al 4% diluido con PBS.

Se procedió a la separación del polo anterior y del polo posterior del ojo. Se recortó la esclera a nivel del ecuador del ojo, separando el cristalino suavemente; de esta forma se obtenía el polo posterior de los ojos.

Cuando el experimento requería el aislamiento de la retina para su procesamiento *in toto*, se procedía a la separación de la retina del resto de capas del polo posterior tras estar sumergida la muestra 12 horas en paraformaldehído al 4%.

3.2.6. Técnicas inmunohistoquímicas

Para evaluar la expresión de proteínas específicas de las células de la retina y las CSM humanas de los ratones a los que previamente se les había generado la EICHo e inyectado dichas células, 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 PBS, a 4°C durante 12 horas. Tras la fijación, se realizaron varios lavados en PBS durante al menos 2 horas a temperatura ambiente (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 2 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 y las muestras se almacenaron a -80°C hasta su posterior procesado.

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 12µm de espesor que se recogieron en portaobjetos doblemente gelatinizados (Fig. 3). Los portaobjetos se dejaron secar a TA y se almacenaron a -20°C hasta su posterior procesado.

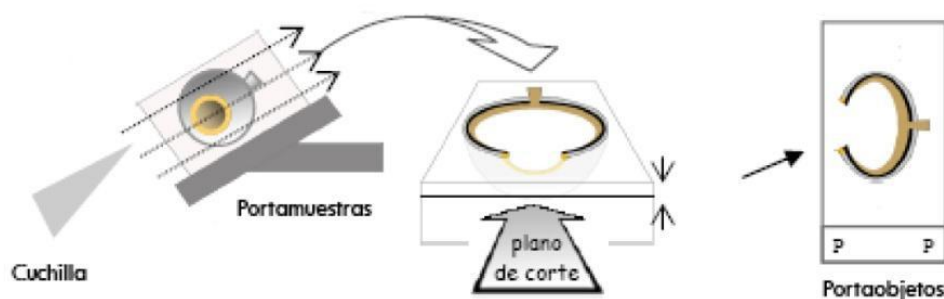


Figura 3: Esquema del proceso de corte del tejido

3.2.6.1. Inmunohistoquímica de fluorescencia:

Las secciones se descongelaron a TA durante 1 hora y se lavaron en PBS 3 veces, durante 10 minutos cada una en agitación, para rehidratar el tejido.

A continuación se realizó un tratamiento con NaBH_4 para disminuir la autofluorescencia, tras lo que se realizaron 5 lavados de 10 minutos con Triton X-100 (Probus S.A.) al 0,02% en PBS. Después se realizó una preincubación con suero no inmune (Sigma) al 5 % y PBS con Triton X-100 (PBS-TX) durante 1 hora a TA. En nuestro caso se utilizó suero procedente de la especie en que se habían obtenido los anticuerpos secundarios. Con este procedimiento conseguimos facilitar la penetración de los anticuerpos y reducir las uniones inespecíficas de los mismos al tejido.

Posteriormente, las secciones se incubaron con el medio de bloqueo con suero al 5%, al que añadimos el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 3 y 4), en PBS-TX durante 12 horas a TA. Después de lavar con PBS-TX, los cortes se incubaron durante 1 hora a TA y en oscuridad con los anticuerpos secundarios fluorescentes correspondientes (Tabla 5), diluidos en el medio de preincubación, y además se añadió 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) diluido a 1:10000 en PBS, para poder visualizar todos los núcleos celulares en la sección ya que el DAPI se une selectivamente al DNA de la célula.

Para la isolectina B4 se usó el mismo procedimiento pero no se añadió anticuerpo secundario, ni DAPI.

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

En las retinas *in toto*, se alargó el tiempo de preincubación a 3 horas, el de incubación del anticuerpo primario a 3 días, y el del secundario a 12 horas, realizándose también lavados de mayor duración cada uno de ellos, siendo de 20 minutos cada lavado.

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 estructuras celulares retinianas:

- Anti-PAX6: permite visualizar el núcleo de células ganglionares, amacrinas y horizontales (Martin et al, 1992).
- Anti-PKC α : permite visualizar células bipolares de bastón y algunas células amacrinas (Grünet y Martín, 1991).
- Anti-GS: permite detectar células de Müller (Lewis et al, 1988).
- Anti-GFAP: marca específicamente astrocitos, ependimocitos y glía radial (Dahl y Bignami, 1973).
- Anti-IBA1: detecta las células dendríticas, macrófagos y microglía (Fu et al, 2011).
- Isolectina B4: marca específicamente las células endoteliales de los vasos de la retina y algunos residuos azucarados de las membranas de la microglía (Boya et al, 1991).

- Para identificar signos de inflamación;

- Anti-caspasa 3: permite confirmar existencia de apoptosis (Yuan y Horvitz, 2004).
- Anti- TCR/CD3⁺: detecta el complejo de membrana TCR/CD3 que existe entre la unión de linfocitos T y CD3⁺ (Sholmchik et al. 1999).

- Para identificar las CSM humanas

- Anti-GFP (AB-5450, Abcam): permite visualizar las CSM marcadas con GFP.

El análisis de imagen se realizó con un microscopio Olympus PROVIS AX70. Las imágenes de microscopía confocal fueron obtenidas con el Microscopio Zeiss Axio Observer Z1 equipado con

dispositivo Apotome2 ®. Las imágenes tomadas se procesaron para su conteo celular con el programa Image J y se trataron con el programa Adobe Photoshop® CS4.

3.2.7. Medida y análisis de la osmolaridad de la película lagrimal

La medida de la osmolaridad de la película lagrimal se realizó con un osmolarímetro TearLab®, mediante la recolección de 50µl de lágrima en el fondo de saco del párpado inferior en la zona más próxima al canto interno, sin administración de anestesia tópica.

Para análisis estadístico se usó la media +/- desviación estándar y el test de la t para comparaciones estadísticas; $p < 0.05$ era considerando estadísticamente significativo. Para asegurar normalidad de la distribución de datos se usó el test de Kolmogorov-Smirnov.

3.2.8. Cuantificación y análisis de las células Iba1⁺

Para la cuantificación de las células Iba1⁺ de la retina se realizaron 4 fotos de cada sección con un aumento de 20X, dos de zonas centrales de la retina y dos de las zonas periféricas, en 3 secciones diferentes en cada ratón. Después sumamos el número de células Iba1⁺ de las 4 zonas, considerando este número como células por sección. Para la cuantificación de las células Iba1⁺ de la CNO, se realizó una foto de la CNO en tres secciones diferente en cada ratón.

Para el análisis estadístico se usó la media +/- desviación estándar y el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para comparaciones estadísticas; $p < 0.05$ era considerando estadísticamente significativo. Para estudiar la no normalidad de la distribución de datos se usó el test de Kolmogorov-Smirnov.

4. RESULTADOS

4.1. ANIMALES CON EICHO. ANÁLISIS CLÍNICO DE LA SUPERFICIE OCULAR E INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA RETINA.

En este trabajo analizamos el polo posterior del ojo de animales con EICHo, ya que apenas existen datos de cómo esta patología afecta a dicha región. Por eso entre los objetivos de este trabajo se encuentran: evaluar las alteraciones del polo posterior ocular, en ratones BALB/C a los que previamente se les genera una EICHo que reproduzca los mismos signos que en humanos; y analizar las alteraciones del polo posterior ocular en ratones BALB/C sometidos a la irradiación y trasplante de medula ósea, requisito previo a la generación de la EICHo.

4.1.1. Signos clínicos de la EICH y EICHo

Con el fin de asegurarnos de que nuestro modelo murino cumplía los signos clínicos de la EICHo, y así estudiar la posible existencia de afectación a nivel de la retina, se valoraron los ojos individualmente en cada ratón 2 veces a la semana hasta el día 30 post-trasplante.

La gradación de EICH sistémica reveló una puntuación en todos los ratones ≥ 1 a los 30 días post-trasplante, observándose en todos los animales pérdida de peso, postura “encorvada”, disminución de actividad y pérdida de pelo (Fig. 4) (Cooke et al, 1996).

Los hallazgos clínicos oculares de los ratones con EICH se graduaron teniendo en cuenta los mismos criterios evaluados por la Pérez y cols en su trabajo de tesis doctoral del 2011: pelo periocular, borde palpebral y blefarospasmo (Pérez et al, 2011). La escala de valoración fue la siguiente (Fig. 5):

- **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 ambos ojos a los 30 días post-trasplante.

Los ojos enucleados fueron examinados mediante estereomicroscopio, observándose úlceras corneales, pannus corneal y neovascularización corneal en todos los casos de EICHo (Fig. 6).

Paralelamente a nuestro estudio, se realiza otro trabajo de tesis doctoral por Martínez-Carrasco Pérez en el que, entre otras cosas, se evalúa la osmolaridad de la película lagrimal para comprobar si la hiperosmolaridad se podría usar como parámetro diagnóstico de la EICHo.

A los animales se les midió la osmolaridad de la película lagrimal mediante un osmolarímetro TearLab®, encontrándose que a mayor puntuación en la escala de valoración de la afectación ocular mayor era la osmolaridad (Tabla 8).

Cuando comparamos el valor de la osmolaridad de los ratones con afectación de grado 2 con los controles, encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, test de la t), lo mismo ocurre cuando se comparan los que tienen afectación grado 2, con los que tienen afectación grado 0 ($p < 0,01$, test de la t) (Gráfico 1).

Grado afectación	mOsm/L
Control	$345,1 \pm 2,6$
EICHo 0	$339,9 \pm 3,8$
EICHo 1	$348,4 \pm 6,2$
EICHo 2	$368,5 \pm 6,3$

Tabla 8: Osmolaridad de la película lagrimal en función de la afectación ocular por la EICHo

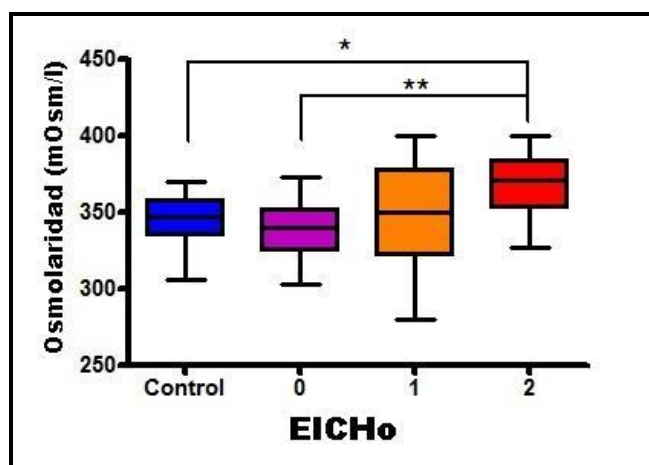


Gráfico 1: Gráfico de la osmolaridad de la película lagrimal en función de la afectación ocular por la EICHo. *diferencias significativas. **diferencias altamente significativas

4.1.2. Análisis inmunohistoquímico de la retina de los ratones con EICHo y los tratados con inyección subconjuntival de CSM

Con el fin de establecer si existe afectación de la retina en la EICHo y cuál es su fisiopatología, analizamos el polo posterior de los ratones a los que se les había provocado EICHo. Para ello hemos estudiado en detalle si se producen modificaciones en los diferentes tipos celulares retinianos y en la distribución de los mismos, en la vascularización de la retina, si ocurren procesos de inflamación y apoptosis y la respuesta de las distintas poblaciones gliales.

Para analizar, en su caso, las alteraciones morfológicas de la retina del ratón EICHo estudiamos en primer lugar la estructura de la retina de los ratones sanos, para poder comparar con los EICHo y detectar las modificaciones que pudieran producirse. Además decidimos estudiar los ojos de los ratones sometidos a TBI +y los sometidos a trasplante de médula, para comprobar si las posibles alteraciones encontradas se debían a la irradiación o al trasplante. Los ratones con EICHo no tratados fueron a su vez comparados con los ratones EICHo tratados con CSM, que a partir de este momento serán denominados en este trabajo de tesis ratones EICH y CSM respectivamente.

Mediante la utilización de diferentes marcadores inmunohistoquímicos hemos analizado las variaciones de los distintos tipos celulares retinianos en los diferentes grupos experimentales.

4.1.2.1 PAX 6

En los **ratones controles**, tanto en las zonas centrales como en las zonas periféricas de la retina, aparecen núcleos positivos a pax 6 tanto en la CNI como en la CCG. Según la bibliografía consultada (Püschel et al, 1992), consideramos que los núcleos positivos de la parte más interna de las CNI corresponden a células amacrinas y algunos de la CCG pertenecen a células amacrinas desplazadas, que son escasas, mientras que el resto de los de la CCG son de células ganglionares (Fig. 7A).

En los **ratones con EICH sin tratar**, que a partir de este momento denominaremos ratones EICH, encontramos núcleos positivos a pax 6 en la misma localización y número que en el caso de los ratones control. Detectamos células positivas en la CNI y la CCG, que se corresponden con células horizontales, amacrinas y ganglionares (Fig. 7B). No se aprecia variación en la localización de las células dentro de la CNI ni en la CCG, ni disminución en el tamaño de las mismas.

En los ratones EICH tratados con CSM, que a partir de este momento denominaremos ratones CSM, tampoco observamos ninguna variación respecto a los animales control ni a los ratones EICH. El marcaje para pax 6 se localiza en las mismas capas y en los mismos tipos celulares que en los dos grupos anteriores (Fig. 7C).

4.1.2.2. Proteína Kinasa C Alpha (PKC α)

En las retinas de los **ratones control** hemos detectado que todas las células bipolares de bastón son positivas para la proteína PKC α . Apreciamos marcaje a lo largo de toda la células bipolar de bastón, tanto su soma, localizado a nivel de la CNI, como en sus terminales axónicos en la CPI y sus penachos dendríticos en la CPE (Fig. 8A,B). Este tipo de marcaje se detecta a lo largo de toda la extensión de la retina.

En las retinas de los **ratones EICH** se aprecia, tanto en zonas centrales como periféricas, el soma de las células bipolares de bastón a nivel de la CNI y sus terminales sinápticos en la CPI y CPE (Fig. 8C). En estos ratones enfermos se mantiene la morfología característica del soma de la bipolar de bastón y no se detecta modificaciones ni en su localización ni en su tamaño. En cuanto a los penachos dendríticos de dichas células en la CPE, estos parecen mantener tanto su longitud como la densidad de sus procesos. En el

caso de las terminales axónicas, estas presentan la misma longitud y parecen mantener la misma densidad de botones sinápticos (Fig. 8D).

En los **ratones con CSM** (Fig. 8E) no hemos detectado variaciones ni en la distribución del soma ni en las prolongaciones de las células bipolares de bastón respecto a los animales control ni con los ratones EICH. Tampoco hemos apreciado diferencias ni en el número de las células bipolares ni en la densidad y grosor de las conexiones dendríticas en la CPE, ni de las axónicas en la CPI (Fig. 8F).

4.1.2.3. Glutamina Sintetasa (GS)

En las retinas de los **ratones control** encontramos positividad para GS en toda la extensión de las células de Müller y a lo largo de toda la retina, desde la periferia hasta la zona más central. Observamos el soma de la célula de Müller en la CNI y dos largas prolongaciones, una de ellas terminando en la MLE y la otra en la MLI, encontrando en nuestras muestras un marcaje más intenso a nivel de los procesos vitreales (Fig. 9A). En las retinas de los animales control, se puede apreciar claramente como toda la MLE y la MLI son positivas a GS. Además, las prolongaciones de estas células presentan ramificaciones laterales (Fig. 9A) en todas las capas de la retina.

En las retinas de los **ratones EICH** se aprecia el mismo marcaje de las células de Müller que en el caso de los ratones control. No hemos detectado variaciones en la disposición del cuerpo celular de estas células, ni se observa disminución en los procesos esclerales y vitreales de las mismas. Se mantiene el marcaje intenso en los pies vitreales en la MLI. Además, se sigue apreciando claramente tanto la inmunorreactividad en la MLE como en la MLI y la continuidad en las mismas (Fig. 9B).

En las retinas de los **animales CSM** la inmunofluorescencia para GS muestra las células de Müller en toda su extensión, apareciendo marcados más intensamente los procesos vitreales (Fig. 9C). No hemos evidenciado diferencias de marcaje en este grupo, en ninguna localización de la retina, respecto al grupo de ratones control y a los ratones EICH. Se mantiene el número de células GS⁺ así como la intensidad del marcaje en las mismas, tanto en el cuerpo celular como en las prolongaciones. Tanto la MLE como la MLI mantienen el mismo patrón de marcaje que en los animales control (Fig. 9C).

Por lo tanto no observamos gliosis reactiva por parte de las células de Müller ni en los ratones EICH, como efecto de la enfermedad, ni en los ratones CSM.

4.1.2.4. Proteína glial fibrilar ácida (GFAP)

En las retinas de los **ratones control** el anticuerpo frente a GFAP marca los procesos gliales de los astrocitos localizados en la CFNO, sin encontrar diferencias entre regiones centrales y periféricas de la retina (Fig. 10A). En las secciones transversales no se aprecia el cuerpo celular de los astrocitos en la CFNO y los procesos astrocitarios positivos a GFAP en dicha capa son delgados.

En las retinas de los **ratones EICH** detectamos un marcaje similar frente a GFAP que en los ratones control. No detectamos ni aumento en el número de procesos de los astrocitos GFAP⁺ ni incremento en la intensidad del marcaje en los mismos (Fig. 10B).

En las retinas de los **ratones CSM** encontramos el mismo patrón de marcaje frente a GFAP que en las retinas de ratones control y EICH, en todas las localizaciones de la retina (Fig. 10C). Se mantiene la inmunorreactividad de los procesos de los astrocitos y no apreciamos incremento en la intensidad del marcaje ni en el número de procesos. Tampoco se aprecia tinción en los vasos sanguíneos más vitreales, que están rodeados por los procesos astrocitarios (Fig. 10C).

Una de las respuestas de los astrocitos ante un daño o degeneración en la retina es la sobreexpresión de GFAP, apareciendo procesos positivos que atravesarían la retina en toda su extensión, y incrementándose el número somas positivos de astrocitos en zonas más internas de la retina. No hemos encontrado ninguna de estas alteraciones en los animales enfermos por EICH, tanto tratados como no tratados (Fig. 10B,C).

4.1.2.5. Iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecular)

La microglía está presente en todas las capas de la retina, siendo su localización más frecuente en las capas más internas, las CFNO, CPI, Y CPE; pero también pueden localizarse en la CCG, siendo menos frecuente su localización en la CNI, y casi ausente en la CNE (Fig. 11A).

En todos los grupos de ratones analizados, las células Iba1⁺ son ligeramente más abundantes en las zonas de la retina más próximas al nervio óptico que en las zonas más periféricas de la retina.

En los **ratones controles** la mayor parte de células Iba1⁺ se distribuyen en las capas plexiformes, en menor número en las CFNO y CCG y son más abundantes en la CPI (Fig. 11A).

Se puede apreciar dos tipos de células Iba1⁺, unas células perivasculares de apariencia alargada (Fig. 13B) y otras células ramificadas de aspecto estrellado (Fig. 13A), siendo más frecuentes estas últimas (Fig. 11A).

Las células estrelladas tienen somas pequeños de los que emergen prolongaciones primarias que se ramifican, localizándose sobre todo en la CPI (Fig. 13A, 16A). Las células perivasculares se caracterizan por ser poco ramificadas y alargadas (Fig. 13B) y estar más en relación con los grandes vasos venosos. Este tipo celular es más abundante en la CPE cerca de la CNI, y se disponen paralelamente a la superficie de la retina, apareciendo también en la CPI aunque en menor número.

A nivel de la cabeza del NO, predominan células alargadas que se disponen paralelamente a la CFNO y a los axones que penetran en el NO (Fig. 14A, 17A).

En los **ratones sometidos a TBI**, las células Iba1⁺ se localizan en las mismas capas que en las retinas del grupo control. (Fig. 11B), no encontrando grandes diferencias en número en comparación con el grupo control (Fig. 11A). Estos ratones fueron sacrificados a los 10 días de la irradiación en lugar de a los 30 días, por lo que es posible que esto pueda producir algún efecto en lo que se refiere al avance del incremento de microglía.

En estos ratones, la diferencia principal respecto a los controles, es que las células presentan variaciones en su morfología, observándose una contracción de sus prolongaciones, sobre todo en las localizadas en la CPI (Fig. 11B).

En lo que se refiere a la CNO, no encontramos grandes diferencias respecto al grupo control (Fig. 14B).

Los **ratones sometidos a trasplante de MO** y los **ratones EICHo** y los **CSM** comparten las mismas características en lo que se refiere a las células Iba1⁺. En todos ellos evidenciamos un aumento en número de células Iba1⁺ (Fig. 11C-E), tanto en las regiones centrales como periféricas (Fig. 15) y a nivel de la CNO respecto a las retinas del grupo control (Fig. 14C-E, 17B-D). En estos grupos observamos que, en la retina, las células Iba1⁺ tienden a agruparse. Las capas donde se localizan preferentemente en estos grupos son la CCG-CFNO, la CPI y CPE adyacentes a la CNI, siendo mucho más frecuentes en la CPI. En la CPI es

donde encontramos más diferencias, en lo que aumento en el número de células se refiere, respecto a las retinas del grupo control (Fig. 11C-E).

En estos ojos observamos los dos tipos morfológicos de células Iba1⁺ descritos en el grupo control, sin embargo, las células experimentan una retracción de sus prolongaciones y adquieren morfología pseudopódica (Fig. 13E, 16B-D). Las células Iba1⁺ perivasculares aparecen en mayor número en relación con los grandes vasos venoso (Fig. 12A,B).

También se observan células Iba1⁺ de aspecto ameboso (Fig. 11E, 16C). Estas células presentan un soma de mayor tamaño y prolongaciones muy cortas, o incluso pueden carecer de ellas (Fig. 13D).

Además, en estos grupos de ratones se aprecian células Iba1⁺ que atraviesan la CNI, desde la CPI a la CPE, con forma de T (Fig. 13C). Son células con un soma grande en las capas plexiformes con 3 prolongaciones primarias, dos paralelas a la superficie de la retina y una perpendicular a la superficie de la retina.

En lo que se refiere a la CNO, también apreciamos un aumento en el número de células Iba1⁺, respecto al grupo control, distribuyéndose estas con sus prolongaciones de forma paralela a la CFNO en las capas plexiformes sobre todo en la CPI (Fig. 14C-E, 17B-D), y presentando un cuerpo celular alargado paralelo a las fibras del NO.

❖ **Análisis cuantitativo de las células Iba1⁺**

• *Células por sección a nivel de la retina*

En lo que se refiere al número de células Iba1⁺, encontramos en los controles 20,83±1.94 células por sección, en los ratones sometidos a TBI 27,75±2,50, en los sometidos a TBI y trasplante de MO 45,00±3,16, los ratones no tratados con EICHo tenían una media de 47,00±6,70 células por sección, y en los tratados 45,71±9.01 (Tabla 9). Hemos detectado diferencias significativas entre los MO y los controles (p<0.05), y diferencias altamente significativas entre los ratones con EICHo y los controles, tanto los tratados (p<0.01 con), como los no tratados (p<0.01) (Gráfico 2).

Tipo de ratón	Nº de células Iba1 ⁺ por sección en retina
<i>Control</i>	20,83±1.94
<i>TBI</i>	27,75±2,50
<i>MO</i>	45,00±3,16
<i>EICHo</i>	47,00±6,70
<i>EICHo + CSM</i>	45,71±9.01

Tabla 9: Número de células Iba1⁺ por sección en retina.

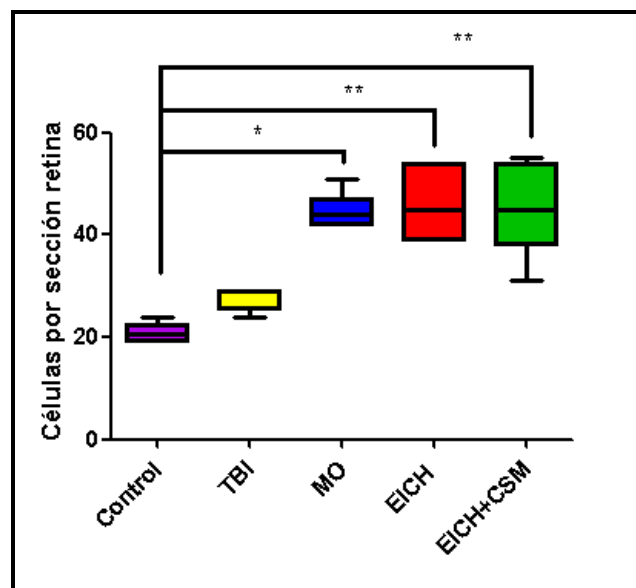


Gráfico 2: Gráfico de número de células Iba1⁺ en retina. *diferencias significativas. **diferencias altamente significativas

- Células por sección a nivel de la cabeza del NO

El número de células Iba1⁺ a nivel de la cabeza del NO, fue de 5,00±1,09 en los controles, 4,83±0,98 en los TBI, 3,16±3,16 en los MO 14,86±3,53, siendo 15,00±3,16 en los EICHo no tratados y 15,00±3,53 en los

tratados (Tabla 10). Las diferencias son significativas entre los MO y los controles ($p < 0.05$), entre los EICH no tratados y los controles ($p < 0.05$) y entre los EICH tratados y los controles ($p < 0.05$) (Gráfico 3).

Tipo de ratón	Nº de células por sección en cabeza NO
<i>Control</i>	$5,00 \pm 1,09$
<i>TBI</i>	$4,83 \pm 0,98$
<i>MO</i>	$14,83 \pm 3,53$
<i>EICHo</i>	$15,00 \pm 3,16$
<i>EICHo+CSM</i>	$15,00 \pm 3,53$

Tabla 10: Número de células Iba1⁺ en la CNO.

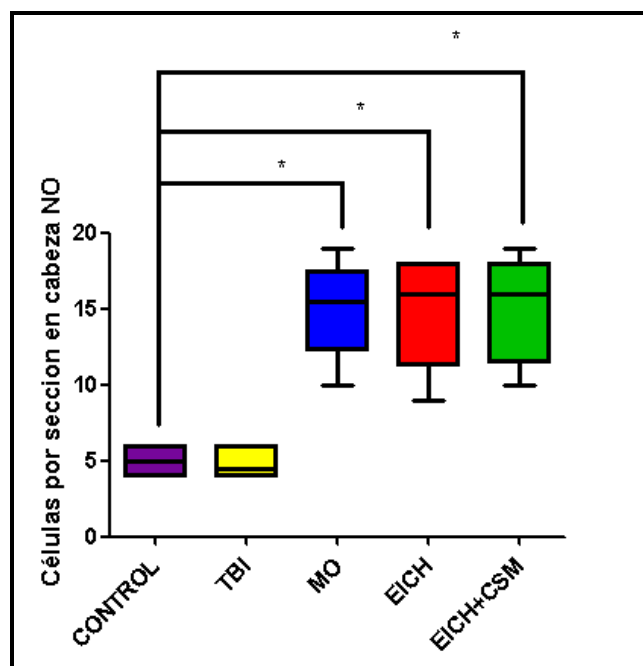


Gráfico 3: Gráfico del número de células Iba1⁺ en la CNO. *diferencias significativas.
**diferencias altamente significativas

4.1.2.6. Isolectina B4

En las retinas de **ratones control** encontramos un patrón de marcaje de la vascularización de la retina que muestra una capa vascular superficial y una profunda, que se extiende desde la CNO a áreas periféricas, que se corresponde con vasos arteriales, venosos y capilares. Además, se aprecia un leve punteado fino que se corresponde con algunos residuos azucarados de las membranas de microglía (Fig. 18A).

En las retinas **de ratones EICH** no encontramos diferencias con las retinas de ratones control en cuanto al patrón de marcaje vascular. No se detectaron zonas de isquemia ni de neovascularización en ninguna región de la retina, ni en zonas centrales ni periféricas. Tampoco hemos localizado nuevas ramificaciones de los vasos, ni aumento ni disminución en el grosor de los mismos. No hay variación en la intensidad de la tinción. En lo que respecta al punteado fino que se corresponde con la presencia de la unión de la lectina con los residuos azucarados de la microglía, encontramos un aumento en número de este punteado, correspondiéndose esto con el aumento cuantitativo de la microglía en ambos grupos expuesto en el apartado anterior (Fig. 18B).

En las retinas de los **ratones CSM** tampoco se aprecian variaciones, ni formación de nuevos vasos ni detectamos zonas de isquemia. La intensidad del marcaje y el grosor y ramificación de los diferentes tipos de vasos es similar al de los animales control y EICH (Fig. 18C). El punteado correspondiente al marcaje de microglía se mantiene aumentado como en el caso de los ratones EICH.

4.1.2.7. Caspasa 3.

En las retinas de **ratones control** no se encontró tinción con Caspasa 3 ni en zonas periféricas ni centrales. Tampoco observamos células marcadas en ninguna de las capas retinianas, ni en la CNE, CNI ni CCG. No se encontró tinción a nivel de la CNO, ni células gliales marcadas con este anticuerpo.

En los **ratones EICH y CSM** tampoco se evidenció tinción con Caspasa 3 en ninguna localización de la retina ni en la CNO, por lo que se descartó la posibilidad de apoptosis celular inducida con la TBI y por la EICH.

4.1.2.8. Antígeno TCR/CD3⁺

En las retinas y la CNO de los **ratones control** no hemos evidenciado tinción frente al antígeno TCR/CD3⁺, en ninguna capa de la retina ni en ningún tipo celular.

En las retinas y la CNO de los **ratones EICH y CSM** tampoco hemos encontrado positividad frente al antígeno TCR/CD3⁺ por lo que descartamos la afectación de la retina por la EICH.

4.2. ANIMALES TRATADOS CON CSM. ANÁLISIS DE LA MIGRACIÓN DE CSM HACIA LA RETINA

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 (Conget, 1999).

En la clínica pueden aplicarse de distintas formas, en animales de experimentación se han descrito diferentes métodos de administración de CSM para reparar la superficie ocular, en enfermedades de esa zona del ojo, como es la EICH.

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 (Pérez et al, 2011).

Consideramos un objetivo muy importante de este trabajo investigar la posible migración de las CSM humanas inyectadas subconjuntivalmente hacia la retina y CNO de ratones BALB/C. Los animales fueron inyectados y divididos en grupos que fueron sacrificados a los 20 días después de la inyección.

Con el fin de localizar las CSM humanas que expresan la proteína GFP, se empleó el anticuerpo anti-GFP.

La expresión de GFP haría implícito el origen humano y mesenquimal de estas células.

En ningún de los grupos estudiados hemos podido observar la presencia de células con marcaje GFP, ni en las diferentes capas de la retina, ni asociadas a vasos sanguíneos ni en el epitelio pigmentario de los ratones, ni tampoco a nivel de la CNO.

5. ICONOGRAFÍA

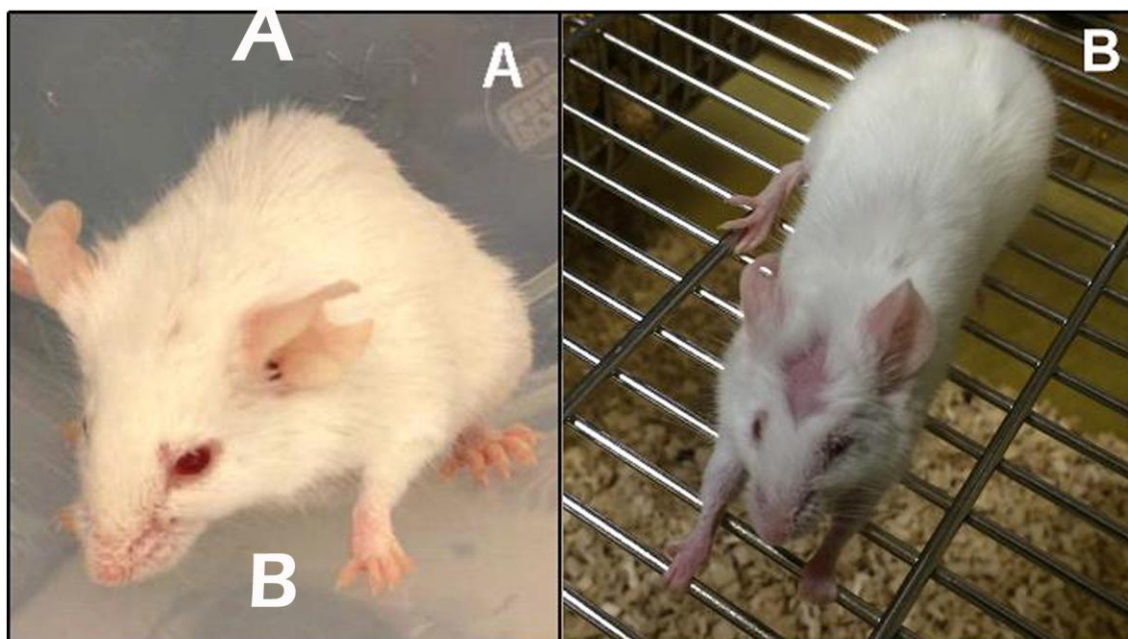


Figura 4: Ratones con afectación de EICH. **A.** Encorvamiento y erizamiento del pelo. **B.** Alopecia, erizamiento del pelo y blefarospasmo del ojo izquierdo.

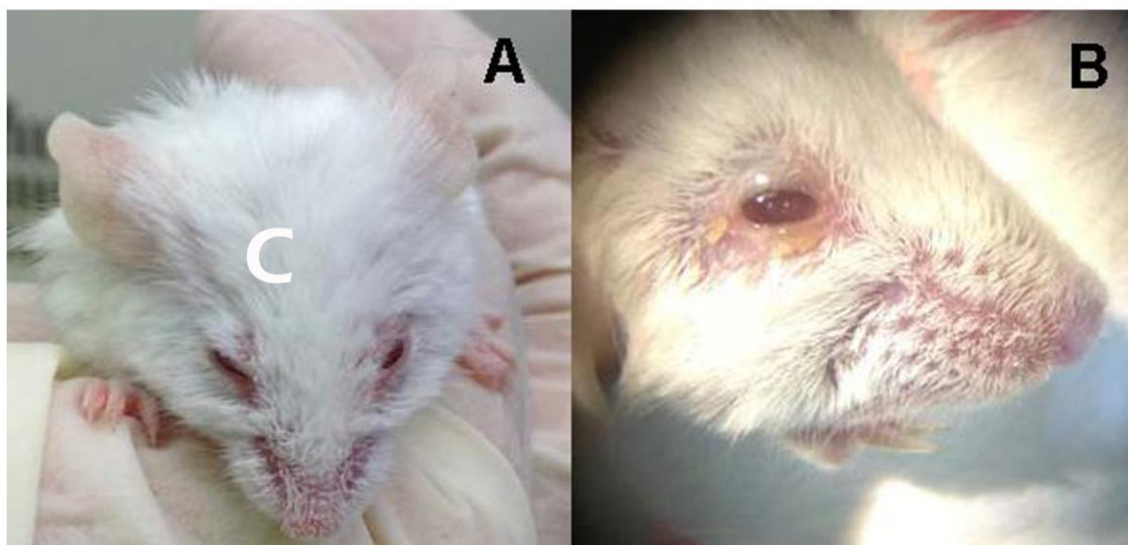


Figura 5: Ratones con EICHo. **A.** Blefaroespasmo. **B.** Alopecia y enrojecimiento periocular asociado a presencia de costras en los párpados.

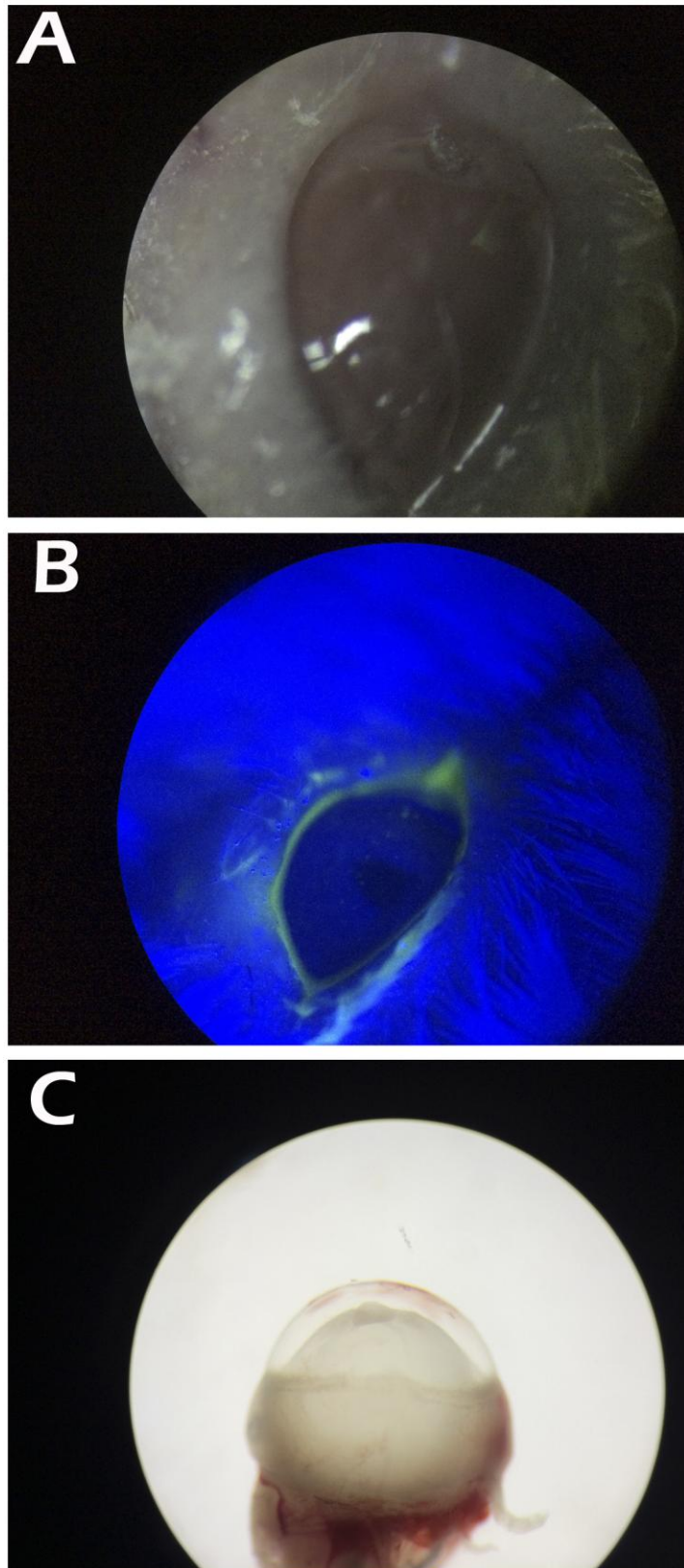


Figura 6: **A.** Imagen obtenida mediante estereomicroscopio de ojo de ratón con EICHo en el que se aprecia una úlcera corneal próxima a canto interno. **B.** Imagen de ojo de ratón teñido con fluoresceína, en el que se aprecia queratitis punteada superficial gracias a la luz con filtro azul cobalto. **C.** Ojo enucleado con úlcera y pannus corneal.

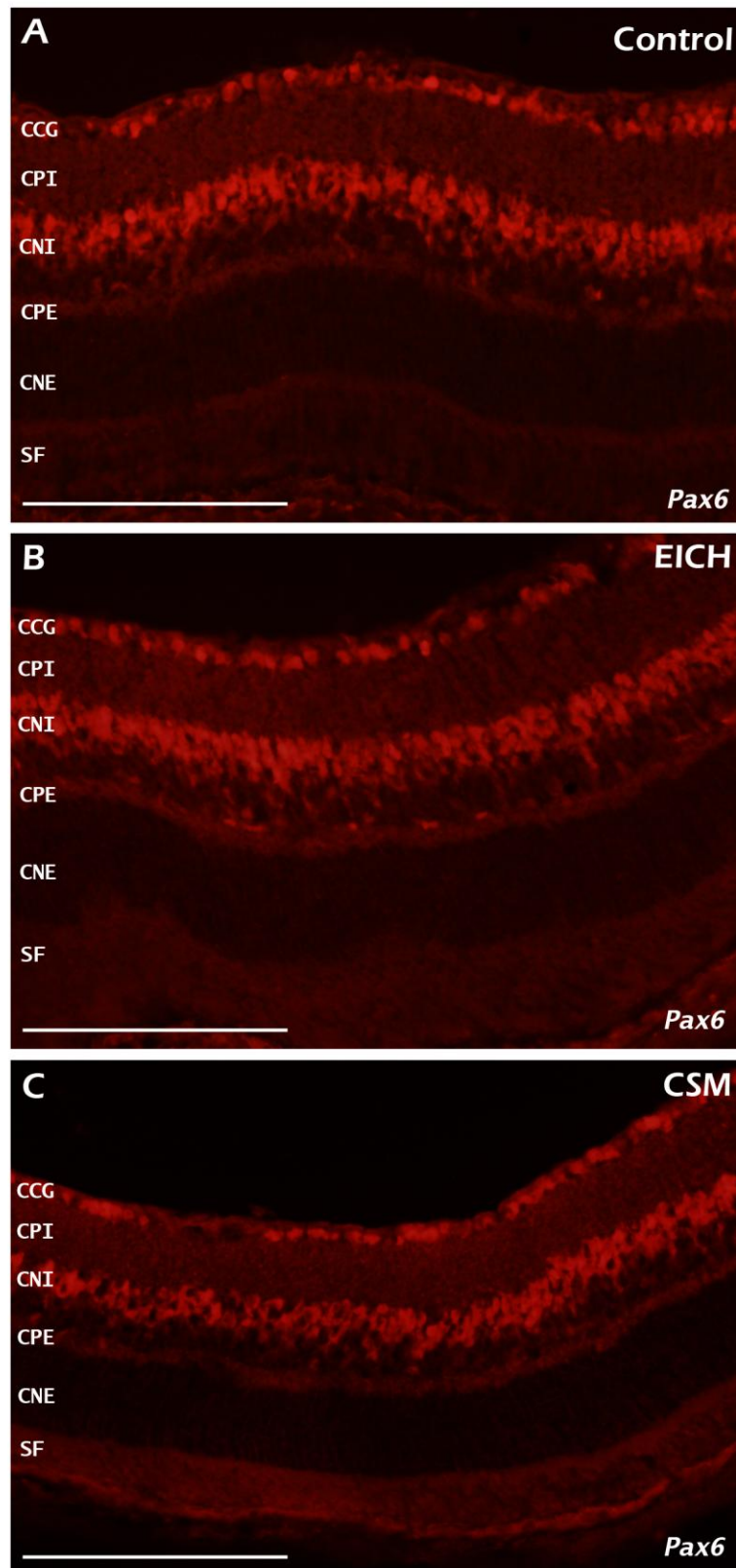


Figura 7: Patrón de marcaje para PAX6 en secciones de retina. **A.** Retina control; **B.** Retina de ratón con EICH sin tratar (EICH); **C.** Retina de ratón con EICH tratado con CSM (CSM). La inmunofluorescencia para PAX6 marca una proteína de localización nuclear en las células ganglionares, amacrinas y horizontales, localizadas en CCG y CNI. No existen diferencias en el patrón de marcaje entre los tres grupos. Barra de escala: 100 μ m.

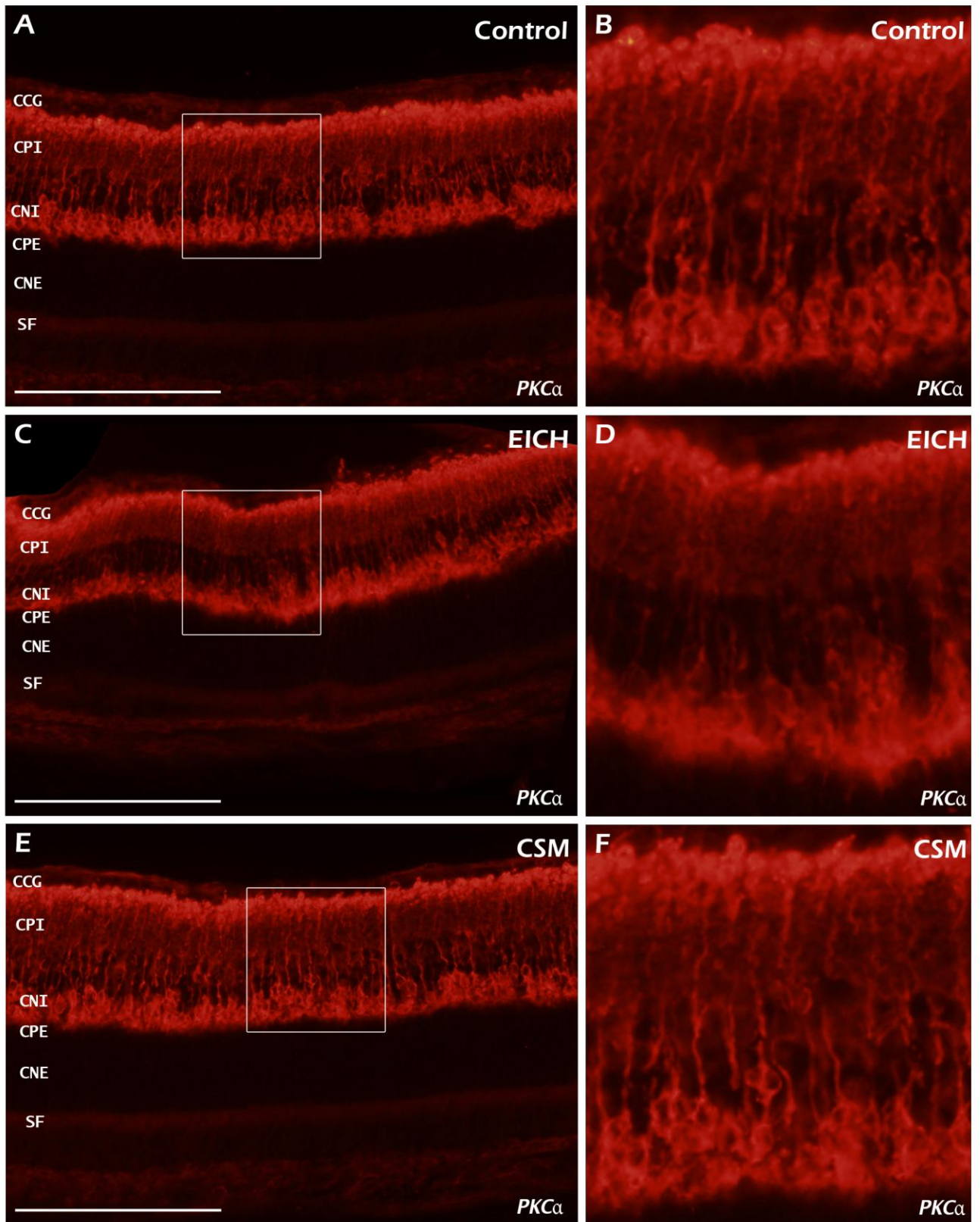


Figura 8: Inmunofluorescencia frente a PKC α en secciones transversales de retina. **A.** Retina controles; **B.** Imagen detallada 9A; **C.** Retina EICH; **D.** Imagen detallada 9C; **E.** Retina CSM; **F.** Imagen detallada 9E. Se aprecia el soma (CNI) y las terminales sináptica de las células bipolares de bastón (CPE y CPI). No encontramos diferencias entre los tres grupos de ratones a estudio. Barra de escala 100 μ m.

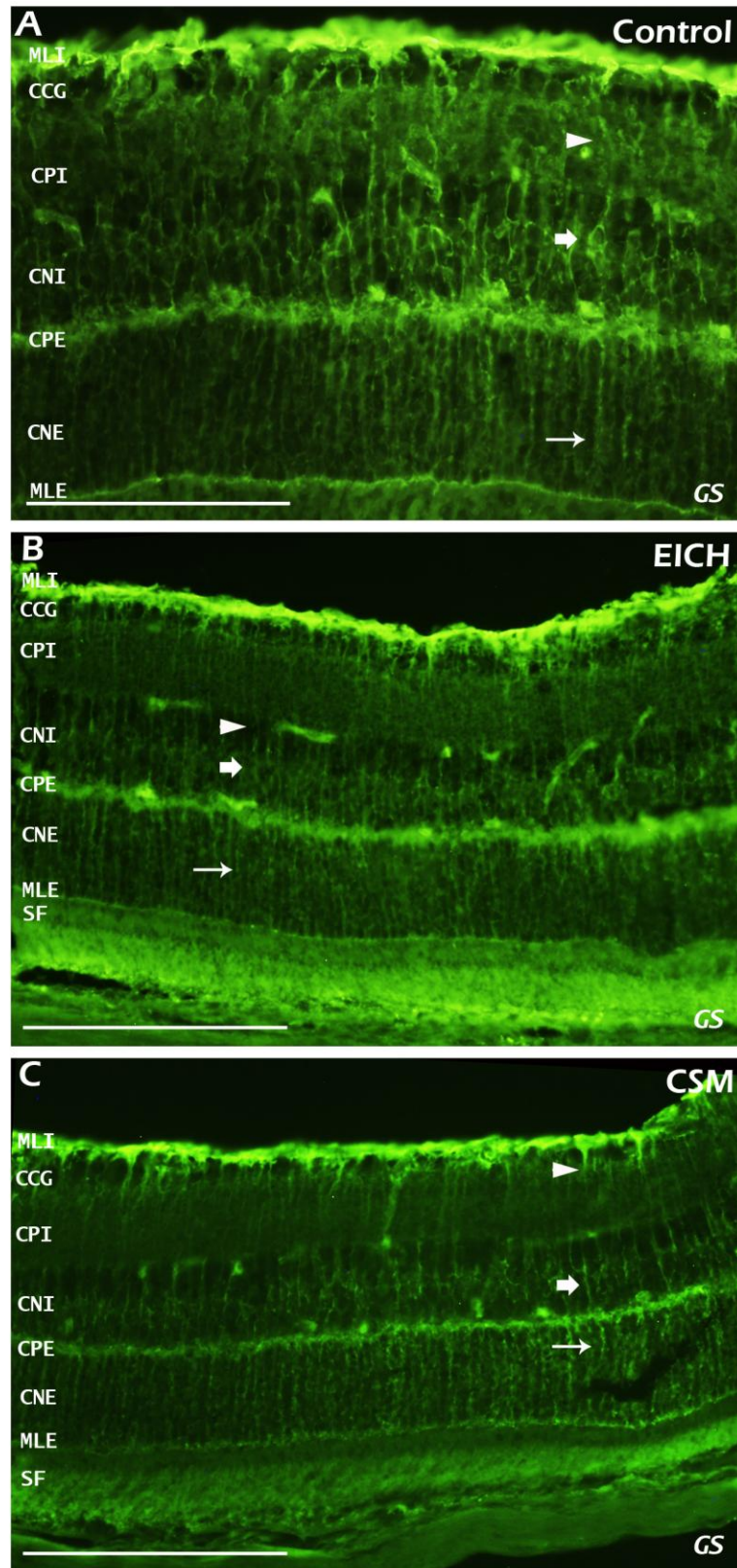


Figura 9: Patrón de marcaje para GS en secciones de retina. **A.** Retina control; **B.** Retina EICH; **C.** Retina CSM. La inmunofluorescencia para GS muestra las células de Müller en toda su extensión, marcando más intensamente los procesos vitreales (MLI). No hemos visto diferencias entre los tres grupos. Soma célula de Müller (flecha blanca gruesa), prolongación de célula Müller terminada en MLI (punta de flecha), prolongacion de célula Müller terminada en MLE (flecha blanca fina). Barra de escala 100 μ m.

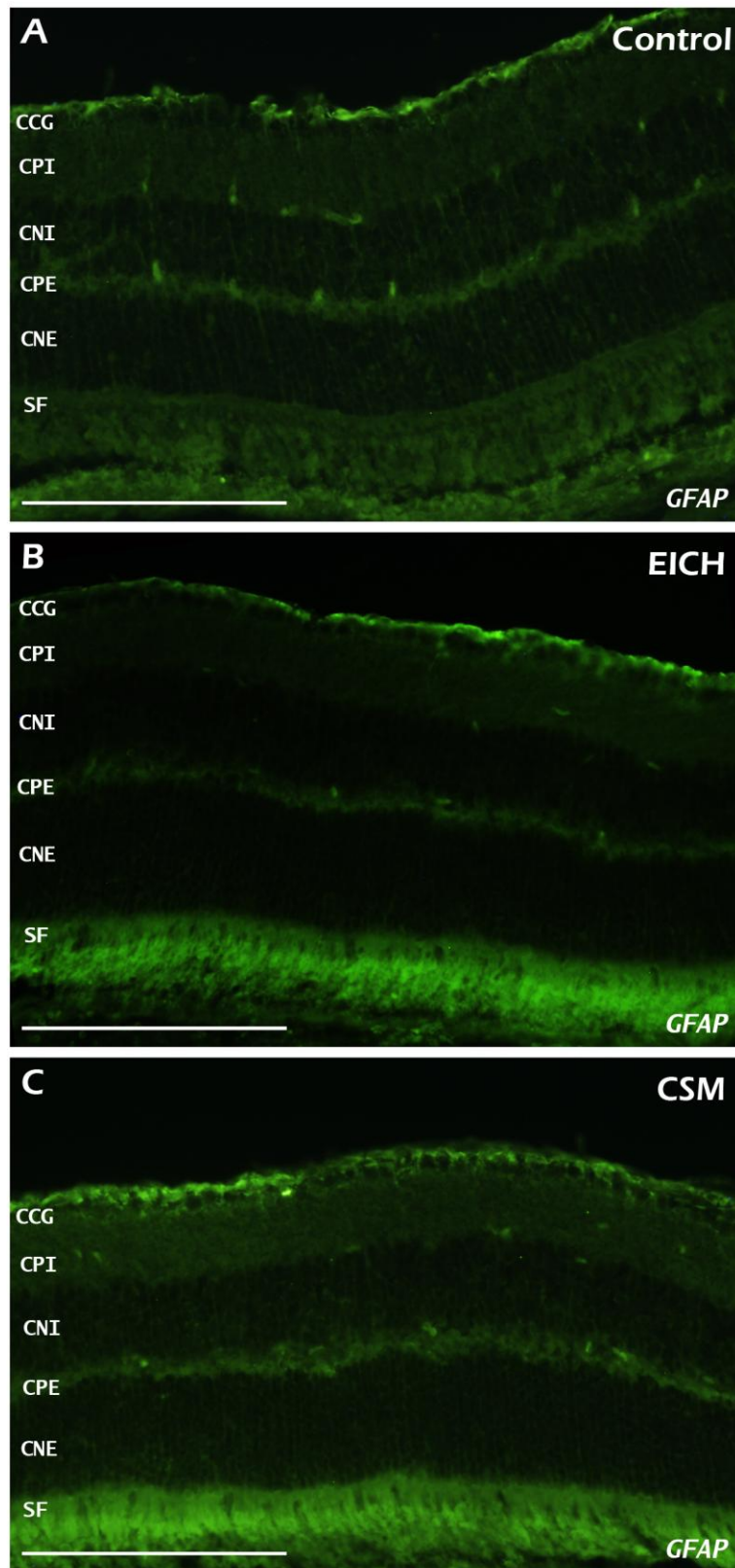


Figura 10: Inmunorreactividad para la proteína GFAP en secciones de retina. **A.** Retina control; **B.** Retina EICH; **C.** Retina CSM. Los anticuerpos frente a GFAP muestran los procesos gliales de los astrocitos. Las diferencias entre nuestros grupos a estudio son inexistentes. Barra de escala 100 μ m.

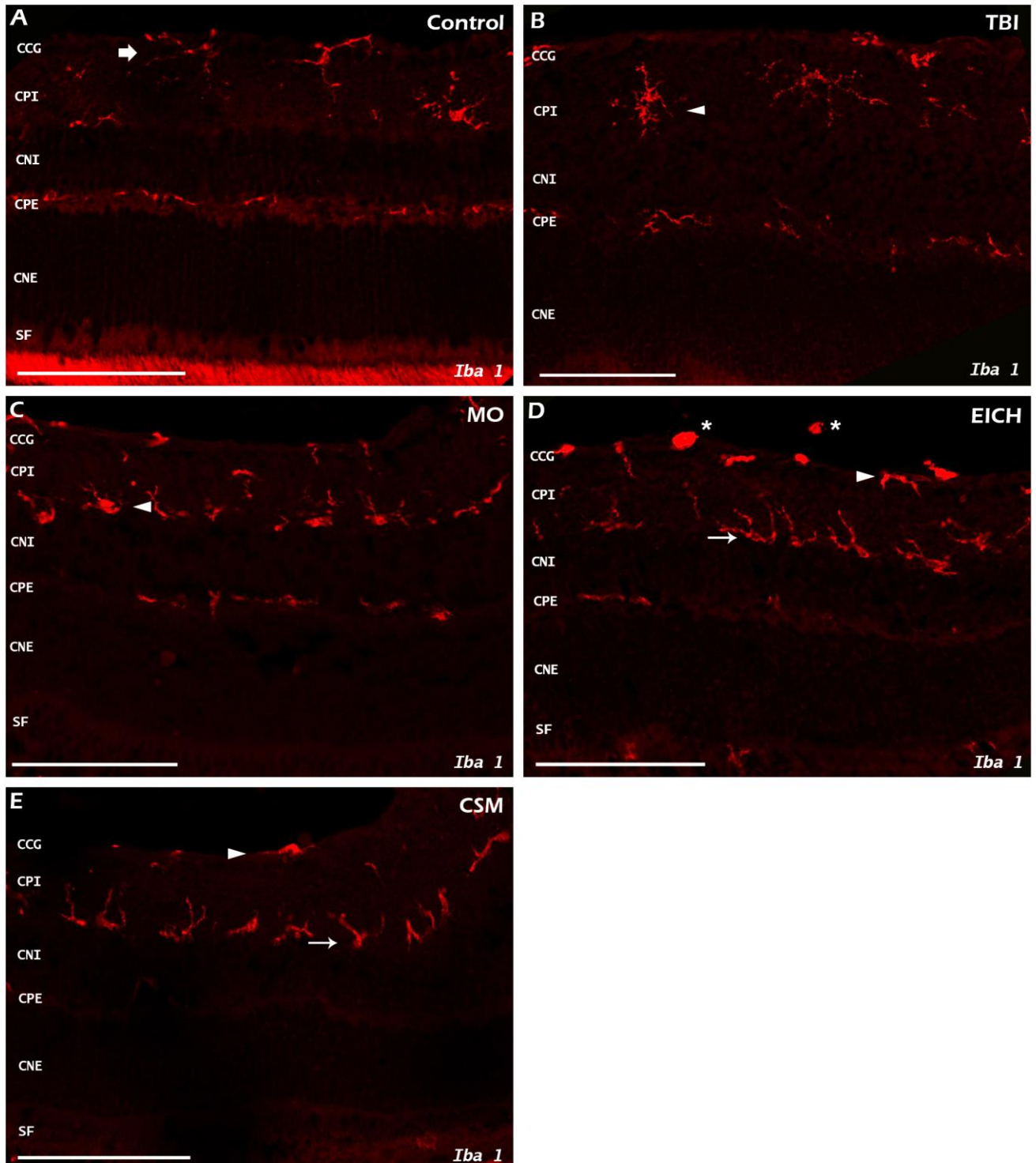


Figura 11: Variación en el número y morfología de la microglía Iba1+ en los diferentes grupos experimentales. **A.** Retina control. Escasas células Iba1+ de aspecto estrellado (flecha blanca gruesa) en la CFNO-CCG, CPI y CPE siendo más abundantes en las capas más internas; **B.** Retina de ratón TBI. Distribución y número de células Iba1+ similar al control con pequeña retracción de las prolongaciones (cabeza de flecha); **C.** Retina de MO; **D.** Retinas de EICH; **E.** Retinas de tratados con CSM. En los tres grupos hay aumento de células Iba1+ sobre todo en la CPI, presentando células estrelladas y alargadas con una contracción de sus prolongaciones (flecha blanca fina), células pseudopódicas (cabeza de flecha) y, células de aspecto ameboideo (asterisco). Barra de escala 100µm.

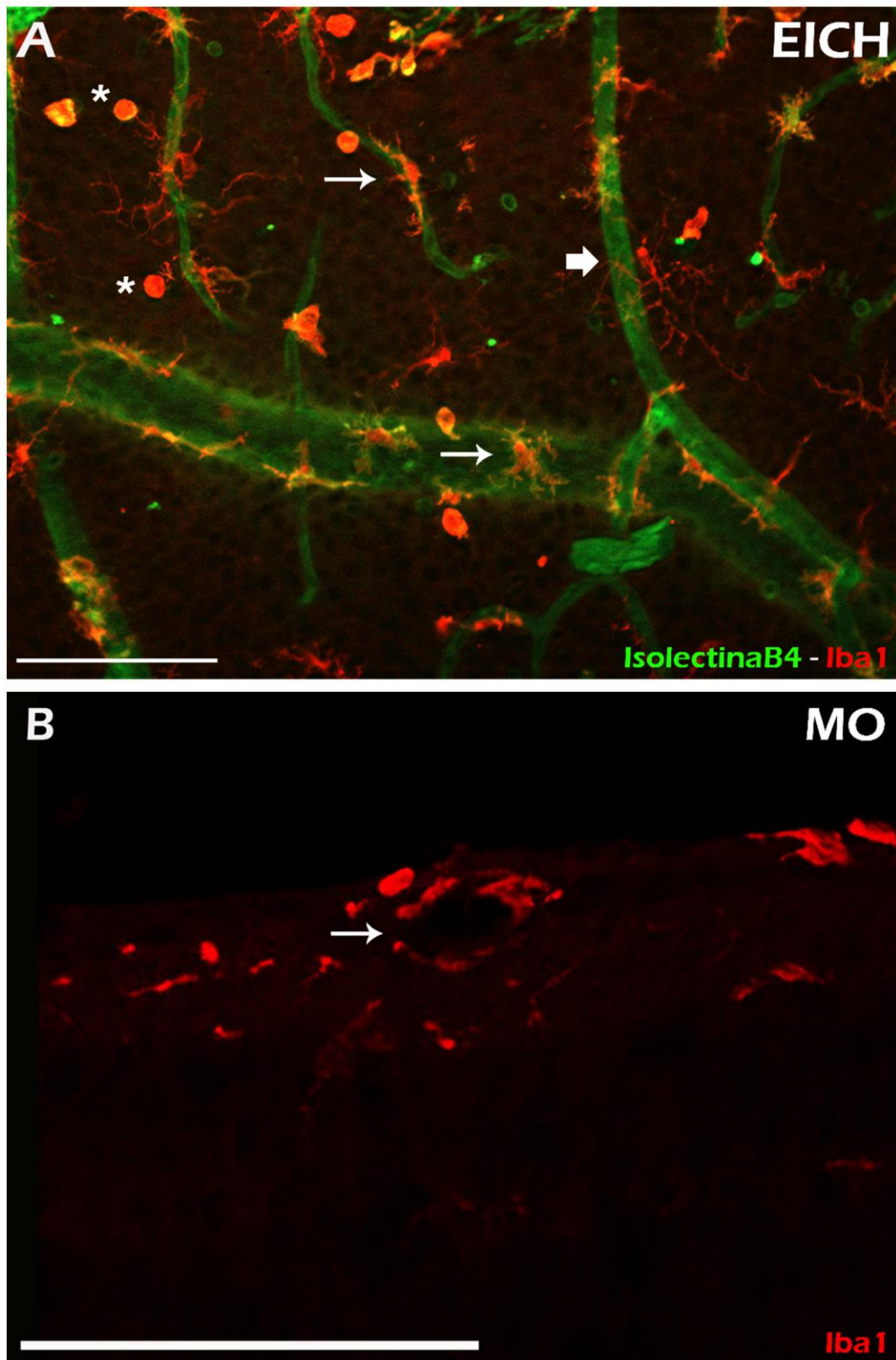


Figura 12: Células Iba1+ (rojo) en relación con grandes vasos venosos isolectina+ (verde,). **A.** Inmunofluorescencia en retina in toto de ratón EICH. células perivasculares (flecha blanca fina), células estrelladas (flecha blanca gruesa), células ameboides (asterisco); **B.** Sección de retina de ratón MO. Numerosas células Iba1+ alrededor de gran vaso venoso (flecha blanca fina). Barra de escala 100µm.

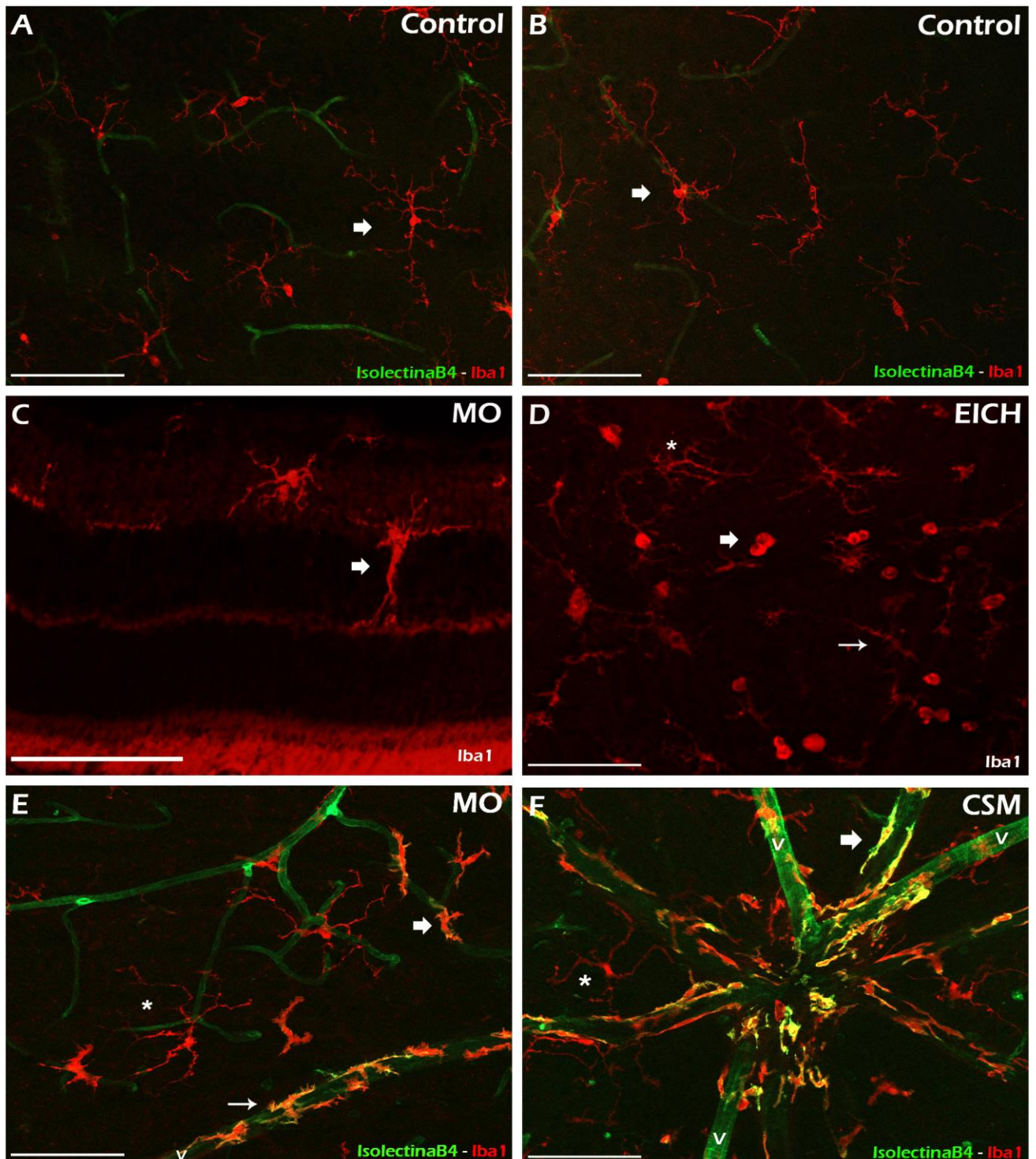


Figura 13: Inmunofluorescencia para Iba1+ y isolectina B4. (A, B, E y F): Retinas in toto con células Iba1+. C. Secciones de retina con microglía Iba1+. D. Retina in toto con Iba1. **A.** Células Iba1+ estrelladas de retina de ratón control (flecha blanca gruesa); **B.** Célula alargada Iba1+ en retina de ratón control (flecha blanca gruesa); **C.** Célula con forma de T Iba1+ de ratón MO (flecha blanca gruesa); **D.** Células Iba1+ ameboides (flecha blanca gruesa), célula alargada (flecha blanca fina) y célula estrellada (asterisco) en retina de ratón con EICH; **E.** Células Iba1+ perivasculares (flecha blanca), estrelladas (asterisco), y pseudopódicas (flecha blanca gruesa) en retina de ratón MO; **F.** Células Iba1+ pseudopódicas y perivasculares (flecha blanca gruesa) y células ramificadas (asterisco) próximas a la cabeza del nervio óptico en ratón con EICH. Vasos Isolectina+ en verde (V). Barra escala 100μm.

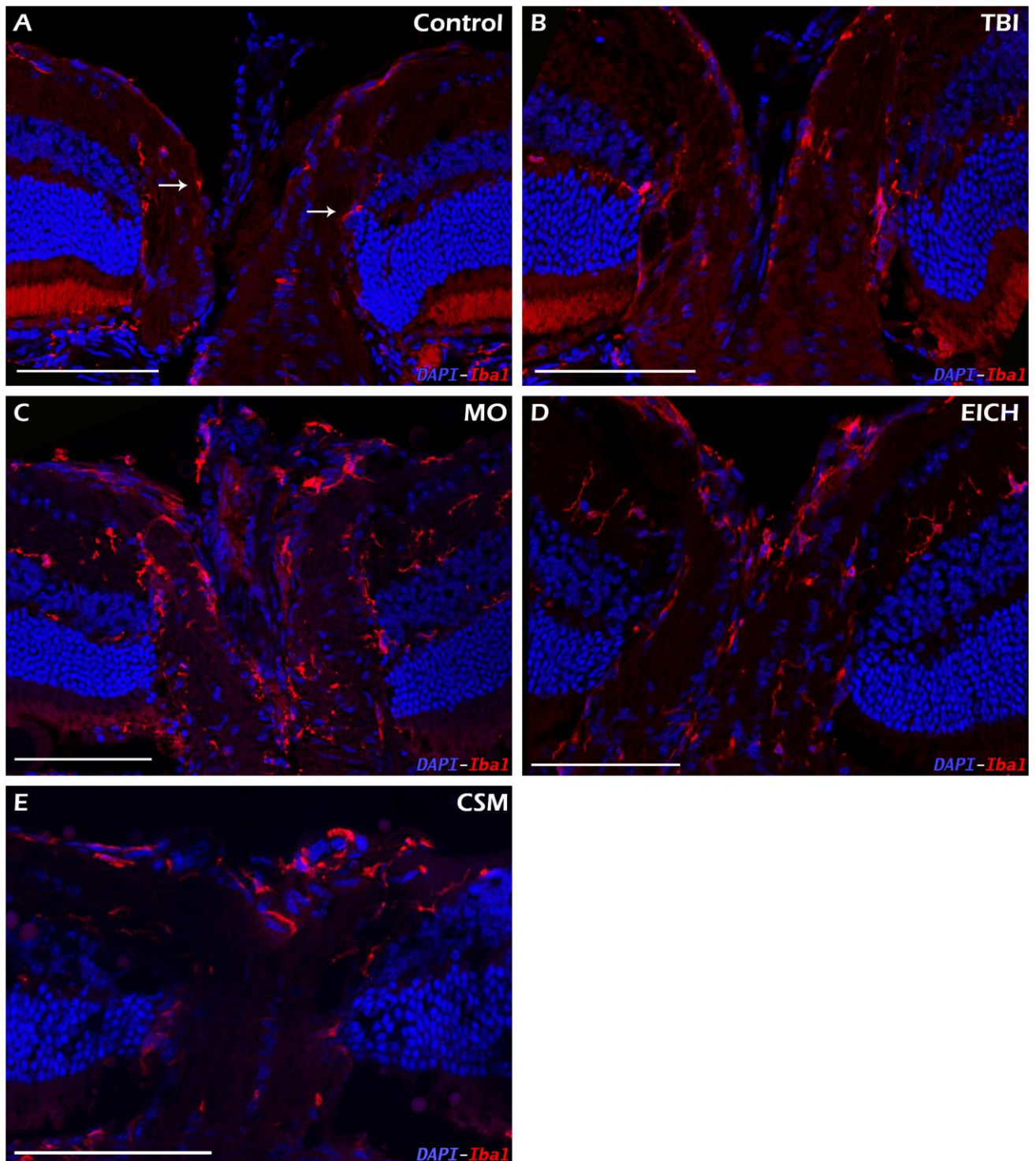


Figura 14: Distribución de células microgliales Iba1+ (rojo) en los diferentes grupos experimentales en CNO. Núcleos marcados con DAPI (azul). **A.** Sección de CNO control. Células Iba1+ con un cuerpo alargado localizadas paralelamente a los axones del NO (flecha blanca fina). **B.** Sección de CNO de animales TBI. Mismas características en cuanto a número y localización de las células Iba1+ respecto a los controles. **C.** CNO MO. **D.** CNO EICH. **E.** CNO CSM. En estos tres últimos grupos se observa un aumento notable en el número de células Iba1+ respecto al control. Barra de escala: 100 μm .

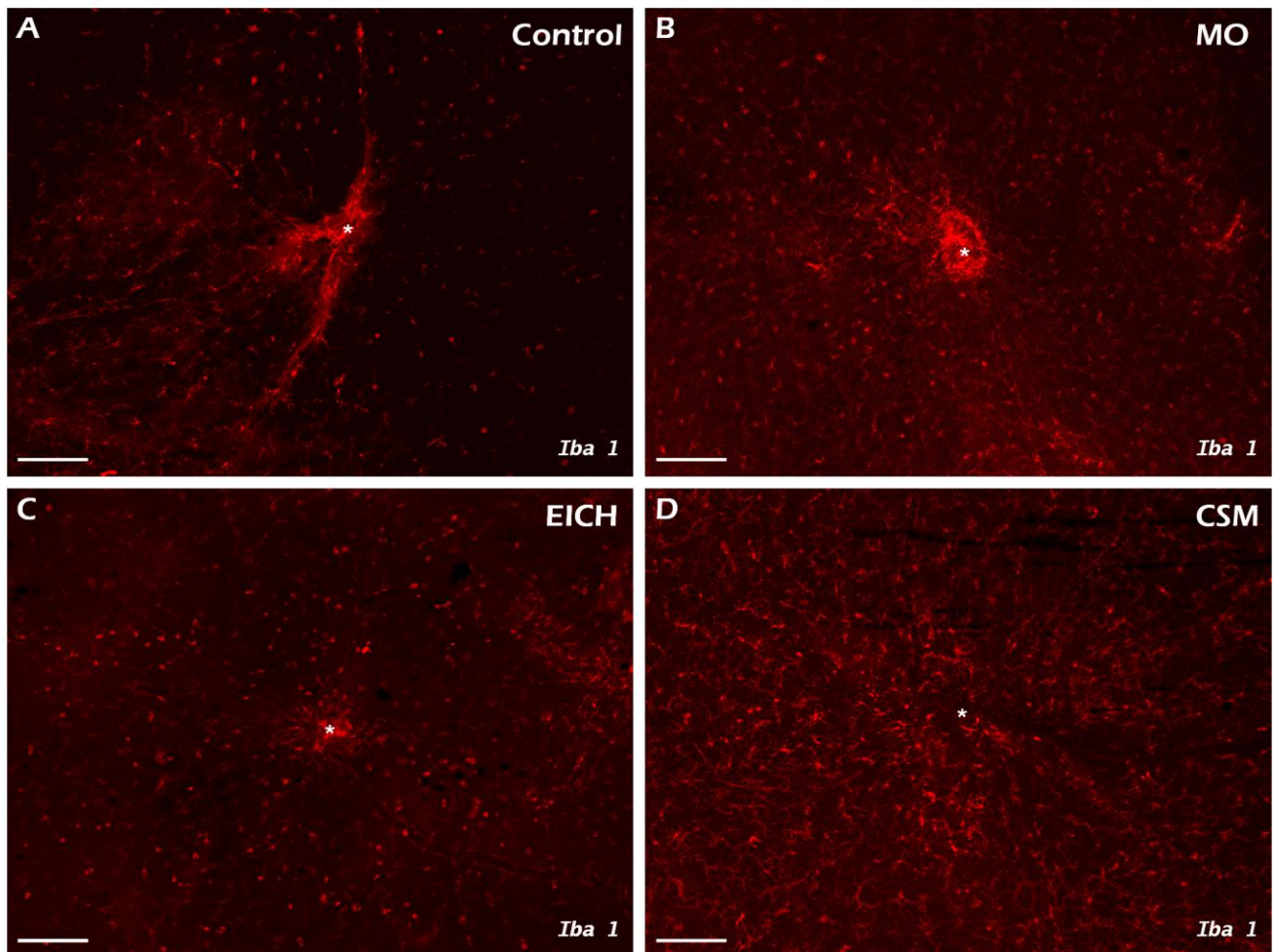


Figura 15: Distribución de las células Iba1+ en las retinas completas de los diferentes grupos experimentales (retinas in toto). **A.** Retinas de ratones control. **B.** Retinas de ratones MO; **C.** Retinas de ratones EICH; **D.** Retinas de ratones tratados con CSM. En estas imágenes se aprecia un aumento en el número de las células Iba1+ en los distintos grupos experimentales respecto al control. CNO (asterisco). Barra de escala 200 μ m.

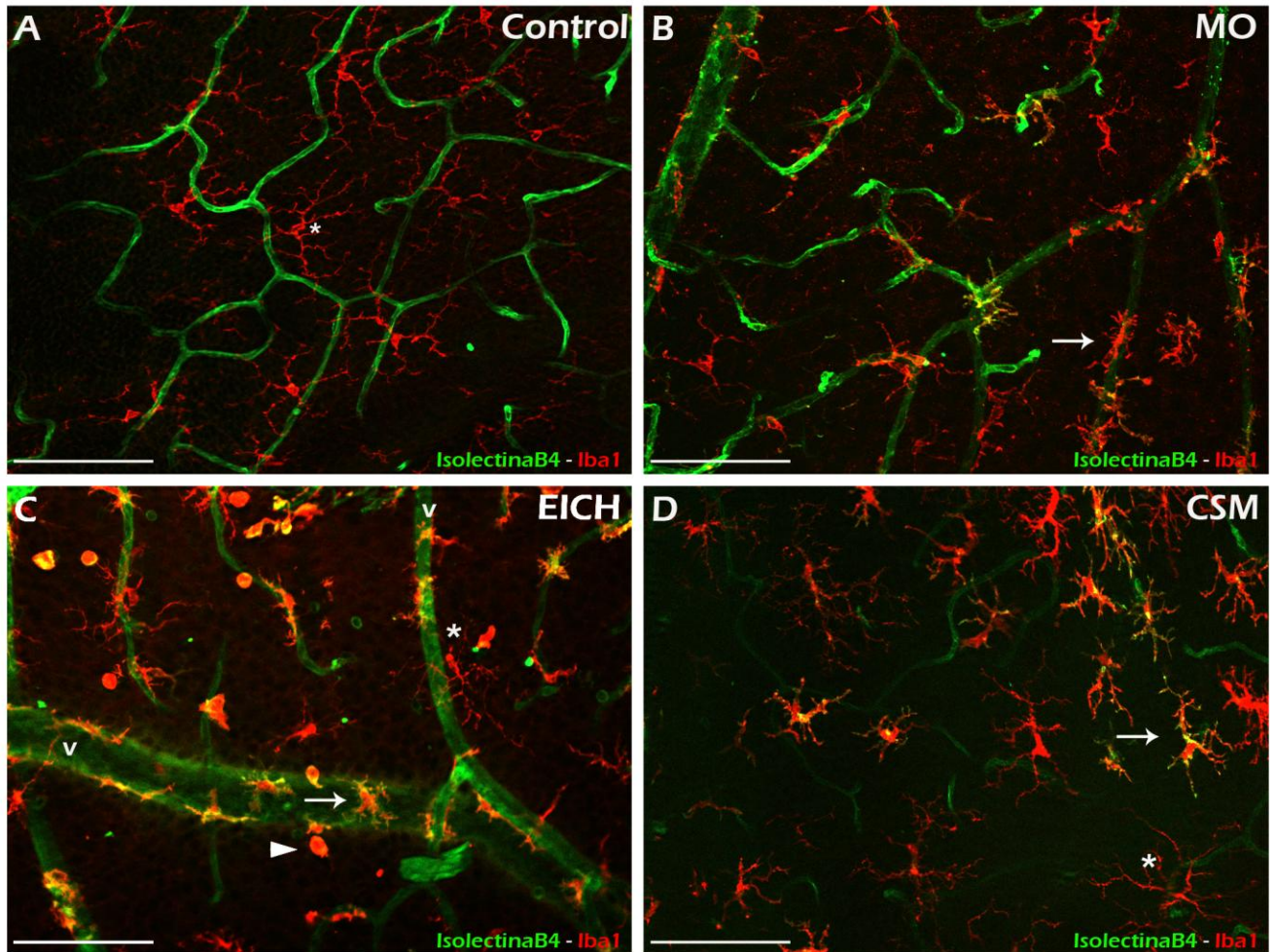


Figura 16: Variación en la morfología y número de la microglía Iba1+ (rojo) en los diferentes grupos experimentales y su relación con los vasos sanguíneos isolectina B4+ (verde) en retinas in toto. **A.** Retinas de ratones control; **B.** Retinas de ratones MO; **C.** Retinas de ratones EICH; **D.** Retinas de ratones tratados con CSM. En estas imágenes se aprecia un aumento en cuanto a número de las células Iba1+ en las imágenes B, C y D; respecto a las imágenes de las retinas de ratones control, A. Además en la imagen A podemos ver células Iba1+ en su mayoría de morfología ramificada (asterisco), sin embargo en las imágenes B, C y D, predominan las células Iba1+ de morfología pseudopódica (flechas) y ameboidea (punta de flecha) que corresponden con células de microglía reactiva y asociadas a los vasos sanguíneos (v) (verde). Barra de escala 100 μ m.

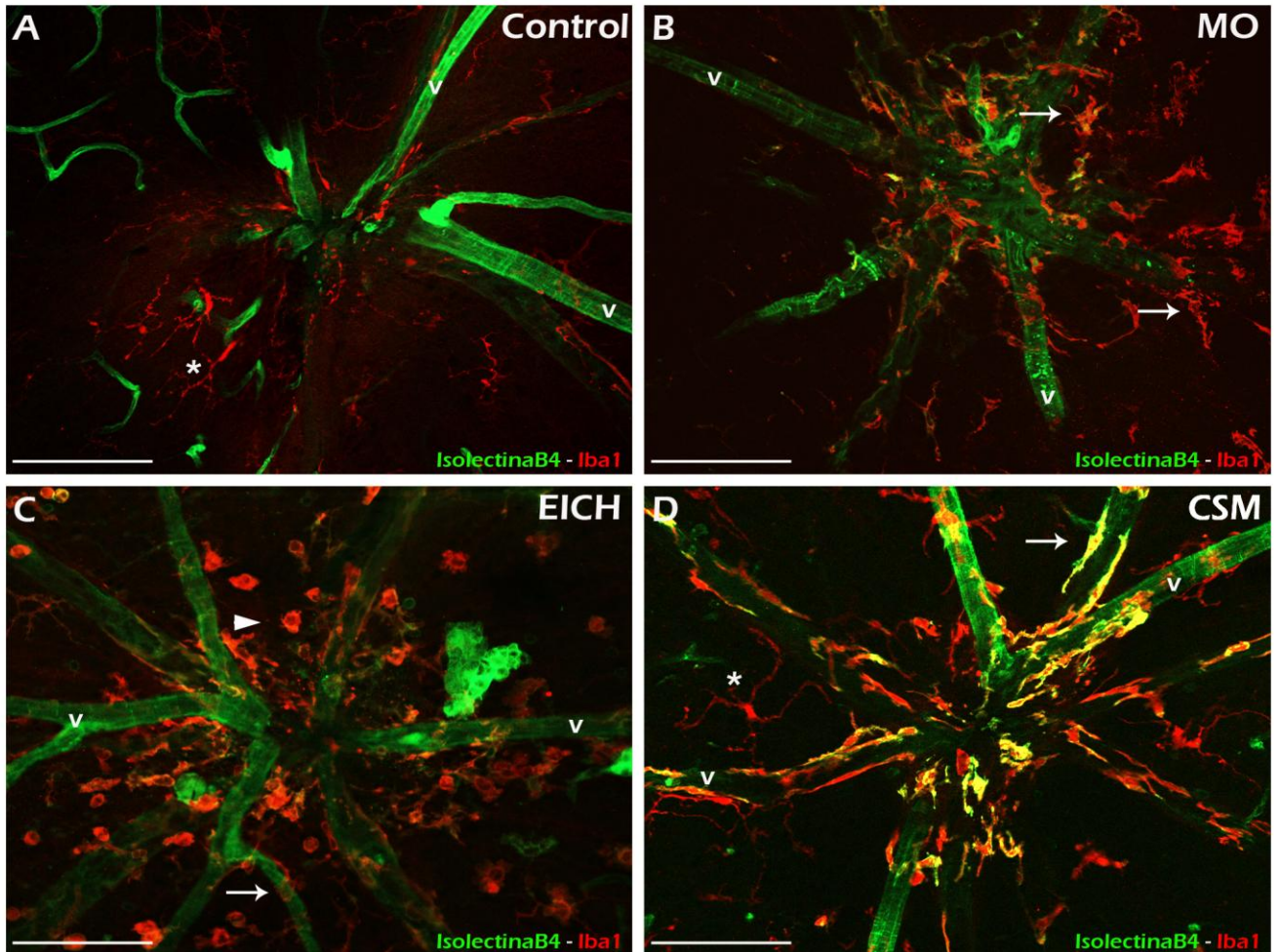


Figura 17: Variación en el número y morfología de la microglía Iba+ (rojo) en la retina adyacente a la CNO (asterisco). Vasos sanguíneos Isolectina B4+ (verde). Montaje de retinas in toto. **A.** CNO de ratones control; **B.** CNO de ratones MO; **C.** CNO de ratones EICH; **D.** CNO de ratones tratados con CSM. En estas imágenes se aprecia un aumento en cuanto a número de las células Iba1+ en las imágenes B, C y D; respecto a las de ratones control, A. Además en la imagen A podemos ver células Iba1+ en su mayoría de morfología ramificada (asterisco), sin embargo en las imágenes B, C y D, predominan las células Iba1+ de morfología pseudopódica (flechas) y ameboidea (punta de flecha) que corresponden con células de microglía reactiva. Vasos sanguíneos (v). Barra de escala 100 μ m.

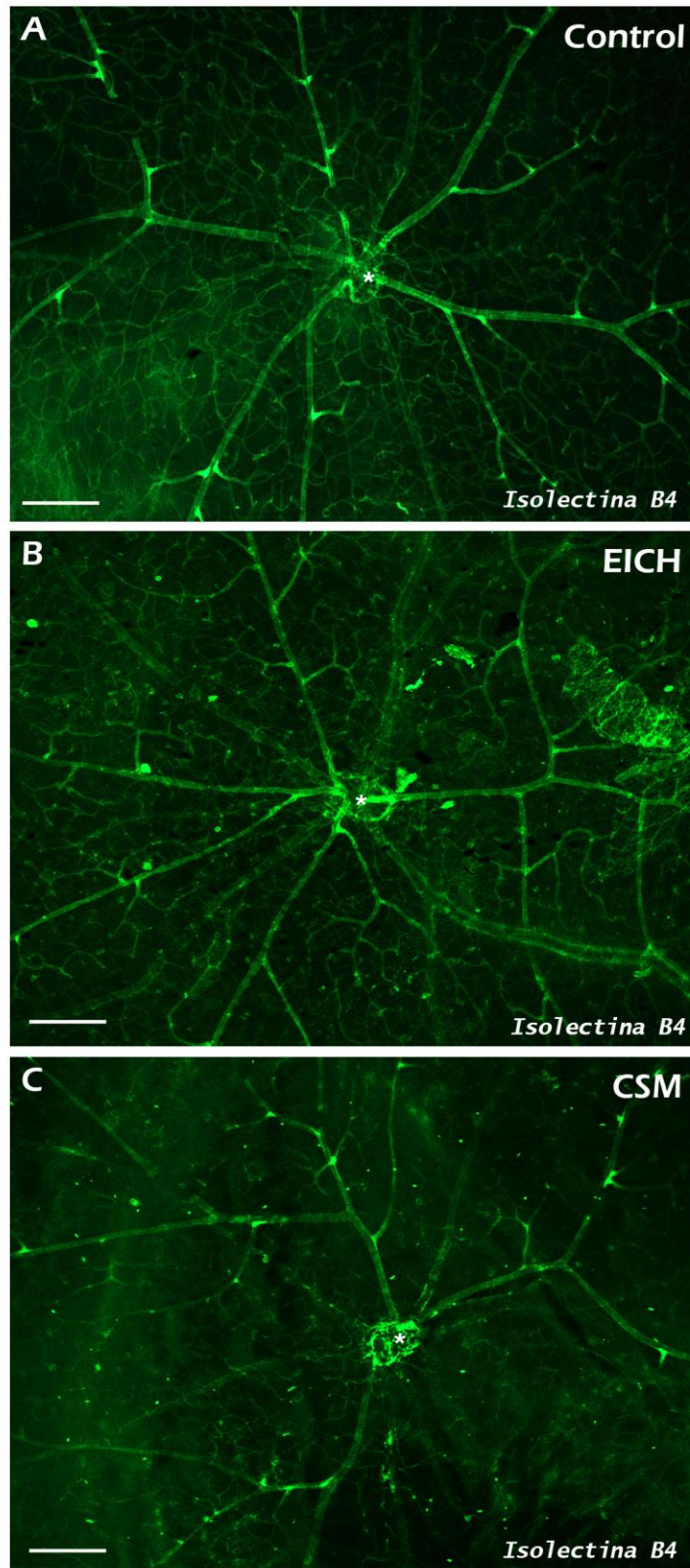


Figura 18: Patrón de marcaje de la vascularización de la retina mediante Isolectina B4. Montaje de retinas in toto. CNO (asterisco). **A.** Retina control; **B.** Retina EICH ; **C.** Retina CSM. En ninguno de los casos encontramos lesiones isquémicas, ni neovascularización. Barra de escala 200 μ m.

6. DISCUSIÓN

6.1. ANIMALES CON EICHO. ANÁLISIS CLÍNICO DE LA SUPERFICIE OCULAR.

En el presente trabajo de tesis doctoral hemos analizado el efecto de la EICHo en el polo posterior del ojo, en concreto en la retina y el nervio óptico, utilizando un modelo de ratón que presenta esta patología que fue puesto a punto en estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación (Pérez et al, 2011; Sánchez-Abarca et al, 2015).

Los datos preliminares obtenidos con este modelo murino de EICHo confirmaban que es un excelente modelo para analizar las causas y progresión de dicha enfermedad en el polo anterior y para ensayar tratamientos terapéuticos para detener dicha patología.

Mediante la utilización de los diferentes parámetros clínicos puestos a punto por Pérez y cols (2011), hemos confirmado que en dicho modelo se producen modificaciones en la superficie corneal, en el párpado y en la glándula lagrimal. Además, hemos ampliado el análisis de la afectación ocular con la medición de la osmolaridad de la lágrima, y la tinción corneal con fluoresceína. Mediante la utilización de este nuevo sistema hemos detectado que la osmolaridad de la película lagrimal de los ratones enfermos es superior a la de los animales control, lo que parece estar en relación con la gravedad clínica que presentan los ratones enfermos. Los análisis estadísticos que confirman esta conclusión forma parte también de la tesis que se ha realiza paralelamente en nuestro grupo por Rafael Martínez-Carrasco. Este es un hallazgo importante ya que en ciertos estudios como el realizado por Schargus et al., proponen que se incluya el aumento de la osmolaridad de la película lagrimal como criterio diagnóstico del EICHo (Schargus et al, 2015).

Además, recientemente el *International Chronic Ocular Graft-vs-Host-Disease Consensus Group* ha descrito un sistema de graduación de la severidad de la EICHo en el que se incluyen algunos de los criterios clínicos analizados en nuestros ratones, como tinción corneal con fluoresceína, la afectación conjuntival y alteraciones en la película lagrimal (Ogawa et al, 2013b).

Por tanto, nuestro modelo de EICHo reúne los criterios suficientes para el diagnóstico de EICHo, lo que nos permite usarlo para evaluar una posible afectación del polo posterior ocular en la EICHo.

6.2. ANIMALES CON EICHO SIN TRATAR Y TRATADOS CON CSM. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA RETINA Y LA CNO.

En nuestro estudio hemos realizado, por primera vez, un análisis inmunohistoquímico de la retina en un modelo murino de EICHo, para detectar las posibles modificaciones de las diferentes poblaciones retinianas debido a la enfermedad. Diferentes autores habían descrito previamente algunos hallazgos secundarios al trasplante de médula ósea en la retina y en la CNO en humanos (Arock-Mettinger et al, 1991; Brown et al. 1982; Coskuncan et al, 1994; Nassiri et al, 2013). En ningún caso se ha llegado a establecer con exactitud si las modificaciones encontradas se deben a la EICHo, o a efectos secundarios de la ciclosporina y de la radiación, utilizados ambos en el proceso del trasplante.

A pesar de que en nuestro modelo murino no tenemos la posibilidad de estudiar las alteraciones inducidas por la ciclosporina en nuestro modelo murino (Anderson y Regillo, 2004; Avery et al, 1991; Bernauer et al, 1991), si tenemos la oportunidad de analizar los efectos que la irradiación corporal total pueden producir a nivel de la retina (Zamber y Kinyoun, 1992).

Con el fin de establecer si se producen cambios debidos a la irradiación corporal total, al trasplante de células de médula ósea, o a la EICH, establecimos varios grupos experimentales: el grupo de ratones control, el grupo sometido a TBI, los ratones sometidos a TBI y a trasplante de células de médula ósea de ratones C57BL/6 y los ratones con EICH.

No hay mucha información sobre la afectación de la retina en la enfermedad EICHo en humanos y no hemos encontrado estudios que traten sobre la afectación del polo posterior en la EICHo en modelos experimentales.

La mayor parte de los trabajos disponibles se refieren a alteraciones clínicas provocadas por la enfermedad (Coskuncan et al, 1994). Jabs y cols. describen la presencia de un infiltrado en la coroides en pacientes con EICHo, formado por grandes eosinófilos que recuerdan a histiocitos, acompañado de células inflamatorias crónicas, siendo este infiltrado muy parecido al que aparece en el bazo y en el tejido linfoide en personas con EICH (Jabs et al, 1989).

En nuestro trabajo hemos analizado las alteraciones histológicas provocadas por la enfermedad en el tejido retiniano, tras la evaluación con diferentes marcadores.

6.2.1. Marcadores de inflamación y apoptosis

- **Complejo TCR/CD3⁺**

El complejo TCR/CD3⁺ tiene un papel muy importante en el desarrollo de la EICH, ya que es necesario para la unión entre las células dendríticas del receptor y los linfocitos T del donante, dando lugar a diferentes cascadas inflamatorias que conducen al desarrollo del EICH (Ferrara y Antin, 2004).

En nuestro caso no hemos encontrado positividad en el grupo de ratones enfermos, lo que sugiere que en nuestras retinas no se produce una reacción inflamatoria apreciable que implique la participación de los linfocitos T CD3⁺.

En presencia de EICH, Rojas y cols. encontraron positividad para este complejo a nivel de la conjuntiva (Rojas et al, 2005) y Ogawa y cols. lo localizaron a nivel de la glándula lagrimal en la región periductal pero no analizaron la retina (Ogawa et al, 2003b).

La ausencia de inflamación a nivel de la retina podría justificarse por la existencia de la barrera hematorretiniana que es una estructura que limita el intercambio de moléculas entre el torrente sanguíneo y el parénquima nervioso, en función de su tamaño y polaridad (Abbott et al, 2006). Dicha barrera podría actuar de freno frente a la acción inflamatoria.

- **Caspasa 3**

Las caspasas son mediadores esenciales en el proceso de apoptosis. En nuestro estudio hemos utilizado este marcador con el fin de saber si existe, a nivel retiniano y/o en la CNO de nuestros grupos de ratones algún indicio de apoptosis, ya sea debida a la EICHo o a la radiación.

En lo que se refiere a la EICHo, se ha descrito la presencia de cuerpos apoptóticos a nivel de los párpados y la piel periocular (Shulman et al, 2006), en la glándula lagrimal (Hassans et al, 2005), en la conjuntiva y en la córnea (Pérez et al, 2011), pero no se había analizado previamente en la retina.

Por otro lado, se ha detectado que en la retinopatía por radiación se produce una isquemia retiniana, que puede dar lugar a pérdida de visión, y glaucoma neovascular (Parsons et al. 1994), caracterizada por la

presencia de microaneurismas, telangiectasias, hemorragias, exudados algodonosos y neovascularización (Niemer-Tucker et al, 1999), que suele aparecer en humanos tras dosis de irradiación superiores a 45 Gy (Parsons et al, 1994). Por otra parte, hay trabajos en los que se demuestra un aumento de la apoptosis celular a nivel de las capas más internas de la retina en ratones sometidos a dosis de 16 Gy de irradiación (Müther et al, 2010).

En nuestro caso no hemos encontrado apoptosis en ninguno de los grupos sometidos a estudio lo que podría explicarse por un lado porque o bien no hay afectación de la retina por la EICHo, o porque la dosis de irradiación de 850cGy usada para la TBI, si da lugar a alteraciones en la retina pero no es lo suficiente elevada para producir apoptosis.

6.2.2. Marcadores de células neurales

En cumplimiento de nuestro objetivo de estudiar la posible afectación de la retina por la EICH, hemos analizado también distintos tipos neuronales

- **PKC α**

En la retina del ratón la PKC α se expresa en la células bipolares de bastón, aunque también son positivas algunas células amacrinas (Grünert y Martin, 1991; Haverkamp y Wäsle, 2000). En condiciones normales, las células bipolares de bastón son fuertemente positivas en toda su extensión y se pueden diferenciar claramente sus dendritas en la CPE, y su axón que atraviesa la CNI hacia la CPI. En la parte más cercana al vitreo de la CPI se localizan los extremos de los axones, que ahí realizan sinapsis con las células ganglionares correspondientes.

No hemos encontrado alteraciones de este marcador en ninguno de nuestros grupos, lo que indica que no se producen variaciones en las células bipolares de bastón ni en los fotorreceptores, ni alteraciones de sinapsis en la CPE y la CPI. La presencia de inflamación, muerte celular, muerte de fotorreceptores y alteración de los vasos sanguíneos podría producir modificaciones en el marcaje de PKC α ; pero, puesto que no hemos detectado ninguna variación, consideramos que dichas poblaciones celulares no se han visto afectadas por la patología propia de la EICH ni por la irradiación.

- **Pax 6**

El Pax 6 es una proteína que expresan las células ganglionares y las células amacrinas (Martin et al. 1992). La ausencia de alteraciones para este marcador en los grupos estudiados en este trabajo de Tesis Doctoral, implica que no hay modificaciones en las células ganglionares ni en las células amacrinas, lo que podría explicarse por la ausencia de inflamación, muerte celular y alteraciones en los vasos sanguíneos.

6.2.3. Marcadores de células gliales

Hemos analizado también la glía retiniana (células de Müller, astrocitos y microglía) puesto que se ha descrito que durante el envejecimiento o en condiciones patológicas, éstas células experimentan cambios estructurales y funcionales, entre ellos hipertrofia, proliferación, migración y secreción de ciertas sustancias, todo lo cual se conoce como activación glial (Kandel et al, 2000; Raivich et al, 1999).

Este comportamiento de la glía puede tener un papel dual, dependiendo del proceso y de la envergadura del daño. Por un lado la activación haría posible la participación de la glía en procesos neuroprotectores mediante la limpieza y la reparación tisular; o por el contrario, sería capaz de exacerbar los procesos de muerte celular y jugar, por tanto, un papel neurotóxico (Marc et al, 2008).

- **GFAP**

En nuestro estudio, no hemos encontrado alteración en la expresión de GFAP en las retinas de los diferentes grupos estudiados, por lo que es probable que no existan alteraciones a nivel de los astrocitos ni de las células de Müller.

Normalmente la GFAP es el componente mayoritario de los filamentos intermedios del citoesqueleto de los astrocitos maduros (Dahl y Bignami, 1973). Se sabe que de manera precoz tras una lesión retiniana, se producen cambios en la expresión de esta proteína apareciendo procesos positivos que atraviesan la retina en toda su extensión, somas positivos localizados en la CNI, y engrosamiento de los procesos en la zona vitreal, llegando algunos de los procesos a la zona escleral,, siendo esto un signo claro de la presencia de una respuesta gliótica (Hernández y Pena, 1997).

A diferencia de los astrocitos, las células de Müller en condiciones normales expresan vimentina como proteína fundamental de su citoesqueleto, siendo los niveles de GFAP bajos en el individuo adulto. Sin

embargo, de manera temprana al daño la glía de Müller se reactiva, produciéndose entonces un incremento de GFAP que se puede asociar a cicatrices gliales (Bringmann et al, 2006).

No hemos encontrado trabajos que se centren en el estudio de la población glial en modelos experimentales de EICHo. Pero, sí hay trabajos en los que se evalúa la población de astrocitos tras someter a modelos murinos a irradiación letal de 7,5 Gy, seguida de trasplante de MO, en ellos se ha descrito aumento mínimo de la gliosis astrocitaria a nivel cerebral, que coincide en el tiempo con un alto índice de apoptosis celular (Díaz et al, 2011).

Sin embargo, en nuestro estudio no hay ninguna modificación de la expresión de esta proteína por lo que consideramos que el daño retiniano tiene que ser mínimo o inexistente, de modo similar a lo que observamos al realizar el estudio de las diferentes poblaciones neuronales.

- **Glutamina sintetasa**

No observamos alteraciones a nivel de las células de Müller en ninguno de nuestros grupos de ratones, ya que no apreciamos diferencias entre los distintos grupos experimentales en la expresión de la enzima GS.

En la retina, cuando se produce una lesión o en procesos degenerativos, las células de Müller se comportan como glía reactiva. Se piensa que la reacción glial representa un intento de la célula de Müller para proteger a la retina del daño y promover la reparación del tejido, limitando su remodelación, especialmente en los primeros estadios tras la lesión (Bringmann y Wiedemann, 2012). En consecuencia, cabe pensar que no debe producirse ningún tipo de degeneración en el caso de la retina con EICH que pueda provocar una reacción de las células de Müller.

- **Iba-1**

Al contrario de lo que ocurre con los otros dos tipos de células gliales, si hemos encontrado un aumento significativo de la población de células Iba1⁺ tanto en los grupos de ratones sometidos a trasplante de médula ósea, como en los ratones EICH sin tratar y en los EICH tratados con CSM, en comparación con los ratones del grupo control, pero no hay diferencias significativas entre estos tres grupos. El aumento de células se distribuye de forma uniforme en todas las capas de la retina, siendo mayor el incremento celular en regiones centrales de la retina próximas al nervio óptico que en regiones más periféricas. Además,

hemos constatado una serie de cambios morfológicos en las células Iba1⁺, respecto a las células Iba1⁺ del grupo de ratones control.

En los ojos controles, la microglía presenta una morfología ramificada, mientras que en los ojos sometidos a TBI se aprecia una retracción de sus prolongaciones, encontrando células Iba1⁺ pseudopódicas y de aspecto ameboideo en los ratones MO, EICH y CSM.

Estos hallazgos nos hacen pensar que las modificaciones están en relación con la irradiación y el trasplante de MO y no están asociadas a la EICH, ya que no existen diferencias, en cuanto a número y morfología de las células Iba1⁺ entre los ratones MO y los ratones EICH.

La microglía está considerada la célula inmunocompetente del sistema nervioso central (SNC) y es la encargada de la vigilancia de este tejido (Tezel, 2013). Estas células son capaces de detectar de manera precoz cambios potencialmente lesivos y, gracias a ello, mediar en la restauración de la homeostasis del tejido (Díaz et al, 2012; Hsu et al, 2003). De manera similar a lo que ocurre en el cerebro, la microglía en la retina está implicada en diferentes patologías, entre ellas la retinosis pigmentaria, la degeneración macular asociada a la edad o la retinopatía diabética (Combadiere et al, 2007; Gaucher et al, 2007).

Durante estos procesos, la microglía está activada y se caracteriza por exhibir una serie de cambios morfológicos, procesos proliferativos, migratorios y otras modificaciones inmunofenotípicas (Graeber y Streit, 2010).

La microglía tiene un origen mesodérmico, se origina desde los macrófagos del saco vitelino que migran al interior del sistema nervioso central durante la embriogénesis temprana y son independientes de las células hematopoyéticas de la médula ósea, originándose anteriormente a las células hematopoyéticas (Ginhoux et al, 2010). Los progenitores de microglía entran en el cerebro y la retina a través de los vasos sanguíneos desarrollados en la circulación fetal (Hanisch y Kettenmann, 2007; Navascues et al, 1995). En la retina, los precursores de la microglía se introducen a través de la retina marginal y del nervio óptico por los vasos sanguíneos del cuerpo ciliar y del iris, y los de la retina y la coroides (Caicedo et al, 2005; Díaz-Araya et al, 1995). Después del nacimiento, a diferencia de las células dendríticas y macrófagos que derivan de las células mieloides de la médula ósea, que están constantemente siendo reemplazados por células mieloides progenitoras, la microglía se mantiene en estado quiescente, denominándose microglía residente y una vez activada puede proliferar para mantener su número (Kaneko et al, 2008; Monif et al, 2010). Pero también

se ha descrito que, bajo diversas condiciones fisiopatológicas, la microglía puede derivar de la MO (Chen et al, 2012).

Así se ha observado que la irradiación puede promover el injerto de microglía derivada de células mieloides de la MO en tejido neuronal (Davoust et al, 2008). Existen estudios en ratones trasplantados con células de MO marcadas con GFP, tras TBI e irradiación craneal, en los que se ve que los macrófagos perivasculares y la microglía del cerebro son reemplazados por células GFP⁺ derivadas de la MO (Eglitis y Mezey, 1997; Priller et al, 2001; Simard y Rivest, 2004). En trabajos realizados en la retina, como el de Xu y cols. se observó en la retina lo mismo que en el cerebro: la microglía era reemplazada por precursores derivados de la MO 6 meses después del trasplante con células de MO en ratones previamente irradiados (Chen et al, 2012; Xu et al, 2007). Sin embargo, cuando los ojos son protegidos con placas de plomo durante la irradiación, Kaneko y cols, encuentran pocas células derivadas de MO en la retina a los 12 meses post-irradiación y post-trasplante (Ajami et al, 2007; Kaneko et al, 2008; Mildner et al, 2007; Müther et al, 2010). Estudios recientes han demostrado que los progenitores derivados de la MO pueden dar lugar a células microglía-like Iba1⁺ F4/80⁺ en el SNC tras irradiación (Ajami et al, 2007; 2011; Mildner et al, 2007; Müther et al, 2010).

Todos estos estudios, al igual que los resultados obtenidos en nuestro trabajo, sugieren que la irradiación da lugar a que las células progenitoras de la MO se injerten en el tejido neuronal, aunque el mecanismo no está bien definido. A dosis altas la irradiación puede causar un daño en el sistema nervioso y en el tejido neural de la retina (Chen et al, 2012), por lo que podría pensarse que la irradiación induce una respuesta para-inflamatoria en la retina de los ojos no protegidos, dando lugar a la expresión de diferentes quimiocinas como la CCL2, CXCL12 y la CX3CL1 y diversos componentes de complemento, responsables del reclutamiento de células mieloides derivadas de la MO (Chen et al, 2012). Sin embargo, a dosis bajas de irradiación esto resulta menos probable. La irradiación induce cambios en la permeabilidad de los vasos sanguíneos, lo que puede posibilitaría la entrada de células derivadas de la MO a través de la barrera hematoencefálica, y la barrera hematorretiniana (Igarashi et al, 2007). Hay estudios que demuestran que la retina es más sensible a dosis bajas de irradiación que el cerebro (Jin et al, 2016), por lo que es más probable que las células de microglía derivadas de la MO entren en la retina con mayor facilidad que en el cerebro (Igarashi et al, 2007). Con todos estos datos, creemos que el aumento de microglía que se produce en nuestro caso es debido a la irradiación y no a la EICH.

En lo que se refiere a los cambios morfológicos, bajo condiciones fisiológicas la microglía madura se encuentra en un estado quiescente o de reposo, caracterizada morfológicamente por ser células muy ramificadas, gracias a lo cual son capaces de relacionarse con el entorno de forma activa (Nimmerjhan et al, 2005) y participar en la defensa, en la regulación de la actividad neuronal y en el mantenimiento de la homeostasis extracelular (Hanisch y Kettenmann, 2007). En condiciones hostiles la microglía se reactiva, produciéndose en ella cambios morfológicos, entre los que clásicamente destacan la hipertrofia celular, adaptando una morfología pseudopódica, y la retracción de sus prolongaciones, antes de producirse la retracción total de las mismas lo que acaba dando a la microglía un aspecto ameboideo similar al de los macrófagos (Beynon y Walker, 2012; Walker et al, 2014).

Recientemente se han descrito dos fenotipos de microglía activa, la microglía M1 y la microglía M2 (Hu et al, 2015). La microglía M1 se caracteriza por producir factores pro-inflamatorios destructivos y suele expresarse más tardíamente que la microglía M2, en respuesta a un daño (Jin et al. 2016). Por otro lado la microglía M2 produce numerosos factores tróficos y protectores y tiene una alta capacidad de fagocitosis para limpiar los residuos celulares (Jin et al, 2016; Orihuela et al, 2014). A la luz de estos trabajos publicados pensamos que la microglía activa que hemos encontrado en nuestro estudio podría pertenecer al subtipo M2, ya que no hemos detectado indicios de inflamación ni daño tisular en la retina, pero serian necesarios más estudios para confirmarlo.

6.2.4. Marcador de vascularización

Con el fin de visualizar los vasos de la retina y analizar sus posibles modificaciones debidas a la EICH, hemos utilizado como marcador vascular la isolectina B4.

Diversos autores han descrito la presencia de exudados algodonosos a nivel de la retina en pacientes sometidos a trasplante de médula ósea. Los exudados algodonosos son lesiones localizadas en capas internas de la retina, secundarias a lesiones isquémicas focales. Algunos autores han relacionado estas lesiones con la radiación (Brown et al, 1982; Webster et al, 1995), y otros directamente con la EICH (Coskuncan et al, 1994). Además, como ya hemos explicado con anterioridad, la retinopatía por radiación es una patología secundaria a isquemia de la retina (Niemer-Tucker et al, 1999).

En el modelo experimental de EICH que hemos estudiado, tanto en las retinas de los ratones del grupo control y las retinas de los ratones con EICH sin tratar con CSM, hemos observado la existencia de una

capa superficial vascular y una profunda, que se extiende desde el nervio óptico a áreas periféricas. Pero no encontramos diferencias entre las retinas de los diferentes grupos experimentales, con ausencia de lesiones isquémicas y una posible neovascularización secundaria a esta en los ratones EICH.

Por otro lado, analizamos con especial atención la vascularización de los ratones EICH a los que se inyectó CSM. Se ha demostrado que las CSM pueden diferenciarse hacia células endoteliales y células de músculo liso vascular e incorporarse en la pared de nuevos vasos sanguíneos (Ball et al, 2007). El crecimiento de nuevos vasos sanguíneos puede ser beneficioso en patologías como el infarto cardiaco (Sato et al, 2001), pero la neovascularización a nivel ocular puede tener consecuencias devastadoras (Cheung et al, 2010). En nuestro trabajo, a pesar de que no hemos encontrados CSM a nivel de la retina, hemos querido analizar el efecto que potencialmente podrían producir la presencia de éstas en la retina a nivel de la vascularización; pero utilizando la isolectina B4 no hemos encontrado lesiones neovasculares en las retinas de los ratones sometidos a tratamiento con CSM.

6.3. ANIMALES TRATADOS CON CSM. ANÁLISIS DE LA MIGRACIÓN DE CSM HACIA LA RETINA.

Uno de los objetivos de nuestro estudio es comprobar si la inyección subconjuntival de las CSM es una vía segura para el tratamiento de la EICHo a nivel de la córnea y si estas células se restringen a esta localización o migran hacia la retina, lo que podría ser un factor de riesgo en el tratamiento de la EICHo mediante esta terapia.

La presencia de CSM a nivel de la retina y en otras estructuras del segmento posterior, tras inyección de éstas a nivel subconjuntival, no ha sido evaluada con anterioridad. Esta vía fue descrita por Sánchez-Abarca y cols. en su modelo experimental de afectación corneal en la EICHo; pero estos autores analizaron solamente analizaron su localización a nivel de la córnea donde, encontraron migración y diferenciación de éstas en células corneales (Sánchez-Abarca et al, 2015). Utilizando este mismo modelo animal, nosotros hemos analizado la posibilidad de que las células administradas por vía subconjuntival lleguen hasta la retina.

En nuestros experimentos, las CSM GFP⁺ humanas infundidas por vía subconjuntival en ratones BALB/C con EICH no se han detectado en ningún caso en la retina. Las razones para ello pueden ser dos: por un lado podríamos pensar que las alteraciones de la retina en la EICHo son inexistentes o muy leves y, por tanto, no ser capaces de atraer a las CSM hacia la retina; y por otro lado, cabe pensar que la cantidad de células que migran hacia la retina sea muy pequeña como para ser detectada con las técnicas empleadas por nosotros en este estudio.

En la bibliografía consultada, hemos encontrado estudios en los que se ha realizado la inyección de CSM en la región subconjuntival como tratamiento del ojo seco secundario a patologías autoinmunes e inflamatorias diferentes a la EICHo (Lee et al, 2015; Sánchez-Abarca et al, 2015; Yao et al, 2012). En la mayoría de los trabajos, se ha detectado disminución de la inflamación y el daño tisular a nivel de la superficie ocular; sin embargo, el número de CSM que se encontraban próximas a la inyección era muy escaso (Lee et al, 2015; Yao et al, 2012). En ninguno de estos estudios se ha analizado el polo posterior ocular. aunque lo más probable es que estas células no se hayan desplazado hacia regiones más alejadas como el polo posterior ocular.

En lo que se refiere al tratamiento, *in vivo*, con CSM de patologías a nivel del polo posterior ocular han sido varias las vías de administración utilizadas. Así, por ejemplo se ha comprobado que mediante **inyección intravenosa** (Yang et al. 2010) e **inyección intraperitoneal** de CSM (Kim et al, 2016), en modelos animales de degeneración retiniana, no se han detectado dichas células formando parte de la retina. En ambos casos se sugiere que el mecanismo de actuación de dichas células podría ser de tipo paracrino.

En la inyección intravítrea de CSM en un modelo experimental de glaucoma, se evidenció una mejoría en la supervivencia de las células ganglionares de la retina; pero la mejoría se atribuyó a la liberación de factores tróficos por parte de las CSM ya que no se confirmó su diferenciación a otros subtipos celulares (Johnson et al, 2010). Esta misma vía de administración se ha usado en un modelo murino de retinopatía diabética, en el que se observaron la mayoría de las CSM a nivel intravítreo y tan solo alguna célula aislada adopta un posible fenotipo de célula ganglionar de la retina, astrocito o pericito, descartando la diferenciación de las CSM en células neurales o perivasculares (Ezquel et al, 2016).

La inyección subretiniana de CSM para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad, ha revelado la posibilidad de diferenciación de éstas en fotorreceptores (Hou et al, 2010).

En todos los estudios anteriores, en los cuales la inyección de CSM se hizo directamente en el polo posterior, apenas se apreció integración de las CSM en la retina. En nuestro caso la inyección de las células se ha realizado en una región muy alejada de la zona nerviosa del ojo, por lo que nuestros resultados parecen concluyentes en cuanto a la no localización de CSM en esta región ocular. Lo que no podemos descartar es que algunos de los factores que producen dichas células puedan llegar a zonas alejadas de la región de inyección.

Estos resultados son claves para apoyar que el tratamiento de EICHo con CSM mediante inyección subconjuntival es seguro a nivel de la parte nerviosa del ojo, no habiendo migración de dichas células a ninguna de las capas retinianas ni a ninguna región de la retina, ni de la cabeza del nervio óptico.

Además, como hemos visto en los resultados sobre los diferentes marcadores de neuronas y células gliales, no hay variaciones significativas en los animales controles respecto a los tratados con CSM. Esto supone que aunque pudiera existir un efecto paracrino de las CSM, no se ven afectadas las diferentes poblaciones neurales de la retina, por lo que se confirma que esta técnica es biosegura a nivel retiniano.

7. 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:

Primera: El modelo animal empleado en este trabajo, se podría establecer como modelo de la EICHo, permitiendo avanzar en el conocimiento de la fisiopatología de la EICHo tanto a nivel del polo anterior como del polo posterior del ojo.

Segunda: Ni las poblaciones neuronales ni macrogliales de la retina ni del nervio óptico se ven afectados por la EICHo. No existe muerte celular ni procesos inflamatorios asociados a esta patología.

Tercera: La irradiación total junto con el trasplante de células de la médula ósea parecen ser los responsables del aumento de población de las células microgliales Iba1⁺ así como del cambio de su morfología hacia formas pseudopódicas y redondeadas con capacidad fagocítica.

Cuarta: La inyección subconjuntival con CSM para tratar la EICHo es un proceso seguro y no afecta a la porción neural del ojo. Los resultados de esta tesis son claves para diseñar posibles ensayos clínicos con CSM en la superficie corneal, tanto en patologías como la EICHo como en otras patologías que afecten a la córnea.

Quinta: El tratamiento con CSM en ratones con EICHo no produce neovascularización en ninguna región ni capa de la retina. Esto confirma que dicho tratamiento es bioseguro para el correcto funcionamiento de la parte nerviosa del sistema visual.

8. BIBLIOGRAFÍA

A

- Abesada-Terk G, Jr., Quintero M, Przepiorka D, et al. Diminished tear production in BMT recipients not receiving radiation. *Bone Marrow Transplant*. 1990;6:151.
- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature*. 2006; 7: 41-53.
- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, et al. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci*. 2007; 10:1538–1543.
- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, et al. Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat Neurosci* . 2011; 14: 1142–1149.
- Alberts B. *Biología molecular de la célula*. 3ª edición. Barcelona: Omega; 1996.
- Altan-Yaycioglu R, Gencoglu EA, Akova YA, et al. Silicone versus collagen plugs for treating dry eye: results of a prospective randomized trial including lacrimal scintigraphy. *Am J Ophthalmol*. 2005;140:88-93.
- Anderson NG, Regillo C. Ocular manifestations of graft versus host disease. *Curr Opin Ophthalmol*. 2004; 15: 503-7.
- Arnhold S, Absenger Y, Klein H, et al. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells rescue photoreceptor cells in the dystrophic retina of the rhodopsin knockout mouse. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2007; 245: 414-422
- 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.
- Arock-Mettinger E, Skorpik F, Grabner G, et al. Manifestations of graft-versus-host disease following allogenic bone marrow transplantation. *Eur J Ophthalmol*. 1991; 1 :28-32.
- Aslan H, Zilberman Y, Kandel L, et al. Osteogenic differentiation of noncultured immunisolated bone marrow-derived CD105⁺ cells. *Stem Cells*. 2006; 24: 1728-37.

- Atkinson K. Chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* 1990; 5: 69-82.
- Avery R, Jabs DA, Wingard JR, et al. Optic disc edema after bone marrow transplantation: possible role of cyclosporine toxicity. *Ophthalmology.* 1991 ; 98: 1294-301.

B

- Bacigalupo A. Antithymocyte globulin for prevention of graft-versus-host disease. *Curr Opin Hematol.* 2005; 12: 457-62.
- 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.
- Balasubramaniam SC, Raja H, Nau CB, et al. Ocular graft-versus-host disease: A review. *Eye Contact Lens.* 2015; 41: 256-61.
- Ball SG, Shuttleworth CA, Kielty CM. Mesenchymal stem cells and neovascularization: role of platelet-derived growth factor receptors. *J Cell Mol Med.* 2007; 11: 2012-30.
- Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis.* 2004; 16: 1-13.
- Baird K, Pavletic SZ. Chronic graft versus host disease. *Curr Opin Hematol.* 2006; 13: 426-35.
- Benítez del Castillo J, Durán de la Colina, JA, Rodríguez Ares, MT. *Superficie Ocular.* Madrid: Sociedad Española de Oftalmología; 2004.
- 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.
- Bernauer W, Gratwohi A, Keller A, et al. Microvasculopathy in the ocular fundus after bone marrow transplantation. *Ann Intern Med.* 1991; 115: 925 -930.

- Beynon SB, Walker FR. Microglial activation in the injured and healthy brain: what are we really talking about? Practical and theoretical issues associated with the measurement of changes in microglial morphology. *Neuroscience*. 2012; 225: 162-71.
- Blecha C, Wolff D, Holler B, et al. Veification of new grading scale for ocular chronic graft-versus-hot disease developed by the German-Austrian-Swiss consensus conference on chronic GVHD. *Ann Hematol*. 2016; 95: 493-99.
- Boya J, Calvo J, Prado A. The origin of microglial cells. *J Anat*. 1979; 129: 177-86.
- Boya J, Calvo JL, Carbonell AL, et al. A lectin histochemistry study on the development of rat microglial cells. *J Anat*. 1991; 175: 229-236.
- Bray LC, Carey PJ, Proctor SJ, et al. Ocular complications of bone marrow transplantation. *Br J Ophthalmol*. 1991; 75: 611-4.
- Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, et al. Müller cells in the healthy and disease retina. *Prog Retin Eye Res*. 2006; 25: 397-424.
- Bringmann A, Wiedemann P. Müller glial cells in retinal disease. *Ophthalmologica*. 2012; 227: 1-9.
- Brown GC, Shields JA, Sanborn G, et al. Radition retinopathy. *Ophthalmology*. 1982; 82: 1494-1501.
- Bussow H. The astrocytes in the retina and optic nerve head of mammals: a special glía for the ganglion cell axons. *Cell Tissue Res*. 1980; 206: 367-78.

C

- 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; 97: 1329-37

- Caicedo A, Espinosa-Heidmann DG, Piña Y, et al. Blood-derived macrophages infiltrate the retina and activate Müller glial cells under experimental choroidal neovascularization. *Exp Eye Res.* 2005; 81: 38-47.
- Calonge M. The treatment of dry eye. *Surv Ophthalmol.* 2001; 45 Suppl 2:S227-39.
- Caplan AI. Osteogenesis imperfecta, rehabilitation medicine, fundamental research and mesenchymal stem cells. *Connect Tissue Res.* 1995; 31: 9-14.
- 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.
- 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.
- 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.
- Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnik G, et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood.* 1980; 56: 289-301.
- Centeno CJ, Busse D, Kisiday J, et al. Increased knee cartilage volume in degenerative joint disease using percutaneously implanted, autologous mesenchymal stem cells. *Pain Physician.* 2008; 11: 343-53.
- Chakravarthy U, Gardiner TA: Endothelium-derived agents in pericyte function/dysfunction. *Prog Retin Eye Res.* 1999; 18: 511.
- Chen M, Zhao J, Lou C, et al. Para-inflammation-mediated retinal recruitment of bone marrow-derived myeloid cells following whole-body irradiation is CCL2 Dependent. *Glia.* 2012; 60: 833-42.

- Cheng LL, Kwok AKH, Wat NMS, et al. Graft versus host disease associated conjunctival chemosis and central serous chorioretinopathy after bone marrow transplant. *Am J Ophthalmol.* 2002; 134: 293-5.
- Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. *Lancet.* 2010; 376: 124-36.
- Cogan DG, Kuwabara T: The mural cell in perspective, *Arch Ophthalmol.* 1967; 78:133.
- Combadiere C, Feumi C, Raouf W, et al. CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *J Clin Invest.* 2007; 117: 2920-28.
- Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol.* 1999; 181: 67-73.
- 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.
- Cosar CB, Cohen EJ, Rapuano CJ, et al. Tarsorrhaphy: clinical experience from a cornea practice. *Cornea.* 2001; 20: 787-91.
- Coskuncan NM, Jabs DA, Dunn, et al. The eye in bone marrow transplantation VI. Retinal complications. *Arch Ophthalmol.* 1994; 112: 372-379.
- 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.* 2006; 12: 375-96.

D

- Dahl D, Bignami A. Immunochemical and immunofluorescence studies of the glial fibrillary acidic protein in vertebrates. *Brain Res.* 1973; 61: 279-93.

- Davoust N, Vuailat C, Androdias G, et al. From bone marrow to microglia: Barriers and avenues. *Trends Immunol.* 2008; 29: 227–234.
- 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.
- 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.
- DEWS. 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.
- DEWS 2. 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.
- Díaz D, Recio JS, Baltanás FC, et al. Long-lasting changes in the anatomy of the olfactory bulb after ionizing irradiation and bone marrow transplantation. *Neuroscience.* 2011; 173: 190-205.
- Díaz D, Lepousez G, Gheusi G. Bone marrow cell transplantation restores olfaction in the degenerated olfactory bulb. *J Neurosci.* 2012; 32: 9053-9058.
- Diaz-Araya CM, Provis JM, Penfold PL, et al. Development of microglial topography in human retina. *J Comp Neurol.* 1995; 363: 53-68.
- 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.
- Djamgoz MBA, Petruv R, Yasui S, et al. Modulation of chromatic difference in receptive field size of H1 horizontal cells in carp retina: dopamine-and APB- sensitive mechanisms. *Neurosci Res.* 1998; 30: 13-24.

- 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.

E

- Eglitis MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94:4080–4085.
- Eng LF, Vanderhaeghen JJ, Bignami A, Gerstl B. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res*. 1971; 28: 351-4.
- Engel LA, Wittig S, Bock F, et al. Meibography and meibomian gland measurements in ocular graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 2015; 50: 961-7.
- Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*. 2000; 109: 235-42.
- Ezquel M, Urzua CA, Montecino S, et al. Intravitreal administration of multipotent mesenchymal stromal cells triggers a cytoprotective microenvironment in the retina of diabetic mice. *Stem Cell Res Ther*. 2016; 7: 42.

F

- Fawcett DW. *Tratado de Histología*. 12ª edición. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 1995.
- Ferrara JL, Deeg HJ. Graft-versus-host disease. *N Engl J Med*. 1991; 324: 667-74.
- Ferrara JLM, Antin J. The pathophysiology of graft-versus-host disease. En: Forman SJ, Blume KG, Negrin S, et al. *Thomas Hematopoietic Cell Transplantation*. 4ª edición. USA: Wiley-Blackwell; 2004.
- 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.

- Fine BS, Yanoff M. The retina. En: Fine BS, Yanoff M, editors. Ocular histology. 2ª edición. Hagerstown Md: Harper & Row; 1979.
- Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Mayani H. Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. Rev Invest Clin. 2006; 58: 498-511.
- Franklin RM, Kenyon KR, Tutschka PJ, et al. Ocular manifestations of graft-vs-host disease. Ophthalmology. 1983; 90: 4-13.
- Friedenstein AJ, Piatetzky S, II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. J Embryol Exp Morphol. 1966; 16: 381-90.
- Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. Transplantation 1968; 6: 230-47.
- Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulangina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Exp Hematol. 1976; 4:267-274.
- Friedenstein AJ. Marrow stromal fibroblasts. Calcif Tissue Int. 1995; 56 Suppl 1:S17.
- Frucht-Pery J, Sagi E, Hemo I, et al. Efficacy of doxycycline and tetracycline in ocular rosacea. Am J Ophthalmol .1993; 116: 88-92.
- Fu CT, Srevatan D. Laser-induced ocular hypertension in albino CD-1 mice. Invest Ophthalmol VisSci. 2010; 51: 980-90.
- Fu QL, Zhang Y, Su YH, et al. Increasing expression of microglia in the retina after optic nerve transection in rats. Zhonghua Yan Ke Za Zhi. 2011; 47: 1084-1088.
- 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.

G

- Gaucher DF, FAU CJ, Paques MF, et al. Microglial changes occur without neural cell death in diabetic retinopathy. Vision Res. 2007; 47: 612-23.
- Geneser F. Histología. 2ª edición. Buenos aires: Editorial médica Panamericana; 1994.

- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. 2010; 330: 841-5.
- Graeber MB, Streit WJ. Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010; 119: 89-105.
- Gratwohl A, Gloor B, Hahn H, et al. retinal cotton-wool patches in bone-marrow-transplant recipients. *N Engl J Med*. 1983; 308: 1101.
- Green WR. Retina. En: Spencer WH, editors. *Ophthalmic Pathology: An Atlas and Textbook*. 4ª edición. Philadelphia: Saunders; 1996.
- Grünert U, Martin PR. Rod bipolar cells in the macaque monkey retina: immunoreactivity and connectivity. *J Neurosci*. 1991; 11: 2742-58.

H

- Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*. 2007; 10: 1387-94.
- 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.
- 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.
- Haverkamp S y Wässle H. Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *J Comp Neurol*. 2000; 424: 1-23.
- Hayreh SS: The central artery of the retina: its role in the blood supply of the optic nerve, *Br J Ophthalmol*. 47:651, 1963.
- Hernandez MR, Pena JD. The optic nerve head in glaucomatous optic neuropathy. *Arch Ophthalmol*. 1997; 115: 389-395.
- Hess AD, Bright EC, Thoburn C, et al. 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.

- Hettinga YM, Verdonck LF, Fijnheer R, et al. Anterior uveitis: a manifestation of graft-versus-host disease. *Ophthalmology*. 2007; 114: 794-797.
- Hirst LW, Jabs DA, Tutschka PJ, et al. The eye in bone marrow transplantation. I. Clinical study. *Arch Ophthalmol* 1983; 101: 580-4.
- Hitchcock PF, Macdonald RE, VanDeRyt JT, et al. Antibodies against Pax 6 immunostain amacrine and ganglion cells and neuronal progenitors, but not rod precursors, in the normal and regenerating retina of goldfish. *J Neurobiol*. 1996; 29: 399-413.
- Höllander H, Makarov F, Dreher Z, et al. Structure of the microglia of the retina: sharing and division of labour between astrocytes and Müller cells. *J Comp Neurol* 1991; 313: 587-603.
- Hou HY, Liang HL, Wang YS, et al. A therapeutic strategy for choroidal neovascularization based on recruitment of mesenchymal stem cells to the sites of lesions. *Mol Ther*. 2010; 10: 1837-45.
- Hsu J, Lee Y, Chang C, et al. Sleep deprivation prior to transient global cerebral ischemia attenuates glial reaction in the rat hippocampal formation. *Brain Res*. 2003; 984: 170-181.
- Hu X, Leak RK, Shi Y, et al. Microglial and macrophage polarization-new prospects for brain repair. *Nat Rev Neurol*. 2015; 11:56-64.
- Huo DM, Dong FT, Yu WH, et al. Differentiation of mesenchymal stem cell in the microenvironment of retinitis pigmentosa. *Int J Ophthalmol*. 2010; 3: 216-219.
- Hou L, Hong T. Stem cells and neurodegenerative diseases. *Sci China C Life Sci*. 2008; 51: 287-94.
- Hutnik CM, Probst LE. Argon laser punctal therapy versus thermal cauterization for the treatment of aqueous deficiency dry eye syndrome. *Can J Ophthalmol*. 1998; 33: 365-72.

I

- Igarashi T, Miyake K, Hayakawa J, et al. Apoptotic cell death and regeneration in the newborns retina after irradiation prior to bone marrow transplantation. *Curr Eye Res.* 2007; 32: 543-553.

J

- Jabs DA, Hirst LW, Geen R. The eye in bone marrow transplantation. II. Histopathology. *Arch Ophthalmol.* 1983; 112: 372-379.
- Jabs DA, Wingard J, Green WR, Farmer ER, et al. The eye in bone marrow transplantation. III. Conjunctival graft-vs-host disease. *Arch Ophthalmol.* 1989; 107: 1343-8.
- Jack MK, Jack GM, Sale GE, et al. Ocular manifestations of graft-v-host disease. *Arch Ophthalmol.* 1983; 101: 1080-4.
- Jackson L, Jones DR, Scotting P, et al. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *J Postgrad Med.* 2007; 53: 121-7.
- Jankowski RJ, Deasy BM, Huard J. Muscle-derived stem cells. *Gene Ther.* 2002; 9: 642-7.
- Jeon CJ, Strettoi E, Masland RH. The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci.* 1998; 18: 8936-46.
- Johnson TV, Bull ND, Hunt DP, et al. Neuroprotective effects of intravitreal mesenchymal stem cell transplantation in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 248: 1415-22.
- Jin N, Gao L, Fan X, Yu H. Friend or foe? Resident microglia vs bone marrow-derived microglia and their roles in the retinal degeneration. *Mol Neurobiol.* 2016 Jun 18. DOI 10.1007/s12035-016-9960-9.
- Jin X, Yamashita T. Microglia in central nervous system repair after injury. *J Biochem.* 2016; 159: 491-6.

- Joly S, Pernet V, Samardzija M, et al. Pax6-positive Müller glia cells express cell cycle markers but do not proliferate after photoreceptor injury in the mouse retina. *Glia*. 2011; 59: 1033-1046.
- Jun JE, Goodnow CC. Scaffolding of antigen receptors for immunogenic versus tolerogenic signaling. *Nat Immunol*. 2003; 4: 1057-64.

K

- Kandel ER, Schwart JH, Jessel TM. Principles of neural science. 4ª edición. New York: McGraw Hill; 2000.
- Kaneko H, Nishiguchi KM, Nakamura M, et al. Characteristics of bone marrow-derived microglía in the normal and injured retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008; 49: 4162-8.
- Karashima K, Fujioka S, Harino S. Two cases of central serous chorioretinopathy treated with photocoagulation after bone marrow transplantation. *Retina*. 2002; 22: 651-653.
- Karim MM, Fujisawa K, Kanomata N, et al. Glial fibrillary acidic protein expression in the developing human retina. *Kobe J. Med Sci*. 1996; 42: 111-7.
- Kernan NA, Collins NH, Juliano L, et al. Clonable T lymphocytes in T cell-depleted bone marrow transplants correlate with development of graft-v-host disease. *Blood*. 1986; 68: 770-3.
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, et al. Physiology of microglia. *Physiol Rev*. 2011; 91: 461-553.
- Kiang E, Tesavibul N, Yee R, et al. The use of topical cyclosporin A in ocular graft-versus-host-disease. *Bone Marrow Transplant*. 1998; 22: 147-51.
- Kim RY, Anderlini P, Naderi AA, et al. Scleritis as the initial clinical manifestation of Graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Am J Ophthalmol*. 2002; 133: 843-5.

- Kim SK. Ocular Graft versus Host Disease. En: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, editors. Cornea. St Louis: Mosby; 2004.
- Kim SK. Update on ocular graft versus host disease. *Curr Opin Ophthalmol.* 2006; 17: 344-8.
- Kim SK, Park JM, Kong T, et al. Retinal angiogenesis effects of TGF- β 1 and paracrine factors secreted from human placental stem cells in response to a pathological environment. *Cell Transplant.* 2016; 25: 1145-57.
- Kinnaird T, Stabile E, Brunett MS, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res.* 2004; 94: 678-85.
- Kolb H, West RW. Synaptic connections of the interplexiform cell in the retina of the cat. *J Neurocytol.* 1977; 6:155-70.
- Kolb H, Linberg KA, Fischer SK. Neurons of the human retina: a Golgi study. *J. Comp. Neurol.* 1992; 318: 147-87.
- Kolb H, Fernandez E y Nelson R (2000) Webvision. <http://webvision.med.utah.edu/>
- 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.
- Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 1996; 19: 312-8.
- 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.

L

- 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.
- 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.
- 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.
- Lee MJ, Ko AY, Ko JH, et al. Mesenchymal stem/stromal cells protect the ocular surface by suppressing inflammation in an experimental dry eye. *Mol Ther*. 2015; 23: 139-46.
- Lewis GP, Erickson PA, Kaska DD, et al. An immunocytochemical comparison of Muller cells and astrocytes in the cat retina. *Exp Eye Res*. 1988; 47: 839-53.
- Lelli GJ, Jr., Musch DC, Gupta A, et al. Ophthalmic cyclosporine use in ocular GVHD. *Cornea*. 2006; 25: 635-8.
- 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.
- Lillo C, Velasco A, Jimeno D, et al. The glial design of a teleost optic nerve head supporting continuous growth. *J Histochem Cytochem*: 2002; 50: 1289-302.

M

- Maitra B, Szekely E, Gjini K, Laughlin MJ, Dennis J, Haynesworth SE, Koc ON. Human mesenchymal stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: 597-604.

- Marc RE, Jones BW, Watt CB, et al. Extreme retinal remodeling triggered by light damage: implications for age related macular degeneration. *Mol Vis.* 2008; 14: 782-806.
- Marquard T, Ashery-Padan R, Yrejewski N, et al. Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell.* 2001; 105: 43-55.
- Martin P, Carriere C, Dozier C, et al. Characterization of a paired box and homeobox-containing quail gene (Pax-QNR) expressed in the neuroretina. *Oncogene.* 1992; 7: 1721-8.
- 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.
- Mencucci R, Rossi Ferrini C, Bosi A, et al. Ophthalmological aspects in allogenic bone marrow transplantation: Sjogren-like syndrome in graft-versus-host disease. *Eur J Ophthalmol.* 1997; 7: 13-8.
- Menger N, Pow DV, Wäsle H. Glycinergic amacrine cells of the rat retina. *J Comp Neurol.* 1998; 401: 34-46.
- 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.
- Mildner A, Schmidt H, Nitsche M, et al. Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR21 monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci.* 2007; 10: 1544–1553.
- Mimura T, Nakashizuka T, Kami J, et al. Bilateral choroidal detachment after cord blood stem cell transplantation in an adult patient with acute myeloid leukemia. *Int Ophthalmol.* 2012; 35: 379-81.

- Monif M, Burnstock G, Williams DA. Microglia: Proliferation and activation driven by the P2X7 receptor. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010; 42:1753–1756.
- Morgan RV, Abrams KL. Topical administration of cyclosporine for treatment of keratoconjunctivitis sicca in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 1043-6.
- Mori K, Gehlbach P, Ando A, et al. Retina-specific expression of PDGF-B versus PDGF-A: vascular versus nonvascular proliferative retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43: 2001-6.
- Müther PS, Semkova I, Schmidt K, et al. Conditions of retinal glial and inflammatory cell activation after irradiation in a GFP-chimeric mouse model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51: 4831-9.
- Murphy PT, Sivakumaran M, Fahy G, et al. Successful use of topical retinoic acid in severe dry eye due to chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* 1996; 18: 641-2.

N

- Nadri S, Yazdani S, Arefian E, Gohari Z, et al. Mesenchymal stem cells from trabecular meshwork become photoreceptor-like cells on amniotic membrane. *Neurosci Lett.* 2013; 541: 43-48
- Nakamura Y, McGuire BA, Sterling P. Interplexiform cell in cat retina: identification by uptake of gamma- (3H)aminobutyric acid and serial reconstruction. *PNAS.* 1980; 77: 658-661.
- Nakamura T, Ishikawi F, Sonoda K-H, et al. Characterization and distribution of bone marrow-derived cells in mouse cornea. *Inv Ophthalmol Vis Science,* 2005; 46:497-503.
- Nassar A, Tabbara KF, Mahmoud A. Ocular manifestations of graft-versus-host disease. *Saudi J Ophthalmol.* 2013; 27: 215-222.
- Nassiri N, Eslani M, Panahi N, et al. Ocular graft versus host disease following allogenic stem cell transplantation: a review of current knowledge and recommendations. *J Ophthalmic Vis Res.* 2013; 8: 351-8.

- Navascues J, Moujahid A, Almendros A, et al. Origin of microglía in the quail retina: central-to-peripheral and vitreal-to-scleral migration of microglial precursors during development. *J Comp Neurol.* 1995; 354: 209-228.
- 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.
- Newman E, Reichenbach A. The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci.* 1996; 19: 307-12.
- Ng TK, Fortino VR, Pelaez D, et al. Progress of mesenchymal stem cell therapy for neural and retinal diseases. *World J Stem Cells.* 2014; 6: 111-19.
- Niemer-Tucker MM, Sterk CC, de Wolff-Rouendaal D, et al. Late ophthalmological complications after total body irradiation in non-human primates. *Int J Radiat Biol.* 1999; 75: 465-72.
- Nieto-Miguel T, Galindo s, Reinoso R, et al. In vitro simulation of corneal epithelium microenvironment induces a corneal epithelial-like cell phenotype from human adipose tissue mesenchymal stem cells. *Curr Eye Res.* 2013; 38: 933-44.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science.* 2005; 308: 1314-18.

O

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

- 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.
- 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.
- 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.
- Ogawa Y, Shigeto S, Masataka K, et al. Inflammation and pathogenic fibrosis in human ocular chronic graft versus host disease. *Inflammation and Regeneration*. 2008; 28: 7.
- Ogawa Y, Kim SK, Dana R, et al. International Chronic Ocular Graft-vs-Host-Disease (GVHD) Consensus Group: proposed diagnostic criteria for chronic GVHD (Part I). *Sci Rep*. 2013; 3: 3419.
- Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol*. 2016; 173: 649-65.

P

- Parsons JT, Bova FJ, Fitzgerald CR, et al. Radiation retinopathy after external-beam irradiation: analysis of time-dose factors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1994; 30: 765-73.
- Pastor Jimeno JC. *Guiones de oftalmología*. Madrid: Mc Graw Hill; 1999.
- 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.

- Peichl L, González-Soriano J. Morphological types of horizontal cell in rodent retinae: a comparison of rat, mouse, gerbily guinea pig. *Vis Neurosci.* 1994; 11: 501-517.
- 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.
- 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.
- Perez-Simon JA, Sanchez-Abarca I, Diez-Campelo M, et al. Chronic graft-versus-host disease: Pathogenesis and clinical management. *Drugs.* 2006; 66: 1041-57.
- 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.
- Pérez RL, Pérez-Simón JA, Caballero-Velazquez T, et al. Limbus Damage in Ocular Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 17: 270-273, 2011.
- Pourcho RG, Goebel DJ. Immunocytochemical demonstration of glycine in retina. *Brain Res.* 1985; 348: 339-42.
- Priller J, Flugel A, Wehner T, et al.. Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: Use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med.* 2001; 7: 1356–1361.
- 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.
- Püschel AW, GrussP, Westerfield M. Sequence and expression pattern of pax-6 are highly conserved between zebrafish and mice. *Development.* 1992; 114: 643-51.

R

- Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, et al. Neuroglial Activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanism and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev.* 1999; 30: 77-105.
- Recio JS, Álvarez-Dolado M, Díaz D, et al. Bone marrow contributes simultaneously to different neural types in the central nervous system through different mechanisms of plasticity. *Cell transplantation.* 2011; 20: 1179-1192.
- Reichenbach A, Siegel A, Rickmann M, et al. Distribution of Bergmann glial somata and processes: implications for function. *J Hirnforsch.* 1995; 36: 509-517.
- Remington LA. *Clinical Anatomy and Physiology.* 3ª edición. Butterworth-Heinemann; 2011.
- Rio-Hortega P. Microglia. En: *Cytology and cellular pathology of the nervous system.* New York: Penfield; 1932.
- 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.
- 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.
- 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.
- Ross MH y Romrell GIK. (2001). *Histología: texto y atlas color.* Mexico, Ed. Panamericana., 3ª edición.

S

- 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.
- Sánchez-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.
- Sánchez-Abarca LI, Hernández-Galilea E, Lorenzo R, et al. Human bone marrow stromal cells differentiate into corneal tissue and prevent ocular graft-versus-host disease in mice. *Cell Transplant.* 2015; 24: 2423-33.
- 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.
- Sasaki Y, Ohsawa K, Kanazawa H, et al. Iba1 is an actin-cross-linking protein in macrophages/microglia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 286: 292-7.
- Sato T, Iso Y, Uyama T, et al. Coronary vein infusion of multipotent stromal cells from bone marrow preserves cardiac function in swine ischemic cardiomyopathy via enhanced neovascularization. *Lab Invest.* 2001; 91: 553-64.
- Schargus M, Meyer-ter-Vehn T, Menrath J, et al. Correlation Between Tear Film Osmolarity and the Disease Score of the International Chronic Ocular Graft-Versus-Host-Disease Consensus Group in Hematopoietic Stem Cell Transplantation Patients. *Cornea.* 2015; 34: 911-6.
- Sheidow TG, Sexton B, Hooper PL. Vitritis as the primary manifestation of graft-versus-host disease: a case report with vitreous cytopathology. *Can J Ophthalmol.* 2004; 39: 667-71.

- 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.
- 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.
- Simard AR, Rivest S. Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. *FASEB J*. 2004; 18: 998–1000.
- Strettoi E, Masland RH. The number of unidentified amacrine cells in the mammalian retina. *PNAS*. 1996; 93: 14906-11.
- Strouthidis NG, Francis PJ, Stanford MR, et al. Posterior segment complications of graft versus host disease after bone marrow transplantation. *Br J Ophthalmol*. 2003; 87: 1421-3.

T

- 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.
- Tezel G. Immune regulation toward immunomodulation for neuroprotection in glaucoma. *Curr Opin Pharmacol*. 2013; 13: 23-31.
- Thanos S. The relationship of microglial cells to dying neurons during natural neuronal cell death and axotomy-induced degeneration of the rat retina. *Eur J Neurosci*. 1991; 3: 1189-1207.
- Thanos S, Thiel HJ. Mechanisms governing neuronal degeneration and axonal regeneration in the mature retinofugal system. *J Cell Sci*. 1991; 15: 125-34.

- Thanos S, Richter W. The migratory potential of vitally labeled microglial cells within the retina of rats with hereditary photoreceptor dystrophy. *Int J Dev Neurosci.* 1993; 11: 671-680.
- Toubai T, Sun Y, Reddy P. GVHD pathophysiology: is acute different from chronic? *Best Pract Res Clin Haematol.* 2008; 21: 101-17.
- Triviño A, Ramírez JM, Ramirez A, et al. Comparative study of astrocytes in human and rabbit retinae. *Vision Res.* 1997; 37: 1707-1711.

U

- Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol.* 2006; 36: 2566-73.

V

- Versaux-Botteri C, Nguyen-Legros J, Vigny A, et al. Morphology, density and distribution of tyrosine hydroxylase-like immunoreactive cells in the retina of mice. *Brain Res.* 1984; 301: 192-197.
- 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.
- Vogelsang GB, Hess AD, Santos GW. Acute graft-versus-host disease: clinical characteristics in the cyclosporine era. *Medicine.* 1988; 67: 163-74.
- 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.

W

- Walker FR, Beynon SB, Jones Ka, et al. Dynamic structural remodeling of microglia in health and disease: A review of the models, the signals and the mechanisms. *Brain Behav Immun.* 2014; 37: 1-14.

- Webster AR, Anderson JR, Richards EM, et al. Ischaemic retinopathy occurring in patients receiving bone marrow allografts and campath-1G: a clinicopathological study. *Br J Ophthalmol.* 1995; 79: 687-91.
- Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol.* 2007; 25: 139-70.
- Witmer AN, Blaauwgeers HG, Weich HA. Altered expression patterns of VEGF receptors in human diabetic retina and in wxperimental VEGF-induced retinopathy in monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43: 849-57.
- Wulle I, Schnitzer J. Distribution and morphology of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the developing mouse retina. *Brains Res Dev.* 1989; 48: 59-72.

X

- Xu H, Chen M, Mayer EJ, et al. Turnover of resident retinal microglia in the normal adult mouse. *Glia.* 2007; 55:1189–1198.

Y

- Yang Y, Shiao C, Hemingway et al. Suppressed retinal degeneration in aged wild tupe and APPswe/PSIDeltaE9 mice by bone marrow transplantation. *PLoS one.* 2013; 8: e64246.
- Yang Z, Li K, Yan X, et al. Amelioration of diabetic retinopathy by engrafted human adipose-derived mesenchymal stem cells in streptozotocin diabetic rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2010; 248: 1415-22.
- Yao L, Li ZR, Su WR, et al. Role of mesenchymal stem cells on cornea wound healing induced by acute alkali burn. *PloS ONE.* 2012; 7(2):e30842
- Yu S, Tanabe T, Dezawa M, et al. Effects of bone marrow stromal cell injection in an experimental glaucoma model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 344: 1071-1079

- Yuan J, Horvitz HR. A first insight into the molecular mechanisms of apoptosis. *Cell* 2004; 116: S53-6.

Z

- Zamber W, Kinyoun JL. Radiation Retinopathy. *West J Med.* 1992; 157: 530-33.