



**VNiVERSIDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

## TESIS DOCTORAL

**La córnea en la enfermedad injerto contra  
huésped: patología y tratamiento con células  
mesenquimales estromales**

Rafael Martínez-Carrasco Pérez

Salamanca, 2017





**VNiVERSiDAD  
DSALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA  
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN**

**La córnea en la enfermedad injerto contra  
huésped: patología y tratamiento con células  
mesenquimales estromales**

Memoria presentada por Rafael Martínez-Carrasco Pérez  
para optar al grado de Doctor por la Universidad de  
Salamanca con mención de “Doctorado Internacional”

Directores

Profa. Dra. D<sup>a</sup> Almudena Velasco Arranz

Prof. Dr. D. José Aijón Noguera

Salamanca, 2017





DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y PATOLOGÍA  
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN  
INCyL – C/ Pintor Fernando Gallego 1  
37007 Salamanca (España)  
Tel: +34 923 294500 ext. 5334

D. José Aijón Noguera, Catedrático de Biología Celular, y D<sup>a</sup>. Almudena Velasco Arranz, Profesora Titular de Biología Celular

HACEN CONSTAR:

QUE el presente trabajo titulado “*La córnea en la enfermedad injerto contra huésped: patología y tratamiento con células mesenquimales estromales*”, ha sido realizado por el licenciado en Biología D. Rafael Martínez-Carrasco Pérez en el departamento de Biología Celular y Patología de la Universidad de Salamanca y en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León.

QUE ha sido desarrollado bajo nuestra dirección y dentro del programa de doctorado *Neurociencias* de nuestra Universidad.

QUE, en nuestra opinión, reúne todos los requisitos científicos y formales para ser defendido como Tesis Doctoral y así optar al grado de Doctor Internacional por la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, lo firmamos en Salamanca, a veinticinco de octubre de dos mil diecisiete.

El Director

La Directora

Fdo. José Aijón Noguera

Fdo. Almudena Velasco Arranz



# **Agradecimientos**



El trabajo que lleva hacer una tesis doctoral es duro. Toda esta carga de trabajo y estrés (y otros trastornos) sólo es sobrellevable en unas condiciones ambientales adecuadas. Sin una familia o amigos que sirvan de apoyo o sin unos compañeros que ayuden en los momentos difíciles es significativamente improbable sacarla adelante ( $P < 0,001$ ). Por eso, son muchos a quienes tengo que dar las gracias.

Gracias a mi familia, que me lo ha dado todo desde el primer momento de existencia. Trabajar se hace más fácil cuando uno vuelve a una casa donde nunca falta el cariño. A mis padres, por su amor incondicional, porque nunca me ha faltado el apoyo y siempre habéis creído en mí. A mi tía Nines, porque no muchos tienen la suerte de tener otra madre; por quererme y mimarme como a un hijo. A mis hermanas, compañeras de juegos, vivencias y confianzas. Ana, mi compañera de playmobil, con un corazón que ni su potente genio puede hacer sombra. Pilar, la que sobrepasa a Jesús en darse al prójimo; con quien me tocó crecer y crecí, vaya si crecí; en casa y en los bares.

A Eva, Squirtle. Mi trapecio y mi red. Por ser mi soporte vital tantas veces. Por desatascar mi cabeza. Por restar preocupaciones, dejando sólo las que importan. Lo que deparare el futuro da menos miedo porque sé que estarás conmigo. Te quiero.

A mis directores, Aijón y Almudena. Por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto y sacar adelante una tesis doctoral. Por sus consejos, a veces más blandos, a veces más duros, pero siempre ayudándome a crecer como investigador. También a Emiliano, con quien compartir impresiones siempre fue agradable por su emoción con cada resultado.

Al Departamento de Hematología del Hospital Clínico. A Nacho, que me lo ha enseñado todo sobre este modelo de EICH, que me ayudó cuando estaba algo perdido y escuchó mis ideas con interés. A Carmen, Conchi, Rebeca y Teresa por enseñarme tantas cosas.

A Fernando, mi compañero de fatigas. Por tu ayuda y disponibilidad en todo momento, para consejos de pipeta o charlas existenciales. Por hacerme más llevadero este trance. Por los viernes de Julio Iglesias y El Puma. Eres una mente brillante, un corazón generoso y una sensualidad equiparable a Günther.

A los otros miembros del laboratorio y departamento. A Rosario especialmente, porque con ella empezó esta andadura en el mundo de la ciencia. Gracias por acogerme hace años y haberme ayudado siempre desde entonces. A Juan Lara, por su humor, su capacidad de transmitir emoción con los resultados (cuando aún andaba yo con “pehcaos”) y su cerveza, por supuesto. A Ángel, por preocuparse siempre por nosotros, por sus siempre acertados consejos y por sus charlas para arreglar España (aunque esto ya no se arregla). A Maite, por ayudarme con el “corte y confección”.

A todos los doctorandos que han “pasado a mejor vida”. Héctor, mi primer “maestro”, que me acogió junto con Adrián, Miguelón y Maite. Rodri, del 7, siempre sonriente y siempre dispuesto a hacer sonreír. Antonio, del 3, que me ayudó tantas veces.

Gracias a los técnicos varios del INCyL. A Javier Herrero, con quién empecé en el mundo de las PCR y que siempre ha tenido un hueco para mis dudas. A Ana y Alberto.

Muchas gracias a Carmen y Elena, del SEA, por cuidar de mis ratones y buscar siempre hacerme la vida más fácil.

Al laboratorio 15, que me ha acogido como a uno más en la hora del café. A las chicas: Marta, por darme ánimos y cariño; Myriam, por darme todos y cada uno de los papeles que has tenido que hacer para cualquier trámite, para que yo pudiera copiarme; Sara, cuya vida ha dado un giro radical tras conocer a Martes y 13; Rocío, que me toca el culo casi tanto como mi novia. A Medina y Josefa por su buen humor (aunque no me coma lo que me ofreces, Josefa). A Arantxa, por facilitarme las cosas tantas veces. También a los del 13: a Ada y sus intensas locuras, a Adrián y sus intensas borracheras.

Thanks to all the people I have met during my stay in Boston. Pablo, por su cálida acogida y sus consejos; eres un verdadero mentor para mí. Miguel, por su buen humor y estar siempre dispuesto a ayudar. Ashley, for always helping me, for being a friend. Jerome, for teaching me about the culture of fibroblasts. Sara, always laughing. Thanks to Anne, for her advice about immunofluorescence. Ilene Gipson, for inviting me to her Christmas party as one more. Thanks to Elisabeth, the receptionist, for being so kind every single day. Thanks to Jackie, for making things easier with the paperwork.

No por estar al final son menos importantes mis amigos, la familia que elegí y con la que puedo desatar mi locura y sensualidad en su máxima expresión. A Daenerys, por tantos años conmigo, aunque ahora estés lejos; en muchos sentidos yo no estaría aquí sin ti. A Scissors, un hermano más, un miembro *de facto* de mi familia, por estar dispuesto a descargar tensión con la copa o con el mando. A Alex, a quien también conozco de hace tanto, gracias por estar ahí para hablar de cualquier cosa. A Fucken y Pepej, a quienes conocí en la carrera pero parecen uno más entre mis amigos de siempre. La ya Doctora Slagathor, que siempre se preocupa por cómo estás.

# Índice



<b>Abreviaturas.....</b>	<b>19</b>
<b>Summary.....</b>	<b>21</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>25</b>
<b>1.1 La estructura de la córnea.....</b>	<b>27</b>
<b>1.1.1 La córnea es la porción anterior de la túnica fibrosa del ojo.....</b>	<b>27</b>
<b>1.1.2 La córnea consta de seis capas histológicas.....</b>	<b>29</b>
<b>1.1.2.1 El epitelio corneal.....</b>	<b>29</b>
<b>1.1.2.2 La membrana de Bowman.....</b>	<b>31</b>
<b>1.1.2.3 El estroma.....</b>	<b>31</b>
<b>1.1.2.4 La capa de Dua.....</b>	<b>32</b>
<b>1.1.2.5 La membrana de Descemet.....</b>	<b>32</b>
<b>1.1.2.6 El endotelio.....</b>	<b>32</b>
<b>1.2 La córnea es transparente.....</b>	<b>33</b>
<b>1.2.1 La transparencia se debe a la disposición ordenada de las fibras           de colágeno.....</b>	<b>33</b>
<b>1.2.2 Las células corneales producen <i>crystalinas</i>.....</b>	<b>34</b>
<b>1.2.3 La córnea carece de vasos sanguíneos: el privilegio inmune.....</b>	<b>35</b>
<b>1.2.3.1 Barreras anatómicas.....</b>	<b>36</b>
<b>1.2.3.2 Desviación inmune asociada a la cámara anterior (ACAID).....</b>	<b>37</b>
<b>1.2.3.3 Microambiente inmunosupresivo.....</b>	<b>38</b>
<b>1.3 La película lagrimal.....</b>	<b>39</b>
<b>1.3.1 Componentes de la película lagrimal.....</b>	<b>40</b>
<b>1.3.2 El Sistema de Superficie Ocular y la Unidad Funcional Lagrimal.....</b>	<b>41</b>
<b>1.3.3 Enfermedad de la película lagrimal: el síndrome de ojo seco.....</b>	<b>45</b>
<b>1.3.3.1 Clasificación etiopatogénica del ojo seco.....</b>	<b>45</b>
<b>1.3.3.2 La hiperosmolaridad y la inflamación están en el centro del proceso           del ojo seco.....</b>	<b>47</b>
<b>1.3.3.3 Diagnóstico y Tratamientos.....</b>	<b>48</b>
<b>1.4 La enfermedad de injerto contra huésped ocular.....</b>	<b>50</b>

1.4.1	El trasplante de células madre hematopoyéticas.....	50
1.4.2	Fisiopatología de la EICH.....	52
1.4.2.1	<i>EICH aguda</i> .....	53
1.4.2.2	<i>EICH crónica</i> .....	53
1.4.3	EICH ocular.....	55
1.5	Las células mesenquimales estromales.....	57
1.5.1	Origen de las CME.....	57
1.5.2	Denominación y criterios mínimos.....	58
1.5.3	Propiedades de las CME aplicables a su uso en medicina.....	59
1.5.3.1	<i>Potencial de diferenciación</i> .....	60
1.5.3.2	<i>Efectos paracrinos</i> .....	60
1.5.3.3	<i>Propiedades inmunomoduladoras</i> .....	61
1.5.3.4	<i>Las CME “buscan” tejidos dañados</i> .....	62
1.5.4	CME en el tratamiento de EICH.....	62
1.5.5	CME en patologías de la superficie ocular.....	63
2.	Hipótesis y objetivos.....	65
3.	Material y Métodos.....	69
3.1	Animales.....	71
3.1.1	<i>Generación del modelo de EICHo</i> .....	71
3.1.2	<i>Seguimiento de los signos de EICHo</i> .....	72
3.2	Tratamiento con CMEh.....	74
3.2.1	<i>Cultivo de CMEh</i> .....	74
3.2.2	<i>Inyección subconjuntival</i> .....	75
3.3	Osmolaridad.....	77
3.4	Volumen de lágrima.....	77
3.5	Análisis histológico.....	78
3.6	Análisis de imagen.....	79

3.6.1	<i>Pax6</i> .....	79
3.6.2	<i>SPRR1B</i> .....	79
<b>3.7</b>	<b>Análisis de expresión génica</b> .....	<b>80</b>
<b>3.8</b>	<b>Cultivo de células epiteliales corneo-limbares humanas (HCLE)</b> ...82	
3.8.1	<i>Análisis de expresión génica de células HCLE</i> .....	83
3.8.2	<i>Zimografía</i> .....	83
<b>3.9</b>	<b>Análisis estadístico</b> .....	<b>83</b>
<b>4</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>85</b>
<b>4.1</b>	<b>Efecto terapéutico de las CMEh</b> .....	<b>87</b>
4.1.1	<b>Evolución de los signos de EICH</b> .....	<b>87</b>
4.1.1.1	<i>Animales de experimentos 5M</i> .....	87
4.1.1.2	<i>Animales de experimentos 4M</i> .....	90
4.1.1.3	<i>Animales del grupo MO y TBI</i> .....	93
4.1.1.4	<i>Comparación entre experimentos 5M y 4M</i> .....	93
4.1.2	<b>Análisis de la película lagrimal</b> .....	<b>94</b>
4.1.2.1	<i>Puesta a punto del TearLab Osmolarity System para su uso en ratones</i> .....	94
4.1.2.2	<i>Evolución de la osmolaridad y del volumen de lágrima en EICH</i> ..	95
4.1.2.2.1	<i>Animales de experimentos 5M</i> .....	96
4.1.2.2.2	<i>Animales de experimentos 4M</i> .....	97
4.1.3	<b>Análisis histológico</b> .....	<b>100</b>
4.1.3.1	<i>Grosor del epitelio</i> .....	100
4.1.3.1.1	<i>Animales de experimentos 5M</i> .....	101
4.1.3.1.2	<i>Animales de experimentos 4M</i> .....	102
4.1.3.1.3	<i>Comparación entre experimentos 5M y 4M</i> .....	103
4.1.3.2	<i>Infiltración de células inmunes en la córnea</i> .....	103
4.1.3.2.1	<i>Animales de experimentos 5M</i> .....	104
4.1.3.2.2	<i>Animales de experimentos 4M</i> .....	106
4.1.3.2.3	<i>Comparación entre experimentos 5M y 4M</i> .....	107
4.1.3.3	<i>Queratinización del epitelio corneal</i> .....	107

4.1.3.3.1	<i>Pax6</i> .....	107
4.1.3.3.1.1	<i>Animales de experimentos 5M</i> .....	108
4.1.3.3.1.2	<i>Animales de experimentos 4M</i> .....	110
4.1.3.3.1.3	<i>Comparación entre experimentos 5M y 4M</i> .....	111
4.1.3.3.2	<i>SPRR1B</i> .....	112
4.1.4	Análisis de expresión génica.....	115
4.1.4.1	<i>Expresión de factores inflamatorios</i> .....	116
4.1.4.2	<i>Queratinización del epitelio corneal</i> .....	118
4.1.4.2.1	<i>Pax6</i> .....	118
4.1.4.2.2	<i>SPRR1B</i> .....	119
4.2	Efecto de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ en células HCLE.....	120
4.3	Expresión génica en córneas de animales irradiados.....	122
4.4	Migración de CMEh.....	123
4.4.1	Análisis mediante inmunofluorescencia.....	123
4.4.2	Análisis mediante PCR.....	124
5.	<b>Discusión</b> .....	127
5.1	<b>Efecto terapéutico de las CMEh</b> .....	130
5.1.1	Cuestiones sobre la valoración de la EICH ocular.....	130
5.1.1.1	<i>Medición de la osmolaridad de la película lagrimal en ratones</i> .....	131
5.1.2	Efecto de las CMEh EICH en animales 5M.....	132
5.1.3	Efecto de las CMEh EICH en animales 4M.....	135
5.1.3.1	<i>Valoración macroscópica</i> .....	135
5.1.3.2	<i>Evaluación de la película lagrimal</i> .....	136
5.1.3.3	<i>Valoración del epitelio corneal</i> .....	137
5.1.3.4	<i>Inflamación de la córnea</i> .....	140
5.2	<b>Migración de las CMEh</b> .....	142
5.3	<b>Futuras direcciones</b> .....	145
	<b>Conclusiones</b> .....	148

**Bibliografía.....151**



## Abreviaturas

<b><math>\alpha</math>-MSH</b>	$\alpha$ -Melanocyte-stimulating hormone	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon $\gamma$
<b>ACAID</b>	Anterior chamber associated immune deviation	<b>IL</b>	Interleucina
<b>ADDE</b>	Aqueous-deficient dry eye	<b>K3</b>	Queratina 3
<b>ALDH3A1</b>	Aldehído deshidrogenasa 3A1	<b>K10</b>	Queratina 10
<b>APC</b>	Antigen presenting cell	<b>K12</b>	Queratina 12
<b>bFGF</b>	Basic fibroblast growth factor	<b>MCP-1</b>	Monocyte chemoattractant protein-1
<b>CME</b>	Células mesenquimales estromales	<b>MHC</b>	Major histocompatibility complex
<b>CMEh</b>	Células mesenquimales estromales humanas	<b>miHA</b>	Minor histocompatibility antigens
<b>DEWS</b>	Dry eye workshop	<b>MMP</b>	Metaloproteinasa
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's medium	<b>NK</b>	Natural killer
<b>dpt</b>	Días postrasplante	<b>OSDI</b>	Ocular surface disease index
<b>EGF</b>	Epithelial growth factor	<b>PAX6</b>	Paired-box protein 6
<b>EICH</b>	Enfermedad injerto contra huésped	<b>SPR</b>	Small proline-rich
<b>EICL</b>	Efecto injerto contra leucemia	<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>G-CSF</b>	Granulocyte-colony-stimulating factor	<b>TFS</b>	Tampón fosfato salino
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor $\alpha$
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein	<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming growth factor $\beta$
<b>HGF</b>	Hepatocyte growth factor	<b>TIMP</b>	Tissue inhibitors of metalloproteinases
<b>HLA</b>	Human leukocyte antigen	<b>TKT</b>	Transketolase
		<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor



# SUMMARY

## Introduction

Graft versus host disease (GVHD) is a common complication of hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), an established and potentially curative treatment for malignant and benign hematological disorders. As a part of this treatment, lymphocytes are introduced within an immunocompromised host, where they are able to recognize host antigens as foreign. This recognition has a beneficial effect, termed graft versus leukemia (GVL), which allows destruction of malignant cells and reduces the probability of relapse. However, the morbidity and mortality caused by GVHD limits the use of this treatment in a wide number of disorders. Separation of GVL and GVHD has been tried without success, given that the same immune mechanism is involved in both cases.

Ocular involvement is present in 60-90 % of GVHD patients. This ocular GVHD (oGVHD) affects the ocular surface and lacrimal glands, as well as the Meibomian glands, leading to tear film instability. Hence, corneal tissues are exposed to stressful conditions that lead to the loss of the characteristic immune privilege of this part of the eye. The most frequent complication in oGVHD is dry eye, a multifactorial disease characterized by hyperosmolarity of the tear film and inflammation, with damage to the ocular surface. The consequences include the disruption of epithelial barrier, irritation and impaired vision. Although problems derived from oGVHD do not often include loss of vision, they are one of the main causes of deterioration of quality of life.

As the treatment of oGVHD is palliative, usually based in tear substitutes, it is necessary to explore new treatments to improve the prognostic of this debilitating disease. Suppression of immune response has shown some good results, but medications like tacrolimus are not recommended for long-term use and some patients just do not respond to treatment. Mesenchymal stromal cells (MSC) are being used in medical trials as reparative treatment, given their ability to limit tissue destruction and enhance repair in various diseases. MSC, which were first described as resident cells in the bone marrow, have a great differentiation potential. In the last years, their immunomodulatory effects have received special attention and they are being used in a number of immune-mediated diseases with promising results.

The goal of this thesis is to advance in the knowledge of GVHD events in the eye and explore the therapeutic potential of MSC in corneal damage caused by oGVHD, using a well established murine model of the disease.

## **Material and methods**

Bone marrow and splenic cells from C57BL/6J mice (H2<sup>b</sup>) were used to induce GVHD in BALB/c mice (H2<sup>d</sup>) that received total body irradiation (TBI) as conditioning regimen (*GVHD* mice). No manipulated mice (*Control* mice) or mice that received only bone marrow cells after TBI (*BM* mice) served as controls. A group of mice with GVHD were treated with human MSC (hMSC) at day 10 post-transplantation by subconjunctival injection in the right eye (*GVHD+MSC* eyes).

Systemic GVHD and oGVHD were monitored weekly, using previously established scoring systems. Tear condition was evaluated through tear osmolarity and tear volume assessment. Finally, we analyzed corneal damage and inflammation using immunofluorescence in sections and qPCR techniques. Transcription factor Pax6 and the corneal envelope protein SPRR1B were analyzed as markers of squamous metaplasia. Inflammation was studied through detection in the cornea of CD3, a marker of T lymphocytes, and expression of *TNF- $\alpha$*  and *IL-1 $\beta$* .

Gene expression of *MMP9* was also analyzed in mice corneas, as this protease is involved in epithelial barrier disruption. In addition, we performed experiments with a human corneal-limbal epithelial (HCLE) cell line. These cells were exposed to *TNF- $\alpha$*  and *IL-1 $\beta$*  for 48 h and the effect in *MMP9* levels were analyzed by PCR and gel zymography. *PAX6* expression was also evaluated in these cells.

Finally, we explored the possibility that MSC were able to engraft in the cornea. For this purpose, hMSC were transfected with a lentiviral vector to express green fluorescent protein (GFP). Hence, the presence of hMSC in corneal tissue was analyzed by immunofluorescence with antibodies against GFP and human mitochondria. In addition, we performed PCR to detect the possible expression of human *GAPDH*, which would demonstrate the presence of hMSC in the cornea.

## Results and discussion

In the present work we have validated the use of the TearLab osmolarity System in mice. Readings with this system were similar to those obtained with other methods and we obtained good values for intraclass correlation coefficient (ICC), suggesting a good reliability of the procedure.

Two forms of GVHD were noticed, because of the use of two different doses of splenic cells to induce the disease. Mice transplanted with  $5 \times 10^6$  splenocytes (*5M*) developed a more severe GVHD, where the treatment with MSC had no visible effect. Among the corneal alterations caused by the GVHD, thinning of the epithelium and loss of Pax6 was common. In the most serious cases, total loss of Pax6 in epithelial cells and epithelial thickening was observed, a characteristic of the pathological process of squamous metaplasia. Furthermore, we saw evidence of severe inflammation, with T cell invasion in almost all corneas analyzed.

Transplantation with  $4 \times 10^6$  splenocytes (*4M*) resulted in a milder form of GVHD. These mice showed an improvement when they were treated with MSC as reflected by a better evolution of the ocular disease score. Tear osmolarity was increased and tear volume was decreased in *GVHD* mice compared with *BM* mice. These are evidences that a process of ocular dryness takes place in this model of GVHD. In contrast, *BM* and *GVHD+MSC* eyes showed similar values in both parameters.

A thinner epithelium was also observed in *4M* mice, which was not affected by the treatment with MSC. However, detection of Pax6 in corneal epithelium showed a similar pattern in *GVHD* and *Control* mice, and its gene expression was enhanced in *GVHD* corneas. In contrast, Pax6 was reduced in *GVHD+MSC* corneal sections and a non-statistically significant decrease was observed in gene expression. As Pax6 loss has been proposed as a marker for squamous metaplasia, we analyzed SPRR1B to know if keratinization was occurring. Our results showed an increase in SPRR1B staining in *GVHD* eyes that was lower in *GVHD+MSC* mice, which demonstrate that corneal keratinization is less frequent after treatment with hMSC. These results indicate, also, that variations in the expression of *Pax6* do not always correlate with the appearance of keratinizing proteins.

Immune cell invasion also occurred in *4M* mice, as shown by the presence of CD3<sup>+</sup> cells in the cornea of *GVHD* mice. Interestingly, no *GVHD+MSC* cornea presented CD3<sup>+</sup>

cells. Gene expression of *IL-1 $\beta$*  was augmented in some non-treated eyes but not in any treated one. *TNF- $\alpha$*  expression was highly increased in all corneas but in *Control* and *GVHD+MSC*. These results demonstrate that hMSC exerted an anti-inflammatory effect in the cornea of mice with GVHD.

As *TNF- $\alpha$*  was increased also in *MO* mice, we used animals that only received the TBI to know if irradiation was underlying this effect. Our results confirmed this, as well as the effect of irradiation on *Pax6* expression, which was also increased in these *TBI* mice.

The presence of hMSC in the cornea of treated mice was determined by the immunodetection with antibodies against GFP and human mitochondria. Only two *5M* animals, strongly affected by the disease exhibited positive staining for both markers. No staining was found in *4M* mice neither by immunofluorescence nor by PCR detection of the transcript for human *GAPDH*. Therefore, MSC do not migrate to the cornea and the observed effects might be brought about by an action at distance.

Given the important role of MMP9 in epithelial barrier disruption, we analyzed its expression in the cornea of our animals. We found a decrease in *MMP9* expression in *MO* and *GVHD* corneas, compared to *Control* group, but not in *GVHD+MSC* corneas. Since our results were contrary to what was observed in previous studies, we also performed experiments with HCLE cells, to know if the exposure to inflammatory cytokines could explain the decrease in *MMP9* expression. These cells were exposed to *TNF- $\alpha$*  and *IL-1 $\beta$*  for 48 h and the effect in *MMP9* levels were analyzed by PCR and gel zymography. The results point to a complex regulation of the expression of *MMP9*, given that the presence of *IL-1 $\beta$*  results in a decrease in gene expression but an increase in extracellular active *MMP9*.

In summary, we found that the use of MSC could be an effective treatment in oGVHD, as some of its more relevant consequences were reverted or avoided. MSC-treated mice showed better results in tear film measurements, and they had fewer keratinization features. More importantly, inflammation was reduced, decreasing the expression of *TNF- $\alpha$*  and avoiding T-cell infiltration. However, the treatment had no effect in a more severe form of GVHD, generated with a higher dose of splenic cells. The observed effects were not attributable to migration of MSC to corneal tissue.

# **Introducción**



«El ojo tiene dos túnicas en lo más externo, de ellas, la más exterior la llaman los griegos *keratoeidés*, (...) la que está por debajo *choroides*.». Así describe Aulo Cornelio Celso las partes del ojo en su enciclopedia, del siglo I d.C. De esta denominación griega, se calcó más tarde (quizá no directamente, sino a través del árabe) el término *túnica cornĕa*, para designar esta «membrana de consistencia como la del cuerno» (Cortés Gabaudan y Ureña Bracero, 2011). La resistencia mecánica de la córnea es, sin duda, una gran aliada en una de sus principales funciones: ejercer de barrera protectora de las estructuras posteriores del ojo frente al exterior. Además, la córnea es el primer elemento óptico del ojo y es esta función quizá la principal responsable de muchas de las características de nuestro ojo, ya que, para llevarla a cabo, la córnea necesita una condición de vital importancia y que, en principio, supone un escollo para su función de barrera: la córnea ha de ser transparente.

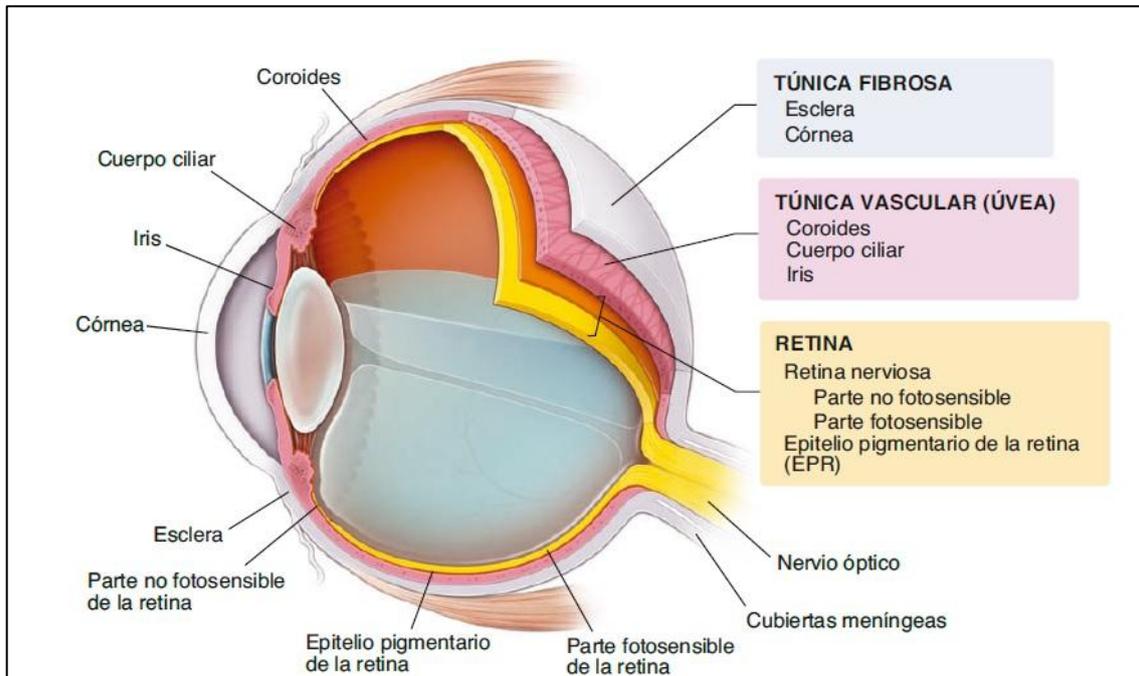
## **1.1 La estructura de la córnea**

### **1.1.1 La córnea es la porción anterior de la túnica fibrosa del ojo**

El ojo es el órgano sensorial del sentido de la vista. Es un órgano complejo, con la función de capturar la luz y transformarla en información para el sistema nervioso. Estructuralmente, el ojo consta de tres cubiertas: la túnica fibrosa, la túnica vascular y la retina (Ross y Pawlina, 2015) (Fig. 1).

- La túnica fibrosa está formada por la esclera y la córnea. Es la más externa de las tres y se encuentra rodeando a las otras dos, salvo en la parte posterior, donde es perforada por el nervio óptico. La esclera está compuesta por tejido conjuntivo denso irregular, que sirve de anclaje para los músculos extrínsecos del ojo. Tiene un color blanco, como consecuencia de la dispersión de todas las longitudes de onda del rango visible, debido a la disposición irregular de las fibras de colágeno. En niños, en cambio, tiene un color azulado, dada su delgadez, mientras que en ancianos va tornando a un tono amarillento, por la acumulación de lipofucsina en sus células. La córnea, que, a diferencia de la esclera, es transparente, ocupa en humanos la sexta parte anterior del ojo, mientras que en otros animales, como el ratón, abarca casi la mitad. Entre la córnea y la esclera hay una zona de transición, denominada limbo esclerocorneal. En continuidad con el limbo también se encuentra la conjuntiva, una membrana mucosa delgada que recubre la esclera y la cara interna de los párpados.

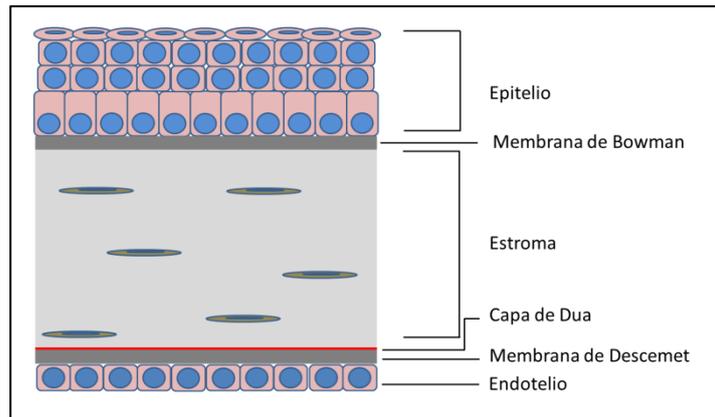
- La túnica vascular o úvea, está formada por la coroides, en su porción posterior, y por el cuerpo ciliar y el iris en la porción anterior. La coroides es una capa rica en vasos sanguíneos y en pigmento, lo que le da un color oscuro y le permite absorber parte de la luz, disminuyendo el brillo en el interior del ojo. En la parte anterior, en la zona del limbo esclerocorneal, la úvea forma el cuerpo ciliar, donde se encuentra el músculo ciliar, encargado de cambiar la forma del cristalino. Extendiéndose por la superficie anterior del cristalino se encuentra, finalmente, el iris, formado por un músculo que le permite actuar de diafragma, regulando la cantidad de luz que alcanza la retina. El iris contiene también células pigmentadas, que le proporcionan una apariencia coloreada.
- La retina es la capa más interna. Se encuentra en la parte posterior del ojo, cubierta por la coroides. Consta de dos componentes principales: un epitelio simple cúbico con células que contienen melanina, denominado epitelio pigmentario de la retina; y el componente nervioso, donde se encuentran los fotorreceptores, entre otras células, y que es parte del sistema nervioso central, con un nervio óptico que sirve de conexión con el encéfalo.



**Figura 1** Diagrama esquemático de las partes del globo ocular, agrupadas en tres túnicas. (Imagen tomada de Ross y Pawlina (2015).

### 1.1.2 La córnea consta de seis capas histológicas

Anton van Leeuwenhoek fue uno de los primeros en observar córneas al microscopio. Diseccionó córneas de distintos animales, desde insectos (mosca, libélula...) hasta grandes mamíferos, (incluso una ballena). Bajo su microscopio, van Leeuwenhoek decía



**Figura 2.** Esquema de las capas histológicas que conforman la córnea.

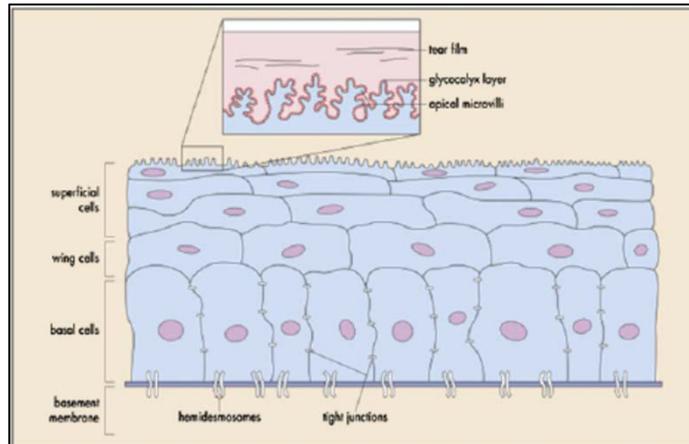
distinguir al menos 16 capas en la córnea de la ballena (Hoole, 1807), lo cual se correspondía en su mayor parte, con el aspecto que dan las distintas fibras de colágeno ordenado del estroma. Sin embargo, hoy definimos la córnea de la mayoría de vertebrados como un órgano de seis capas (Fig. 2): epitelio, lámina limitante anterior o membrana de Bowman, estroma, capa de Dua, lámina limitante posterior o membrana de Descemet y endotelio.

### 1.1.2.1 *El epitelio corneal*

Cuando observamos al microscopio un epitelio que en la naturaleza se encuentra expuesto al mismo tiempo a la abrasión, la desecación y la invasión de patógenos, es frecuente que encontremos que la estrategia seguida para su protección sea la queratinización. Sin embargo, esta no es una opción para el epitelio corneal, que perdería con ello su transparencia. En lugar de esto, este epitelio está cubierto por una capa de glucoproteínas, en parte sintetizadas por las propias células epiteliales.

El epitelio corneal es un epitelio pluriestratificado plano, formado en humanos por entre 5 y 7 estratos celulares y alrededor de 50  $\mu\text{m}$  de espesor medio, que se convierten en más en la periferia. En ratones, en cambio, encontramos entre 4 y 6 estratos celulares en la zona central y este número disminuye hacia la periferia. Estos estratos están formados por distintos tipos de células (DelMonte y Kim, 2011): células escamosas, planas o apicales; células intermedias o alares; y células basales columnares (Fig. 3).

Las células apicales presentan en su superficie pliegues y microvellosidades que, junto con una capa de glicocálix, logran establecer una unión con la capa mucilaginoso de la película lagrimal muy importante para la estabilidad de ésta última. Estas células se descaman con cierta frecuencia, como parte



**Figura 3.** Estratos del epitelio corneal y su estructura. (Tomado de Farjo et al. (2008).

de un proceso de continua renovación epitelial. En su citoplasma presentan queratinas 3 (K3) y 12 (K12), a diferencia de la epidermis, cuyas células producen gran cantidad de queratina 10 (K10) (Dhouailly et al., 2014). Esta es una diferencia importante, ya que en los procesos de metaplasia escamosa se observa una reducción de K3 y K12 y la aparición de K10 y otras proteínas específicas de epitelio queratinizado, como proteínas de la familia SPR (small proline-rich) (Li et al., 2008).

La función de barrera es realizada por el epitelio gracias a que sus células establecen entre sí uniones, como desmosomas y uniones estrechas, más abundantes en las capas superiores; por su parte, las células basales presentan uniones GAP y zónulas adherentes (González-Andrades et al., 2009; Sugrue y Zieske, 1997). Las células del epitelio corneal producen parte la membrana basal, a la cual se anclan las células basales por medio de hemidesmosomas.

Durante el desarrollo, la córnea se forma a partir del ectodermo, como resultado de la acción de numerosos factores, entre los que destaca PAX6 (paired-box protein 6). El gen *PAX6* es considerado un gen maestro del control de la formación del ojo. Se ha demostrado que su ausencia provoca que no se desarrolle el ojo y algunas mutaciones conllevan enfermedades como la aniridia (Gehring y Ikeo, 1999). Por otro lado, la estimulación de su expresión puede generar la formación de ojos ectópicos en otras partes del cuerpo, como se ha demostrado en *Drosophila* e incluso en un vertebrado como *Xenopus* (Gehring y Ikeo, 1999). A diferencia de lo que ocurre en otros tejidos, PAX6 permanece en las células epiteliales de la córnea en el ojo adulto, donde su acción es fundamental para mantener el fenotipo corneal, dado que hay multitud de evidencias

que relacionan su pérdida o desregulación con procesos de metaplasia escamosa (Chen et al., 2013; McNamara et al., 2014; Ouyang et al., 2014).

Las células madre encargadas de la renovación del epitelio corneal se encuentran en el limbo esclerocorneal. El epitelio del limbo se continúa con el de la conjuntiva, cuyas células no migran hacia la córnea gracias a la acción de barrera que ejercen las células madre corneolimbales. Algunas alteraciones pueden provocar la pérdida de estas células, lo que tiene como consecuencia una *conjuntivalización* de la córnea, es decir, la adquisición de características de tejido conjuntival por parte de la córnea, un proceso que se caracteriza por la aparición de vasos sanguíneos y células calciformes en la córnea (Ross y Pawlina, 2015).

Las células epiteliales corneales, expuestas a radiación ultravioleta (UV), no pueden protegerse de esta radiación mediante la acumulación de melanina, que sería un escollo para la transparencia. En su lugar, disponen de otros mecanismos de protección frente a la radiación UV, como la ferritina nuclear, que protege al ADN de la acción de radicales libres (Ross y Pawlina, 2015), y la destrucción de éstos por enzimas como la aldehído deshidrogenasa 3A1 (ADLH3A1) (Chen et al., 2013).

### ***1.1.2.2 La membrana de Bowman***

Entre el epitelio y el estroma se encuentra una capa formada por fibras de colágeno entrelazadas dispuestas al azar: la membrana de Bowman. Los daños infligidos a la membrana de Bowman se resuelven con un proceso de cicatrización, sin que se recupere su estructura y espesor originales y pudiendo afectar a la visión (Ross y Pawlina, 2015).

Existe alguna controversia sobre la existencia de membrana de Bowman en ciertos grupos de animales. Para algunos esta membrana no se encuentra en anfibios e incluso tampoco en ciertos mamíferos en estado adulto (Henriksson et al., 2009; Wilson y Hong, 2000). Sin embargo, para otros esta membrana sí está presente en estos grupos, aunque su grosor varía (Hayashi et al., 2002) y ha sido descrita incluso en peces tales como el pez cebra (Zhao et al., 2006).

### ***1.1.2.3 El estroma***

El estroma es una capa de tejido conjuntivo denso regular, que constituye en humanos aproximadamente el 90% del espesor de la córnea. Está formado por fibras de colágeno tipos I y V, entre las que se entrelaza colágeno tipo VI. Su estructura regular

se debe en parte a la relación del colágeno con proteoglicanos, entre los que destacan el keratocán, el lumicán y el mimecán; y esto constituye una cuestión fundamental en la transparencia de la córnea (Ross y Pawlina, 2015).

La parte celular del estroma está formada predominantemente por queratocitos, un tipo especializado de fibroblastos en estado quiescente, que sintetizan parte de los componentes estructurales del estroma. Por su parte, no está tan bien descrita la población inmune, que, incluso, se pensaba ausente en la córnea hasta hace no muchos años (Blanco, 2015; Knickelbein et al., 2014).

#### ***1.1.2.4 La capa de Dua***

Esta es una capa, de descubrimiento relativamente reciente, cuya existencia ha sido propuesta por Dua et al. (2013). Es una capa acelular muy fina, situada entre el estroma y la membrana de Descemet.

#### ***1.1.2.5 La membrana de Descemet***

La membrana de Descemet es la estructura que separa el estroma del endotelio. Es sintetizada en parte por el endotelio, ya que es su membrana basal (Ross y Pawlina, 2015). En ella se pueden distinguir dos regiones: una más anterior, formada durante el desarrollo fetal; y otra posterior, más homogénea y que se desarrolla a lo largo de la vida adulta (Gonzalez-Andrades, 2011).

#### ***1.1.2.6 El endotelio***

Si en su cara anterior la córnea limita con el exterior, su cara posterior se encuentra con una cavidad, la cámara anterior, rellena de un líquido (humor acuoso) que resulta fundamental para el aporte de nutrientes a la córnea ya que, como se describirá más adelante, ésta carece de vasos sanguíneos. Revistiendo esta cavidad se encuentra una capa de epitelio simple plano: el endotelio.

Las células endoteliales poseen zónulas adherentes y ocluyentes, y desmosomas. Tienen una elevada actividad orientada al intercambio de sustancias entre el estroma y el humor acuoso. Problemas tales como el edema corneal suelen ser consecuencia de una alteración del endotelio, que resulta en un exceso de paso de líquido al estroma (Ross y Pawlina, 2015). La actividad mitótica de las células endoteliales es mínima; por ello, es habitual que con la edad o como consecuencia de traumatismos disminuya la

densidad de células y se den fenómenos de polimegatismo y pleomorfismo en estas células.

## **1.2 La córnea es transparente**

La córnea ha de ser un elemento con gran resistencia mecánica para poder proteger los elementos internos del ojo. Las uniones intercelulares mencionadas antes, además de suponer una barrera para el paso de cuerpos externos hacia el interior del ojo, ayudan a la cohesión del tejido, junto con las estructuras de anclaje a la membrana basal del epitelio. Pero para la resistencia mecánica tiene gran importancia la presencia de un armazón fibroso, constituido principalmente por colágeno. Otros tejidos con gran resistencia a la tracción como la piel o los tendones también poseen una estructura a base de colágeno. Sin embargo, ni estos ni tampoco la esclera son transparentes.

Como ya se ha comentado anteriormente, la función de la córnea como elemento óptico es probablemente la principal presión evolutiva para determinar las características ultraestructurales tanto de la córnea como de las estructuras anejas del ojo. En animales terrestres, la córnea es el principal elemento dióptrico del ojo, contribuyendo a 2/3 de la refracción total que sufre la luz desde que incide en la córnea hasta que llega a la retina (Meek y Knupp, 2015).

### **1.2.1 La transparencia se debe a la disposición ordenada de las fibras de colágeno**

Antes de la aparición de la microscopía electrónica, la hipótesis más aceptada sobre la transparencia de la córnea era que sus componentes debían de tener el mismo índice de refracción. Sin embargo, la visualización de la estructura del estroma mediante microscopía electrónica y los experimentos sucesivos sobre los índices de refracción de sus distintos componentes cambiaron esta idea. La explicación de Maurice (1957), con su “teoría del enrejado” se convertiría en la más aceptada en los años posteriores, aunque con alguna modificación (Benedek, 1971).

La microscopía electrónica y los avances en los métodos de dispersión de rayos X permitieron concluir que la transparencia de la córnea no se podía explicar por el igual índice de refracción de sus componentes. Para empezar, estaba formada por fibras de colágeno y una sustancia mucosa muy hidratada, que tenían diferentes índices de refracción (1,47 y 1,35 respectivamente), por lo que, teóricamente, el tejido debería ser

opaco. Además, Maurice (Maurice, 1957) demostró que la córnea sí desviaba algunos tipos de radiación como los rayos X y propuso que, al incidir la luz sobre una fibra de colágeno, la perturbación de su campo electromagnético se propagaba como ondas secundarias en todas las direcciones, pero que, el pequeño tamaño de las fibras (32 nm) y el uniforme espacio entre ellas (64 nm), producían interferencias destructivas cuya resultante era la transmisión de la luz hacia delante.

Para dicho autor, un supuesto necesario para que se diese el fenómeno de la transparencia era que las fibras estuvieran dispuestas en un perfecto enrejado hexagonal. Más tarde, esta teoría fue modificada por Goldman y Benedek (1967) y Benedek (1971), los cuales, estudiando la córnea de tiburones observaron que la membrana de Bowman era más gruesa que en otras especies (15 % del grosor del estroma) y que la disposición de las fibras de colágeno en ella era incompatible con la teoría de Maurice; sin embargo, la córnea seguía siendo transparente. Concluyeron que no es necesario que las fibras de colágeno se dispongan en un hexágono perfecto, sino que basta con que la distancia entre ellas sea igual o menor que la mitad de la longitud de onda del haz incidente, para producir el efecto de la cancelación de la radiación dispersada. Una explicación más clara y detallada ha sido publicada recientemente por Meek y Knupp (2015).

### **1.2.2 Las células corneales producen *crystalinas***

Las teorías expuestas anteriormente no explican algunas cuestiones importantes, como por ejemplo cómo pasa la luz sin apenas dispersión a través de los distintos estratos de la córnea. Las modernas técnicas de microscopía confocal *in vivo* han permitido una mejor observación de la dispersión de luz por parte de las distintas estructuras del ojo vivo. Las principales fuentes de dispersión son la córnea y el endotelio, lo cual era de esperar, dado que se encuentran en el límite de dos medios con índices de refracción muy diferentes (1,0 en la lágrima y el humor acuoso frente a 1,3 en las células). Sin embargo, dentro de la córnea hay escasa dispersión por parte de las células epiteliales y, en los queratocitos, ésta se limita al núcleo. Además, el cuerpo celular de los queratocitos, que se encuentran entre las fibras de colágeno, puede llegar a los 600 nm, lo que, según el modelo anterior, provocaría la dispersión de casi toda la luz visible (Jester, 2008). Las células de la córnea han de tener alguna característica estructural que explique esa escasa dispersión de luz visible.

Fue Berzelius quien, tras analizar a principios del siglo XIX la estructura del cristalino, acuñó el término cristalininas para referirse a las sustancias gelatinosas que formaban la lente del ojo. A finales del mismo siglo se había determinado que estos componentes eran distintas proteínas, que no se llegaron a caracterizar hasta mediados del siglo XX (Augusteyn, 2004; Schaeffer y Murray, 1950). Y, conforme se describían, se fueron denominando  $\alpha$ -cristalina,  $\beta$ -cristalina... Y así un gran número de ellas en distintas especies de animales vertebrados e invertebrados, comprobándose, además, que existía una especificidad ligada a distintos taxones. Poco a poco, se fueron observando similitudes entre estas cristalininas y diferentes enzimas metabólicas, hasta llegar a la conclusión de que se trataba de la misma proteína que, en algunos casos, había sufrido modificaciones, pero en otros era perfectamente funcional. Estas proteínas, a pesar de tener la estructura adecuada para llevar a cabo su actividad, tienen la característica de que aparecen en unas concentraciones tan elevadas a las cuales su función enzimática resulta prácticamente inexistente.

También en la córnea, Holt y Kinoshita (1973) encontraron una proteína que conformaba el 20-40% de la fracción de proteínas solubles de córneas bovinas, con un peso molecular de 54 kDa, a la que llamaron BCP54. Más tarde, esta proteína se identificó como aldehído deshidrogenasa 3A1 (ALDH3A1) y se ha encontrado muy abundantemente tanto en córneas de humano, como en ratón y en otros muchos mamíferos (Piatigorsky, 1998). Otras proteínas como ALDH1 y TKT han sido encontradas también en proporción abundante, proponiéndose también su papel como cristalininas (Jester et al., 1999). La ALDH3A1 no sólo cumple un papel en la transparencia corneal, sino que también tiene otras importantes funciones como son el filtro de rayos ultravioleta, la eliminación de especies reactivas de oxígeno e incluso puede intervenir en la regulación del ciclo celular (Chen et al., 2013; Muzio et al., 2012; Stagos et al., 2010). Su expresión parece estar mediada por varios factores, entre ellos PAX6 (Davis et al., 2008).

### **1.2.3 La córnea carece de vasos sanguíneos: el privilegio inmune**

Otra de las características de la córnea que hacen posible su transparencia es la ausencia de vasos sanguíneos y linfáticos. El premio Nobel de Medicina, Peter Brian Medawar, realizó experimentos de injertos de piel en diferentes órganos y concluyó que, dada la prolongada supervivencia de los injertos en lugares como la cámara anterior del ojo o el cerebro, estos órganos debían de tener un tipo especial de regulación del sistema

inmune (Medawar, 1948). Para Medawar, la explicación de este fenómeno se debía a la falta de drenaje linfático en dichos órganos, lo que impediría que los antígenos pudieran ser presentados, produciéndose así una especie de “ignorancia inmunológica”. Se acuñó así el término privilegio inmune para definir estas regiones. El privilegio inmune se ha descrito en distintos tejidos, pero es particularmente importante en tres: el útero de mujeres embarazadas, el cerebro y el ojo. El sentido de este fenómeno parece estar relacionado con la importancia de proteger del sistema inmune a los tejidos “inocentes” cuando éstos son especialmente importantes para el individuo y/o su capacidad regenerativa es limitada.

Durante muchos años, la “causa anatómica” fue la explicación aceptada del privilegio inmune, pero en las últimas décadas las investigaciones han permitido encontrar otros mecanismos que regulan dicha característica. Los mecanismos por los que se mantiene este privilegio inmune en la córnea son similares a los que se pueden encontrar en otros tejidos y se pueden agrupar en tres ramas: barreras anatómicas, desviación de la respuesta inmune y microambiente inmunosupresivo.

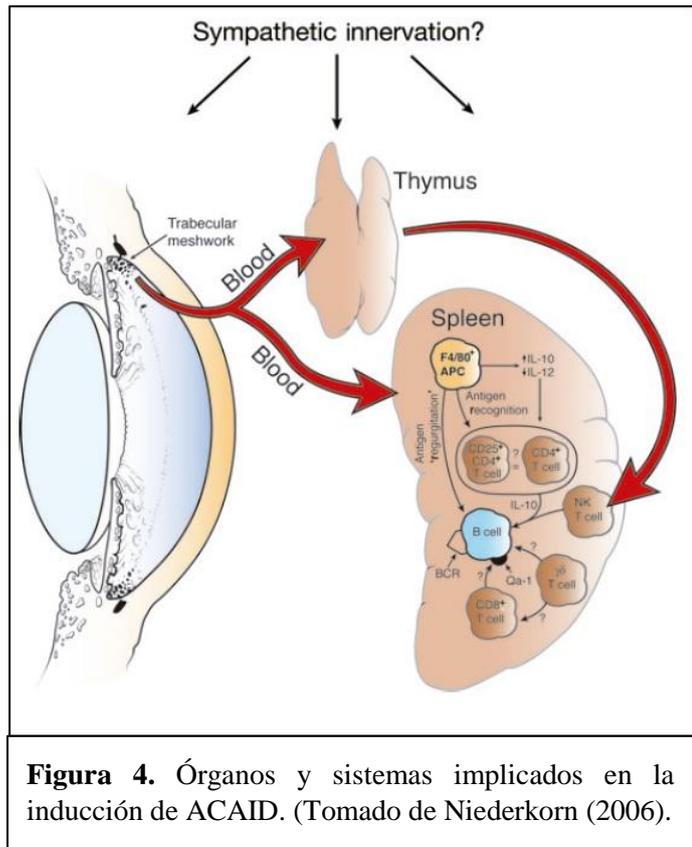
#### ***1.2.3.1 Barreras anatómicas***

La ausencia de vasos sanguíneos y de un drenaje linfático convencionales en la porción anterior del ojo y en el cerebro, han sido observadas por muchos investigadores, desde Galeno hasta los estudios ya mencionados de Medawar. En esta ausencia de vasos sanguíneos juega un papel importante la presencia del receptor para el factor de crecimiento endotelial vascular VEGFR-1, que se encuentra en forma soluble en el medio extracelular de la córnea (Ambati et al., 2006). Pero, además, las células presentadoras de antígeno (APCs) y células derivadas de la médula ósea que se encuentran en la córnea (recientemente descritas), no expresan proteínas MHC clase II, o lo hacen en niveles muy bajos. Además, las células de la córnea presentan también bajos niveles de antígenos MHC clase Ia, lo que las protege de la actividad de linfocitos T citotóxicos (Hori et al., 2010). Por otro lado, la ausencia de moléculas MHC clase Ia expondría a estas células al reconocimiento por células natural killer (NK); esto se resuelve con la expresión de moléculas MHC clase Ib, que impiden la lisis mediada por células NK (Nieder Korn, 2006).

### 1.2.3.2 Desviación inmune asociada a la cámara anterior (ACAID)

A pesar de las barreras anatómicas, algunos antígenos y APCs pueden llegar a atravesar la barrera que separa la porción anterior del ojo del sistema circulatorio/linfático.

Sin embargo, en lugar de inducir respuestas que acaban en daño del tejido “inocente”, la porción anterior del ojo es capaz de modular la acción del sistema inmune, a través del timo y el bazo (Fig. 4), para que se activen células reguladoras que suprimen la inflamación mediada por células colaboradoras (*T helper*)  $T_{H1}$  y  $T_{H2}$ .



**Figura 4.** Órganos y sistemas implicados en la inducción de ACAID. (Tomado de Niederkorn (2006).

Esto ocurre gracias a unas APCs inductoras de tolerancia, que se activan al atrapar antígenos en la cámara anterior; por ello, este mecanismo se conoce como desviación inmune asociada a la cámara anterior (ACAID) (Hori et al., 2010). Estas células, que se identifican como monocitos  $F4/80^+$ , son capaces de inducir ACAID frente a un antígeno determinado al inocularlas en ratones no expuestos a dicho antígeno (Wilbanks y Streilein, 1991). Una vez activas, las APCs  $F4/80^+$  oculares viajan al timo, donde inducen la producción de timocitos  $NK1.1^+$ . Ambos tipos celulares terminan activando linfocitos  $T CD8^+$  en el bazo, que suprime las respuestas  $T_{H1}$  y  $T_{H2}$  (Niederkorn, 2006).

En todo este proceso, se ha demostrado que la inervación simpática de los tres órganos implicados (ojo, timo y bazo) es necesaria, ya que la denervación química de estas vías tiene como consecuencia la pérdida de ACAID (Li et al., 2004), aunque se desconoce su mecanismo de acción.

### 1.2.3.3 Microambiente inmunosupresivo

Además de los mecanismos descritos, el ojo posee factores con actividad inmunomoduladora, tanto solubles como asociados a las membranas celulares, que suponen una última defensa en el caso de que las células efectoras del sistema inmune consigan alcanzar los tejidos oculares.

Entre los factores solubles destaca TGF- $\beta$ , que, además de participar en la generación de ACAID, tiene un efecto inhibitor de células T, macrófagos y células NK. Otros factores producen directamente la apoptosis de las células inmunes, como el ligando de Fas, expresado en la membrana de células de la córnea (Hori et al., 2010; Niederkorn, 2006). También aquí tiene un papel importante el sistema nervioso que inerva la córnea, que libera neuropéptidos como  $\alpha$ -MSH, somatostatina y péptido intestinal vasoactivo (Taylor y Yee, 2003; Taylor, 2005).

### 1.3 La película lagrimal

La córnea, con un epitelio no queratinizado y un estroma no vascularizado, expuesta a un medio exterior seco y a amenazas como la abrasión o la infección por patógenos, requiere para su mantenimiento de otras estructuras que la protejan. Ya en peces se puede observar en la superficie del epitelio corneal una película mucosa, que podría tener función protectora frente a patógenos o, en algunas especies que pasan parte de su ciclo biológico en zonas con niveles bajos de agua, como una forma de proteger frente a la desecación por períodos cortos de tiempo (Collin y Collin, 2000, 1996). En los vertebrados terrestres se produce una lagrimación más compleja, en la que intervienen estructuras especializadas. Esta lagrimación puede clasificarse en basal, refleja o psicoemocional (Murube, 2009).

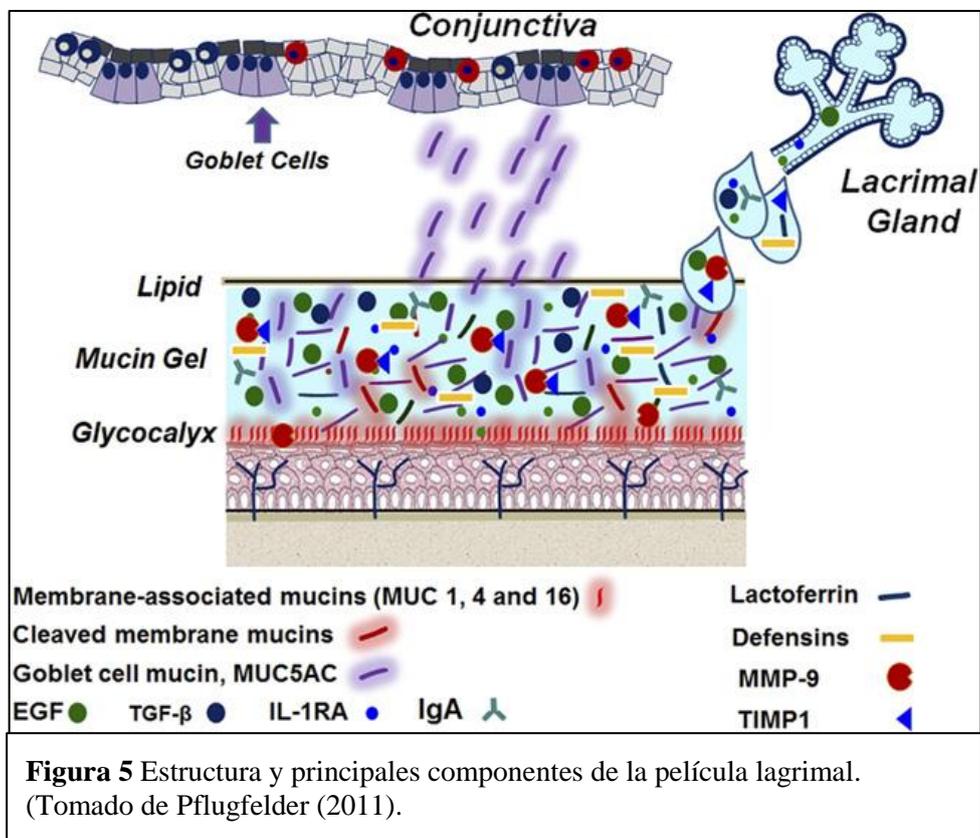
- *Lágrima basal.* Surge con la aparición de los vertebrados terrestres. Ya algunos crossopterigios presentan glándulas mucíparas perioculares (Murube, 2009). La lágrima basal cumple una función relevante en la homeostasis de la córnea, pero quizá su función más importante es la refractiva. En el cálculo del índice de refracción de la superficie ocular siempre se ha despreciado la película lagrimal, pero se ha comprobado que su inestabilidad produce problemas en la visión (Rolando y Zierhut, 2001). La superficie corneal es irregular, con pliegues celulares y células descamándose continuamente, por lo que la película lagrimal soluciona el efecto que esto tiene en la dispersión de la luz. La producción de lágrima basal está controlada por el hipotálamo y tiene un ritmo nictemeral, que supone que la secreción varíe a lo largo del día.
- *Lagrimación refleja.* Ante diferentes estímulos, se produce una respuesta de hipersecreción de las glándulas lagrimales, hasta el punto de sobrepasar la capacidad de vaciado de las estructuras lagrimales y producir un lagrimeo que desborda del párpado. La mayoría de anfibios y reptiles no presentan esta forma de lagrimación. Esta secreción refleja de lágrima, ayuda a eliminar cuerpos extraños y a reparar la córnea dañada. Sin embargo, no sólo la estimulación de la superficie ocular desencadena este reflejo, también los estímulos en nervios de las mucosas oral y nasal son capaces de desencadenarlo. Normalmente este reflejo puede tardar en aparecer desde unos días hasta más de un mes tras el nacimiento (Murube, 2009; Rolando y Zierhut, 2001).

- *Lagrимación psicoemocional.* Aparece en humanos, en los cuales parece tener una función de expresión de necesidad de ayuda o de oferta de apoyo emocional. A pesar de que el llanto aparece pronto tras el nacimiento, la secreción de lágrimas asociada a éste tarda en aparecer varios meses (Murube, 2009).

### 1.3.1 Componentes de la película lagrimal

La película lagrimal puede ser considerada una matriz extracelular líquida, de composición cambiante según la situación, que sirve como ruta de nutrición y también de comunicación para la superficie ocular. Entre sus componentes encontramos enzimas, inmunoglobulinas, lípidos e incluso células polimorfonucleares (Wilson et al., 1989).

En general, la película lagrimal de los mamíferos está compuesta por tres elementos, que clásicamente se han descrito como capas separadas: capa mucosa, capa acuosa y capa lipídica (Mishima, 1965). Sin embargo, más recientemente (Dilly, 1994) se ha propuesto que, en realidad, las capas mucosa y acuosa forman una única capa con un gradiente decreciente de mucinas desde el epitelio hacia la superficie (Fig. 5).



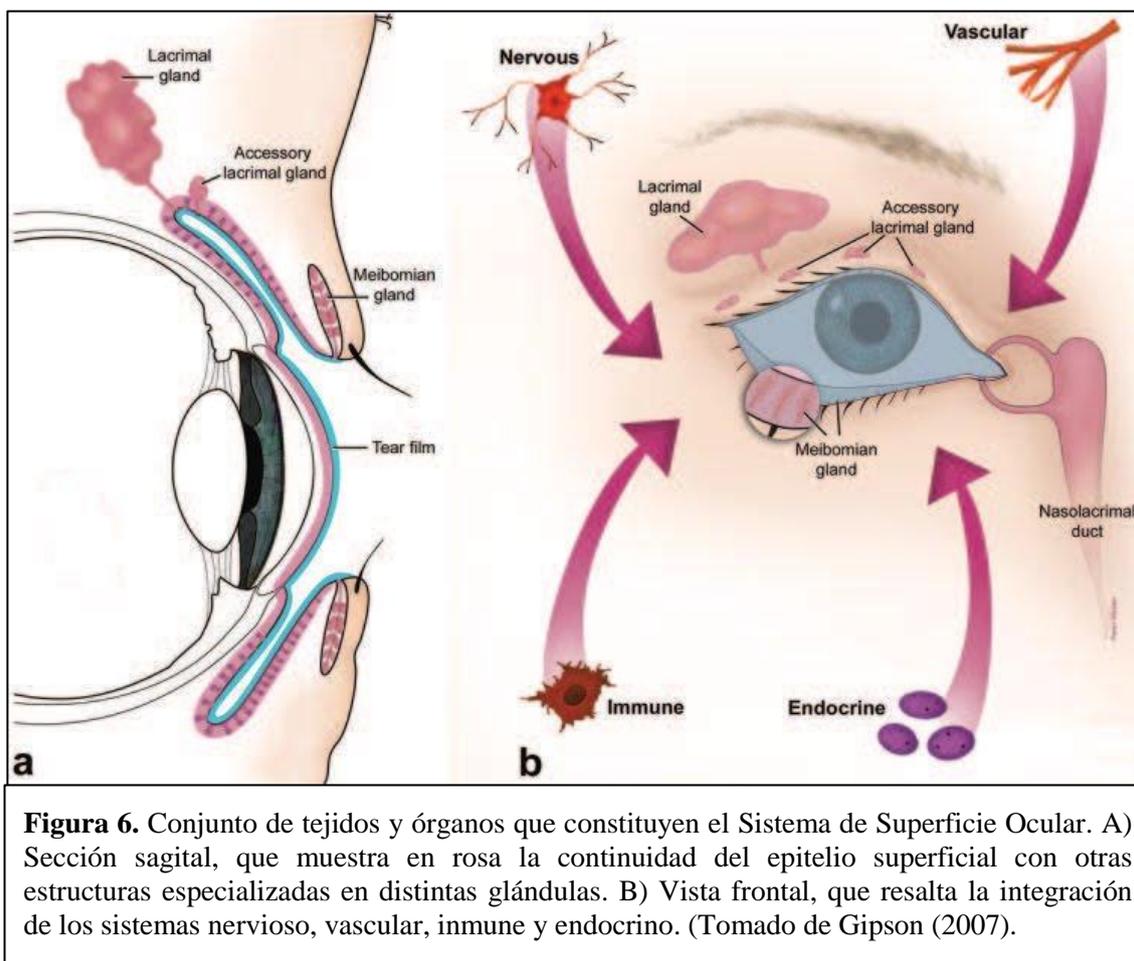
- *Capa mucosa*. La porción mucosa de la lágrima es producida tanto por las células caliciformes de la conjuntiva, como por los epitelios corneal y conjuntival. Estos epitelios poseen en su superficie apical un glicocálix, en el que se detectan mucinas tales como MUC1, MUC4, MUC16 y MUC20 (Argüeso et al., 2003; Inatomi et al., 1995; Pflugfelder et al., 2000). Estas mucinas evitan la adhesión de cuerpos extraños y establecen así una barrera contra patógenos. Pero la mayor parte de las mucinas de la película lagrimal son producidas por las células caliciformes de la conjuntiva (entre ellas destaca MUC5AC) y se encuentran formando un gel, lo que, junto con el glicocálix, permite una mejor adhesión de la lágrima a la superficie ocular. Esta capa es, por tanto, responsable del mantenimiento de una superficie ocular lo suficientemente regular para su función dióptrica. También minimiza el daño al epitelio durante el parpadeo (Rolando y Zierhut, 2001).
- *Capa acuosa*. Es, proporcionalmente, el componente principal de la lágrima. Su contenido provee al epitelio de un entorno apropiado, con nutrientes y oxígeno, y una osmolaridad adecuada. Además, retira desechos celulares, sustancias tóxicas y cuerpos extraños. Se producen cambios en su composición rápidamente, según los requerimientos. En ella podemos encontrar factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) o el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Li et al., 1996; van Setten et al., 1996). También son importantes, por su acción defensiva, compuestos tales como lactoferrina, lisozima, defensinas e inmunoglobulina A (IgA) (Pflugfelder, 2011).
- *Capa lipídica*. Producido por las glándulas de Meibomio, el componente lipídico de la película lagrimal forma una capa superficial cuya principal función es evitar la evaporación de la lágrima. También es relevante para su estabilidad como elemento dióptrico.

### **1.3.2 El Sistema de Superficie Ocular y la Unidad Funcional Lagrimal**

Para la producción y el mantenimiento de la película lagrimal, a lo largo de la evolución han aparecido distintas estructuras que acompañan al ojo. Desde el punto de vista anatómico-histológico, estas estructuras, formadas por distintos tipos de tejidos epiteliales y que constituyen un continuo derivado del ectodermo, se agrupan en el concepto de Sistema de Superficie Ocular. Todas las estructuras que forman este

Sistema de Superficie Ocular actúan sinérgicamente para producir los distintos componentes de la lágrima, y se encuentran en íntima comunicación entre sí. Otro concepto utilizado ampliamente es el de Unidad Funcional Lagrimal, que agrupa los distintos componentes glandulares y la interconexión a través del sistema nervioso, aunque sin tener en cuenta elementos como el párpado y los sistemas endocrino, inmune y vascular (Gipson, 2007).

Los componentes del Sistema de Superficie Ocular son: los epitelios de la córnea y la conjuntiva, las glándulas lagrimales principal y accesorias, las glándulas de Meibomio, las pestañas y sus glándulas asociadas, los elementos responsables del parpadeo y el conducto nasolagrimal (Fig. 6).



**Figura 6.** Conjunto de tejidos y órganos que constituyen el Sistema de Superficie Ocular. A) Sección sagital, que muestra en rosa la continuidad del epitelio superficial con otras estructuras especializadas en distintas glándulas. B) Vista frontal, que resalta la integración de los sistemas nervioso, vascular, inmune y endocrino. (Tomado de Gipson (2007).

- *Epitelios corneal y conjuntival.* Los epitelios de revestimiento de la córnea y de la conjuntiva producen mucinas, la mayoría de ellas asociadas a membrana y formando el glicocálix. Entre el epitelio de la conjuntiva también se encuentran

células caliciformes, productoras del principal componente mucoso de la lágrima: MUC5AC. La secreción de mucinas aparece ya en algunos peces, por lo que éste parece ser el elemento evolutivamente más antiguo (Collin y Collin, 1996).

- *Glándula lagrimal*. Bajo este término se agrupan glándulas subconjuntivales asociadas al canto del ojo. En mamíferos pueden aparecer en varias posiciones y, según el lugar de apertura del conducto, podemos distinguir:
  - o *Glándula lagrimal superior*. Con múltiples conductos que se abren en la mitad lateral del saco conjuntival superior.
  - o *Glándula lagrimal inferior*. Con un solo conducto que se abre en el canto lateral.

Los lagomorfos (conejos, etc.) presentan ambos tipos de glándula lagrimal (Sakai, 1989). En mamíferos grandes, como es el caso del hombre, solemos encontrar sólo la glándula lagrimal superior. En cambio, en mamíferos pequeños, como los roedores, encontramos sólo glándula lagrimal inferior. En roedores, además, esta glándula está dividida en una porción intraorbital y otra exorbital, situada por debajo de la oreja, junto a las glándulas parótidas (Sakai, 1989).

Las glándulas lagrimales son la principal fuente del componente acuoso y seroso de la lágrima, aunque también son capaces de producir algunas mucinas. Existen, descritas, al menos en humanos, dos glándulas accesorias que también contribuyen al componente acuoso de la lágrima; son las glándulas de Krause y las glándulas de Wolfring, cuyos conductos se abren en la conjuntiva (Ross y Pawlina, 2015).

- *Glándulas tarsales o de Meibomio*. Así llamadas por el científico Heinrich Meibom, quien las describió en detalle, aunque el primero en mencionarlas fue Galeno hacia el año 200 a.C. Estas glándulas se encuentran en mamíferos, situadas en ambos párpados, una al lado de otra y perpendiculares al borde del párpado (Ross y Pawlina, 2015). Tienen forma de racimo, con múltiples acinos que vierten su contenido a un conducto central. Son glándulas sebáceas y producen la porción lipídica de la película lagrimal, que ayuda a prevenir su evaporación. La liberación del contenido de estas glándulas es inducida por el parpadeo.
- *Pestañas y glándulas asociadas*. Junto a las pestañas encontramos las glándulas de Zeiss y las de Moll. Las primeras son glándulas sebáceas, asociadas al folículo piloso. Las glándulas de Moll son un tipo de glándula sudorípara modificada,

situada en la base de las pestañas. Ambas contribuyen a la porción lipídica de la lágrima.

- *Elementos responsables del parpadeo.* La importancia de los párpados no está sólo en ser el lugar donde se alojan importantes glándulas lagrimales, sino en su capacidad para desplazarse, cubriendo toda la superficie del ojo. Con ello, constituyen una barrera de defensa adicional y reparten el contenido de la película lagrimal, así como ayudan a renovarlo. Ésta última parece su principal función desde el punto de vista evolutivo (Murube, 2009).
- *Conducto nasolagrimal.* Es un canal situado en el canto medial del ojo, que se comunica con la cavidad nasal. Su función es absorber los componentes de la lágrima y, con ello, es capaz de regular hasta cierto punto el nivel de lágrima apropiado.

Existe otra estructura que forma parte del aparato lagrimal de la mayoría de vertebrados: la glándula de Harder. Esta glándula es probablemente el componente más antiguo, después de los elementos secretores de mucinas. Aparece ya en anfibios, donde es el elemento principal e incluso el único (Chieffi et al., 1996). Esta glándula se encuentra asociada al tercer párpado o membrana nictitante, una estructura muy importante en la mayoría de vertebrados terrestres, pero vestigial en humanos (Murube, 2009). La glándula de Harder produce una secreción que lubrica el tercer párpado, compuesta principalmente por lípidos. Su disposición varía según el grupo animal; en roedores se encuentra rodeando la parte posterior del globo ocular (Sakai, 1989). En general esta glándula está ausente en primates superiores y, entre ellos, en humanos.

La regulación nerviosa es muy importante para la producción de los elementos lagrimales adecuados en cada momento. La córnea es uno de los tejidos más densamente inervados del cuerpo, con sus terminales nerviosas provenientes de la rama oftálmica del trigémino. Algunas de estas fibras hacen sinapsis en el tronco encefálico con fibras motoras y del sistema nervioso autónomo. Las fibras motoras contactan con los músculos orbiculares e inducen el parpadeo, mientras que las fibras autónomas inervan todas las estructuras lagrimales (Conrady et al., 2016; Pflugfelder, 2011). De esta manera, ante estímulos en la superficie ocular, los elementos productores de lágrima pueden ser activados y así responder ante amenazas externas.

### **1.3.3 Enfermedad de la película lagrimal: el síndrome de ojo seco**

Como ya hemos comentado, la superficie ocular se encuentra enfrentada a un medio externo amenazante para su funcionalidad. La sequedad, el ataque de patógenos y daños abrasivos de distinta naturaleza son agresiones constantes que se producen sobre estos tejidos. Aunque la superficie ocular posee mecanismos de defensa frente a estos agentes, no es poco habitual que, ya sea de forma transitoria o de forma crónica, se acaben produciendo desequilibrios en la homeostasis de la Unidad Funcional Lagrimal. Además, también el medio interno está sujeto a cambios que, en mayor o menor medida, pueden acabar afectando a las estructuras oculares y ser, así, también causa de enfermedad.

El lagrimeo o epífora es como se conoce al exceso de lágrima, como consecuencia de algunas enfermedades oculares. Es producido, frecuentemente, por patologías obstructivas del conducto nasolagrimal o por irritaciones de la superficie ocular. Sin embargo, también es posible encontrarlo, paradójicamente, en casos de ojo seco. El caso contrario a un exceso de lágrima sería el mencionado ojo seco, que es una de las principales causas de visitas al oftalmólogo (Chen et al., 2009).

“El ojo seco es una enfermedad multifactorial de la superficie ocular caracterizada por una pérdida de homeostasis de la película lagrimal y acompañada de síntomas oculares, en los cuales la inestabilidad de la película lagrimal, la hiperosmolaridad, la inflamación y daño de la superficie ocular y las anomalías neurosensoriales juegan papeles etiológicos”. Esta es la última actualización de la definición del ojo seco, redactada por el Taller de Ojo Seco (DEWS) en 2017 (Nelson et al., 2017). En ella se destacan el carácter multifactorial del ojo seco y las consecuencias en la función visual (Goto et al., 2002), la osmolaridad de la lágrima (Farris et al., 1986; Gilbard, 1994; Tomlinson et al., 2006) y la disrupción de la homeostasis del sistema inmune en la superficie ocular (Barabino et al., 2012), que tienen lugar en esta enfermedad. Se define, además, el ojo seco como una enfermedad de la Unidad Funcional Lagrimal. El término “queratoconjuntivitis seca” se usa con frecuencia como sinónimo de enfermedad de ojo seco.

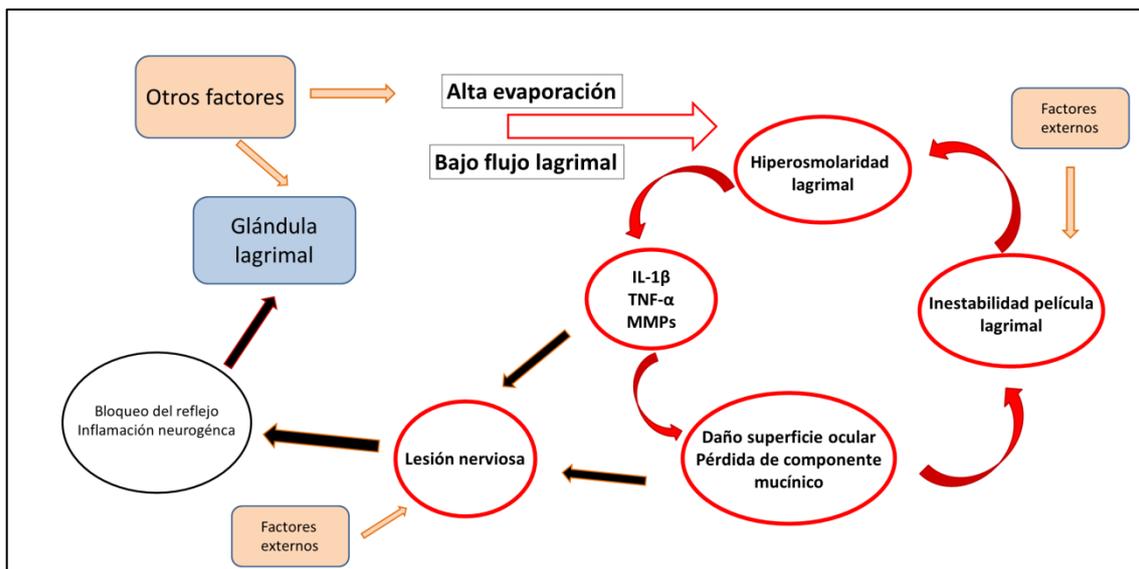
#### **1.3.3.1 Clasificación etiopatogénica del ojo seco**

Años atrás, el Instituto Nacional del Ojo de Estados Unidos (NEI, por sus siglas en inglés), definía la enfermedad de ojo seco basándose en las, *a priori*, principales causas

de la enfermedad: deficiencia en la secreción acuosa de lágrima o exceso de evaporación. Aunque ya no aparezca en la definición, la distinción entre ojo seco por falta de secreción y ojo seco evaporativo, sigue siendo útil a la hora de la clasificación etiopatogénica.

En el ojo seco por falta de secreción acuosa (ADDE, por sus siglas en inglés) se produce sequedad debido al daño en los acinos lagrimales, lo que conlleva un volumen menor de lágrima. Según la causa del daño en las glándulas lagrimales, se establecen dos grandes grupos: ojo seco asociado al síndrome de Sjögren y ojo seco no asociado al síndrome de Sjögren. El síndrome de Sjögren es una exocrinopatía, consistente en un proceso autoinmune que ataca principalmente a las glándulas salivares y lagrimales, aunque también a otros órganos. El daño está mediado por linfocitos CD4<sup>+</sup>, que se infiltran en la glándula y provocan la apoptosis de las células glandulares. Hoy se cree que el desencadenante del proceso es la infección por virus (Barabino et al., 2012).

Las causas de ADDE no Sjögren incluyen, sobre todo, daños en la lágrima que no tienen que ver con procesos autoinmunes. Es el caso del ojo seco asociado a la edad, obstrucciones de la glándula lagrimal o la hiposecreción refleja producida, por ejemplo, por el uso de lentes de contacto, que pueden ocasionar una pérdida en la sensibilidad



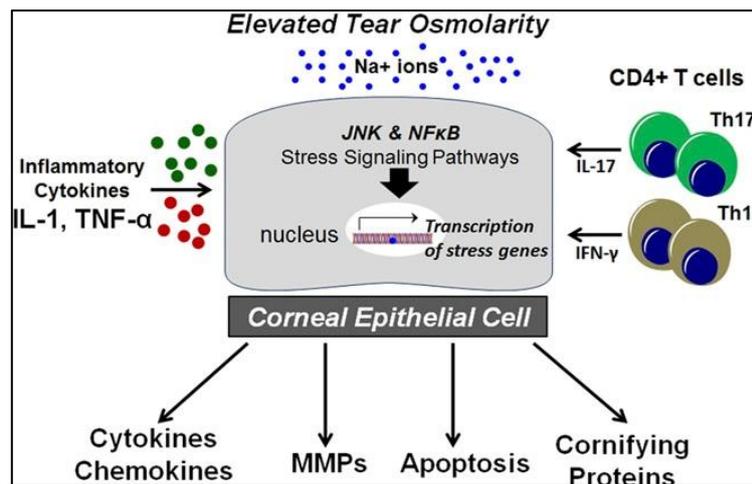
**Figura 7** Mecanismos del ojo seco. Se considera la existencia de unos mecanismos centrales que se retroalimentan, formando un círculo vicioso al que se llega por diferentes mecanismos. La hiperosmolaridad lagrimal, la inestabilidad de la película lagrimal y la inflamación juegan un papel central en los daños oculares, así como las anomalías neurosensoriales. (Imagen modificada de Lemp et al. (2007).

corneal. Sin embargo, otras formas de ADDE no Sjögren sí que tienen un origen inmune. Es el caso de los daños por infiltración de linfocitos T en linfoma, SIDA y enfermedad de injerto contra huésped (EICH). De esta última hablaremos más adelante.

La forma más común de ojo seco evaporativo es la producida por disfunción de la glándula de Meibomio. También una baja frecuencia de parpadeo, como la producida por la exposición prolongada a terminales de vídeo, puede provocar una mayor evaporación de la lágrima, al aumentar el tiempo que la superficie ocular queda expuesta antes del siguiente parpadeo. Otras causas incluyen agentes externos, como la falta de vitamina A y el uso de ciertos medicamentos tópicos, como son los anestésicos (Lemp et al., 2007a).

### 1.3.3.2 La hiperosmolaridad y la inflamación están en el centro del proceso del ojo seco

Las distintas formas de ojo seco terminan por activar algunos mecanismos clave que se retroalimentan mutuamente, dando lugar a un círculo vicioso del que es difícil salir (Fig. 7). Tanto la baja producción de lágrima como la alta evaporación de la misma, provocan un aumento de la osmolaridad, lo que expone a la superficie ocular a un estrés



**Figura 8.** La alteración de la composición de la lágrima, tanto por el aumento de osmolaridad como por la presencia de citoquinas inflamatorias, activa rutas de señalización de estrés, que llevan a las células epiteliales a expresar más citoquinas, MMPs, factores pro-apoptóticos y precursores de la envuelta cornificada.(Imagen tomada de Pflugfelder (2011).

osmótico que compromete su función. Esto tiene como consecuencia un aumento en la apoptosis y descamación de células epiteliales (Gilbard et al., 1984), pérdida de conexiones intercelulares (Pelegriño et al., 2012; Pflugfelder et al., 2005) y cambios en la función neurosensitiva (Parra et al., 2014).

En diversos estudios, tanto con animales (Luo et al., 2005) como con células en cultivo (Li et al., 2004; Li et al., 2006; Luo et al., 2007), se ha podido comprobar que la exposición a un medio con alta osmolaridad desencadena una cascada de eventos que, mediante la participación de MAP quinasas, provoca la liberación de citoquinas como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y metaloproteinasas (MMPs) y también la inducción de apoptosis (Luo et al., 2007). También se ha demostrado el aumento de estas moléculas en muestras de lágrimas de pacientes con ojo seco (Massingale et al., 2009; Solomon et al., 2001). Esto compromete el mantenimiento del privilegio inmune y se produce la activación de células presentadoras de antígeno y la invasión por linfocitos CD4<sup>+</sup>. El aumento de MMP9 es responsable de la ruptura de la barrera epitelial (Huet et al., 2011; Mauris et al., 2014), lo que llega a causar irritación y problemas de visión (Pflugfelder, 2011). Por otro lado, el estrés osmótico y citoquinas como IL-1 $\beta$  llegan a producir la aparición de características propias del epitelio de la piel, con expresión de precursores de la envuelta queratinizada, como SPRR1B (Y.-T. Chen et al., 2010; Lin et al., 2014) (Fig. 8).

### ***1.3.3.3 Diagnóstico y Tratamientos***

El origen multifactorial del ojo seco y la variabilidad en las manifestaciones que presenta, hacen necesario llevar a cabo varias pruebas para poder llegar a su diagnóstico. Hasta la fecha, ninguna técnica ha sido capaz de determinar, por sí sola, la presencia y severidad de esta enfermedad (Alves et al., 2014). En su informe de 2007, el DEWS elaboró una tabla con los criterios diagnósticos recomendados para establecer la gravedad del ojo seco (Tabla 1). Típicamente, se valora el grado de malestar mediante el test OSDI (del inglés ocular surface disease index), se mide el volumen de lágrima mediante el test de Schirmer y se utilizan distintos colorantes vitales para evaluar la integridad de los epitelios conjuntival y corneal (sobre todo fluoresceína, pero también verde lisamina y rosa de bengala). El desarrollo de métodos más modernos para medir la osmolaridad de la lágrima, ha hecho que aumente la preferencia por usar también este parámetro en el diagnóstico del ojo seco. Para algunos, la osmolaridad es el método más fiable para valorar la presencia de enfermedad y la efectividad de posibles tratamientos (Benelli et al., 2010; Lemp et al., 2011; Suzuki et al., 2010; Versura y Campos, 2013). Sin embargo, para otros este método suscita dudas, al observarse cierto solapamiento entre los valores de pacientes con ojo seco leve o moderado y los de ojos sanos y al encontrarse que los pacientes con ojo seco presentan una variabilidad diaria mayor que los individuos sanos (Eperjesi et al., 2012; Yoon et al., 2014).

Nivel de gravedad del ojo seco	1	2	3	4*
Incomodidad, gravedad y frecuencia	Leve y/o episódico; ocurre bajo estrés ambiental	Episódico o crónico moderado, con o sin estrés	Frecuente o constante grave sin estrés	Severo y/o discapacitante y constante
Síntomas visuales	Ninguno o fatiga episódica leve	Episódico molesto y/o limitante	Molesto, crónico y/o constante, limitante	Constante y/o posiblemente discapacitante
Inyección conjuntival	Ninguno a leve	Ninguno a leve	+/-	+;++
Tinción conjuntival	Ninguno a leve	Variable	Moderado a marcado	Marcado
Tinción corneal (severidad/ubicación)	Ninguno a leve	Variable	Central marcado	Erosiones punteadas severas
Signos corneales/lagrimal	Ninguno a leve	Desechos leves, ↓ menisco	Queratitis filamentosa, agregación de moco, ↑ desechos en las lágrimas	Queratitis filamentosa, agregación de moco, ↑ desechos en las lágrimas, ulceración
Párpado/Glándulas de meibomio	MGD variablemente presente	MGD variablemente presente	Frecuente	Triquiasis, queratinización, simbléfaron
TFBUT (seg)	Variable	≤10	≤5	Inmediato
Puntuación de Schirmer (mm/5 min)	Variable	≤10	≤5	≤2

\*Debe presentar signos y síntomas. TFBUT: tiempo de ruptura lagrimal con fluoresceína. MGD: disfunción de la glándula de meibomio

**Tabla 1.** Esquema para la calificación de la gravedad del ojo seco

El tratamiento para el ojo seco varía según la severidad de la enfermedad. En casos leves se basa en el uso de sustitutos de lágrima. Estos sustitutos se utilizan, fundamentalmente, para lubricar la superficie ocular, aunque también se usan formulaciones que contrarrestan las condiciones de la película lagrimal enferma, como son las soluciones hiposmóticas (Jones et al., 2017). Sin embargo, estos tratamientos sólo calman los síntomas y algunos signos objetivos y no son una solución. En casos severos de ojo seco, el tratamiento se complementa con factores de crecimiento (como el tratamiento con suero autólogo) o con fármacos antiinflamatorios, entre los que destacan la ciclosporina A, tacrolimus y los corticosteroides (Barabino et al., 2012).

## **1.4 La enfermedad de injerto contra huésped ocular**

Entre las causas del ojo seco se encuentran varias patologías inmunitarias, como la ya mencionada EICH. La EICH es la mayor complicación que surge tras un trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas. Incluso en el caso de histocompatibilidad completa entre donante y receptor, la incidencia de EICH llega al 40 % (Ferrara et al., 2009). Es una enfermedad que afecta a múltiples órganos y al ojo entre ellos, sobre todo en el caso de EICH crónica, en la que es uno de los signos característicos. La incidencia de EICH ocular se suele situar entre el 40 y 60 % de los casos de pacientes que reciben un trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (Jacobs et al., 2012; Shikari et al., 2013).

### **1.4.1 El trasplante de células madre hematopoyéticas**

La idea de reemplazar partes dañadas del cuerpo por órganos sanos es muy antigua. En un escrito de 1896, Quine exponía las aplicaciones del trasplante de médula ósea que empezaban a surgir y que abarcaban, fundamentalmente, problemas de anemia, aunque aún no se comprendía muy bien el mecanismo que subyacía a la mejoría de los pacientes (Quine, 1896). El propio Medawar, ya mencionado anteriormente, recibió su Premio Nobel gracias a sus trabajos en la comprensión sobre la implicación del sistema inmune en los mecanismos de rechazo de órganos trasplantados (Medawar, 1944).

Paralelamente a los estudios de Medawar, se avanzaba en el conocimiento de los efectos de la radiación, así como en posibles estrategias terapéuticas. El uso de la radiación para el tratamiento de distintos tipos de cáncer ya se había establecido, pero sus efectos nocivos suponían un escollo. Se demostró la relación entre la radiación y el daño en el tejido hematopoyético y pronto surgieron estudios en los que se conseguía la supervivencia de perros o ratones al realizar, tras irradiarlos, un trasplante de médula ósea (Lorenz et al., 1951; Mannick et al., 1960). Estos estudios no tardaron en aplicarse a humanos. Edward Donnall Thomas fue de los pioneros en el tratamiento de enfermos de leucemia, tratados con radioterapia, mediante el trasplante de médula ósea (Thomas et al., 1959), lo que le valdría más tarde el Premio Nobel. La descripción progresiva de las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad humano, o antígenos leucocitarios humanos (HLA) también ayudó a implantar este tratamiento. Sin embargo, los pacientes, a pesar de recuperarse de la leucemia, morían meses más tarde, a causa de infecciones o de una enfermedad secundaria, hoy conocida como EICH.

Los primeros trasplantes de células madre hematopoyéticas fueron singénicos, es decir, se llevaron a cabo con gemelos, en la que sería la situación idónea; pero lo más común es que el trasplante sea alogénico, con un donante genéticamente distinto. En algunos casos, el trasplante puede ser autólogo. Sin embargo, el trasplante autólogo, pese a no desarrollar EICH, carece también del efecto antitumoral y, según la patología tratada, se corre el riesgo de infundir también células malignas (Copelan, 2006).

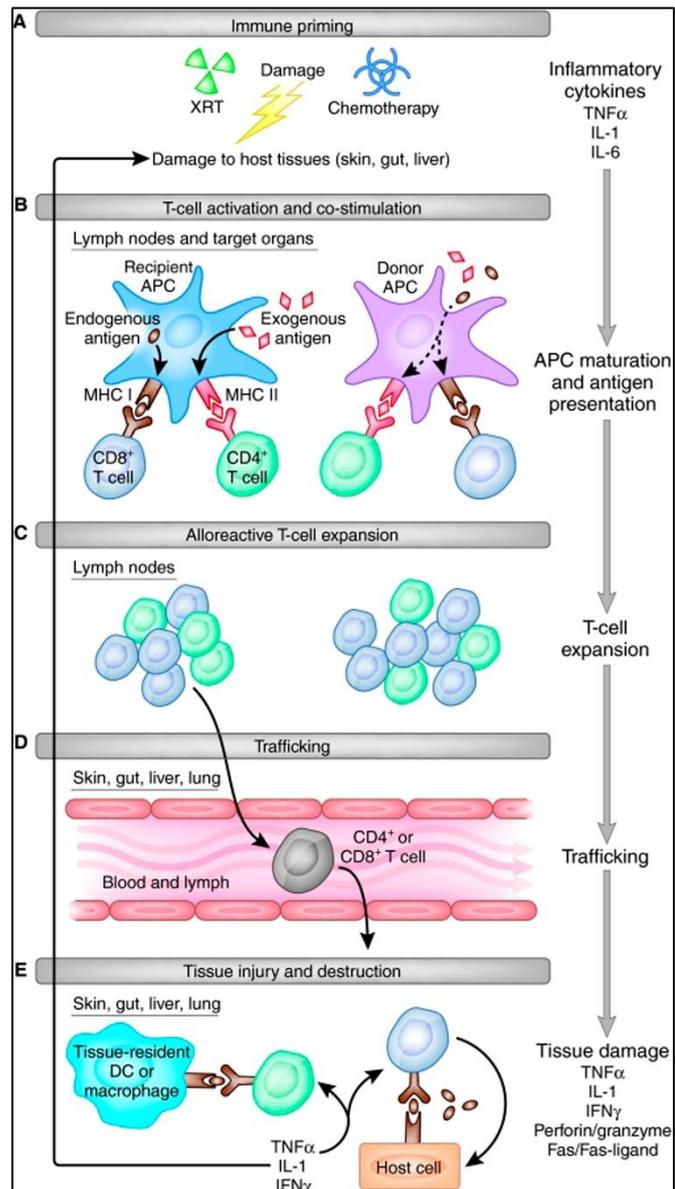
La primera fuente de células madre hematopoyéticas fue la médula ósea, que se obtenía por aspiración de la cresta ilíaca, con el donante anestesiado. Sin embargo, la identificación de la proteína de superficie celular CD34 como marcador de progenitores hematopoyéticos, permitió identificarlos también en la sangre periférica (Copelan, 2006; Gyurkocza y Sandmaier, 2014). El problema que conlleva la obtención de estas células de la sangre es el arrastre de un número mayor de linfocitos T, si bien éstos pueden ser filtrados por distintos procedimientos. Actualmente, la obtención de células madre hematopoyéticas a partir de sangre periférica se ha convertido en la forma más frecuente de obtención de estas células, para lo cual el donante ha de ser tratado previamente con G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos), lo que ayuda a enriquecer la sangre con progenitores hematopoyéticos. Otra fuente típica de células madre es la sangre del cordón umbilical, congelada inmediatamente tras el nacimiento.

La presencia de EICH reduce el riesgo de recaída de enfermedades leucémicas, lo que es indicativo de la capacidad del sistema inmune donante para eliminar las células tumorales (Copelan, 2006). Este efecto de las células del donante sobre las células malignas del receptor, se denomina efecto injerto contra leucemia (EICL). El EICL convierte al trasplante de médula ósea en sí en un tratamiento efectivo frente al tumor. La irradiación previa se sigue utilizando, no obstante, como régimen de preparación o de acondicionamiento, para disminuir el tamaño del tumor y también para inducir una inmunosupresión que permita el injerto de la médula ósea donante (Copelan, 2006). En la actualidad se tiende a reducir la severidad del régimen de acondicionamiento, fraccionando y reduciendo la dosis de irradiación y complementándola o sustituyéndola, incluso, con quimioterapia y fármacos inmunosupresores (Gyurkocza y Sandmaier, 2014). La utilización de regímenes de acondicionamiento de intensidad reducida, ha permitido disminuir la incidencia de EICH aguda, según algunos estudios (Chiang et al., 2016; Mohty et al., 2005; Schwarte et al., 2007).

### 1.4.2 Fisiopatología de la EICH

Los mecanismos fisiopatológicos de la EICH se basan en el reconocimiento de estructuras del receptor por parte de los linfocitos T del donante, algo que ya intuyó Billingham al exponer los requerimientos para el desarrollo de EICH (Billingham, 1966). En los casos en los que no haya completa compatibilidad en las moléculas HLA, se producen las reacciones más fuertes. Pero incluso en los casos en los que el donante y el receptor tienen HLA idénticos, se desarrolla EICH, debido a que los linfocitos T reconocen los péptidos expuestos por los HLA (Shlomchik, 2007). Estos péptidos alorreactivos son derivados de proteínas polimórficas y que presentan diferentes formas en el donante y el receptor. Son los llamados antígenos menores de histocompatibilidad (miHA). Aunque, dada la variabilidad genética entre los individuos, las proteínas que constituyen miHAs podrían ser muchas, se ha identificado un número de éstas que ocasionan más frecuentemente una reacción inmune alogénica (Spierings, 2014).

La EICH tiene una forma aguda y una forma crónica, definidas inicialmente según el tiempo que tardaban en manifestarse: la EICH aguda ocurriría en los cien primeros



**Figura 9.** Eventos en el desarrollo de EICH aguda. El primer paso en el daño proviene del régimen de condicionamiento (A). Tras éste, se produce la activación (B) y expansión de linfocitos T (C). Éstos viajan a los órganos diana (D), donde provocan el daño y la destrucción del tejido (E). (Imagen tomada de Schroeder y DiPersio (2011)).

días, mientras que hablaríamos de EICH crónica si ésta apareciese más tarde. Sin embargo, en realidad, la forma aguda puede darse después del día 100. Estas dos formas son diferenciables por sus manifestaciones clínicas y también por su diferente mecanismo fisiopatológico.

#### **1.4.2.1 EICH aguda**

La piel, el intestino y el hígado son los órganos más frecuentemente afectados por la EICH aguda. En los casos más graves, la tasa de supervivencia está entre el 5 % y el 25 % (Ferrara et al., 2009). El primer paso es la activación de células presentadoras de antígeno (APCs), lo que suele ser producido por la enfermedad subyacente o por el régimen de condicionamiento (Fig. 9). El tejido dañado produce moléculas inflamatorias, principalmente citoquinas como TNF- $\alpha$  o IL-1 $\beta$  (lo que se conoce como “tormenta de citoquinas”) y se produce un aumento en la expresión de moléculas HLA por parte de las APCs. El daño intestinal, producido por el régimen de condicionamiento, es una fuente especial de estímulos inflamatorios, que incluyen la internalización de moléculas bacterianas como el lipopolisacárido (Ferrara et al., 2009). Una vez activadas las APCs, éstas acuden a tejidos linfoides, donde despiertan la respuesta linfocitaria. Finalmente, el daño en los diferentes órganos es producido por el efecto tóxico de los linfocitos T, mediado por factores solubles como citoquinas (TNF- $\alpha$ ), perforina, granzimas o Fas.

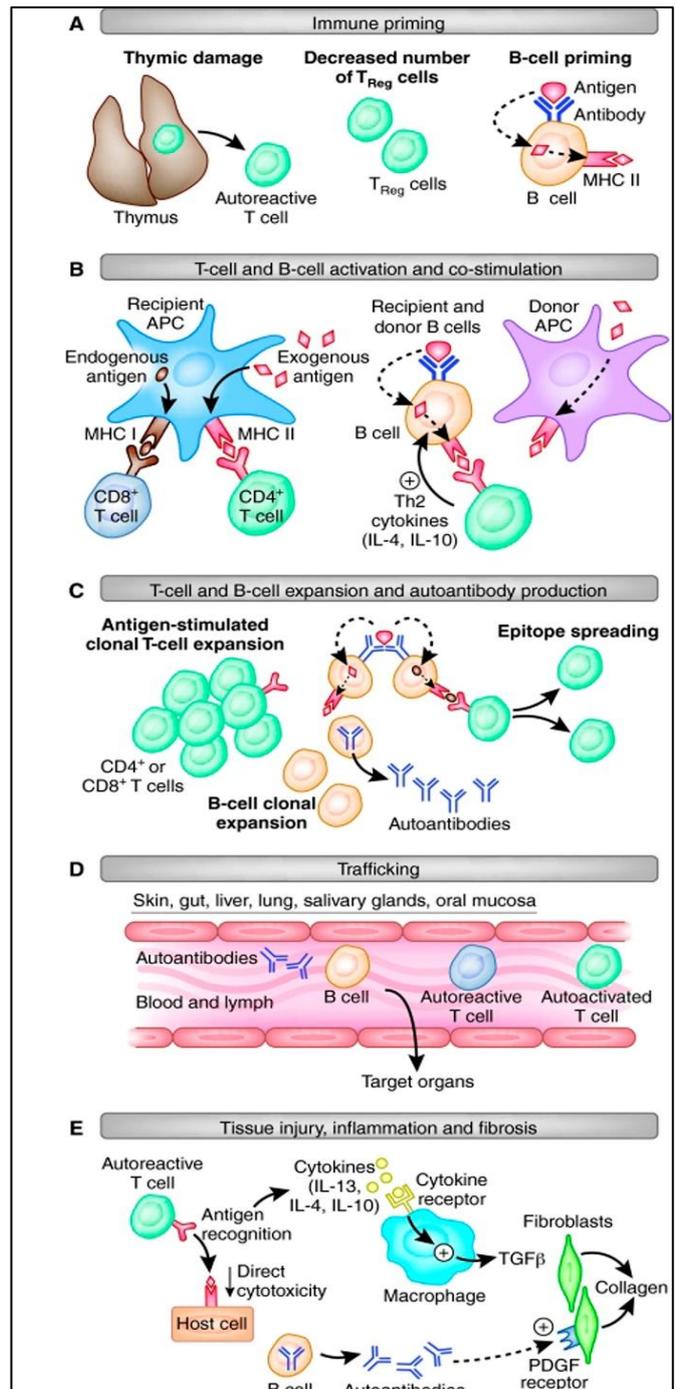
Cuando los linfocitos T son activados como consecuencia de una infección, son atraídos al lugar de la infección por medio de factores inflamatorios y otras señales de daño tisular y allí encuentran el antígeno reconocido. En el caso de la EICH, los factores inflamatorios producidos por el daño de la enfermedad previa o por el régimen de condicionamiento, atraen a los linfocitos a múltiples órganos. El antígeno reconocido por los linfocitos T se encuentra, comúnmente, en múltiples lugares, aunque a veces este antígeno se expresa de forma más localizada, y la EICH aparece focalizada en este órgano (Shlomchik, 2007). (Fig. 9).

#### **1.4.2.2 EICH crónica**

La forma crónica de EICH se desarrolla de forma similar a procesos de tipo autoinmune. En este caso, el efecto citotóxico de los linfocitos T se acompaña de la producción de autoanticuerpos, por activación de linfocitos B, y fibrosis. La piel, el tracto digestivo y el hígado también se ven afectados; pero es más frecuente que se vean

comprometidos otros órganos, como pulmones, la mucosa oral y la superficie ocular (Ferrara et al., 2009).

Los mecanismos de la EICH crónica son menos conocidos (Fig. 10). Es muy frecuente que una EICH crónica venga precedida por una EICH aguda, aunque no está claro el proceso que conecta una forma con la otra. Los factores que se cree que contribuyen al inicio de la respuesta inmune en EICH crónica son: daños en el timo, que provocan fallos en la selección de linfocitos T autorreactivos; una disminución o fallo en la función de linfocitos T reguladores; y la activación por reconocimiento de estructuras por linfocitos B (Fig. 10). Se produce, entonces, la activación y expansión de clones autorreactivos de células T, pero también de células B. Finalmente, se produce un efecto citotóxico que, en su forma más frecuente, consiste en la emisión de señales que promueven procesos de fibrosis, como TGF- $\beta$  (Schroeder y DiPersio, 2011).



**Figura 10.** Eventos en el desarrollo de EICH crónica. En este caso, son otras las causas (A) que inician la activación (B) y expansión (C) de linfocitos, no sólo T, sino también B. Finalmente, se produce el transporte de estos linfocitos hacia órganos diana (D), donde causan daño de tipo fibrótico. (Imagen tomada de Schroeder y DiPersio (2011).

### 1.4.3 EICH ocular

Entre un 60 % y un 90 % de los receptores de trasplante de células madre hematopoyéticas sufre algún tipo de complicación ocular (Shikari et al., 2013). Éstas afectan a la superficie ocular y las glándulas lagrimales, así como a las glándulas de Meibomio. Aunque no es frecuente que los problemas oculares en pacientes con EICH ocular deriven en pérdida de la visión permanente, sí que representan algunas de las principales causas de deterioro de la calidad de vida (Sáles et al., 2011; Sun et al., 2015).

En la EICH aguda se han observado distintas formas de daños conjuntivales y corneales, acompañadas de infiltración de linfocitos T (Ogawa y Kuwana, 2003), con especial relevancia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (Balasubramaniam et al., 2015). Las úlceras corneales son frecuentes, mientras que, entre las afecciones de la conjuntiva, destaca la conjuntivitis pseudomembranosa, relacionada con una EICH aguda de mal pronóstico y poca probabilidad de supervivencia (Ogawa y Kuwana, 2003; Shikari et al., 2013). Otra complicación que se produce en etapas tempranas tras el trasplante es la infección con *Herpes simplex*, que desemboca en queratitis.

El ojo seco es la complicación ocular más frecuente en la EICH, si bien lo es en menor medida en la EICH aguda (Balasubramaniam et al., 2015). Este ojo seco es producido por el daño en las glándulas lagrimales o una disfunción de las glándulas de Meibomio. La EICH ocular crónica cursa de forma similar a otras patologías autoinmunes y el daño en la glándula lagrimal es producido por fibrosis, mediada por linfocitos T. Para su evaluación, los métodos utilizados son aquellos que sirven para diagnosticar el ojo seco (ya mencionados), aunque para algunos autores el test de Schirmer ha mostrado poca precisión para valorar la EICH ocular (Jacobs et al., 2012). Los nuevos métodos para medir la osmolaridad lagrimal han sido aplicados también para evaluar la EICH ocular, demostrándose una relación entre altos valores de osmolaridad y formas severas de EICH ocular (Berchicci et al., 2014; Khanal y Tomlinson, 2012; Na et al., 2015; Schargus et al., 2015).

Los estudios sobre la fisiopatología de la EICH ocular han demostrado la infiltración de células CD3<sup>+</sup> y CD14<sup>+</sup> (macrófagos) en la conjuntiva de pacientes que recibieron trasplante alogénico de médula ósea, principalmente en aquellos que presentaban ojo seco, en los que, además, se ha observado un mayor ratio CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (Rojas et al.,

2005). También ha sido estudiado el papel de los fibroblastos, que podrían funcionar como APCs (Ogawa et al., 2001).

Es frecuente que los daños en la conjuntiva y en la córnea acaben con la queratinización del epitelio (Ogawa y Kuwana, 2003). Sin embargo, también se ha observado un adelgazamiento de la córnea, que podría deberse a procesos de transición epitelio-mesénquima (Ogawa et al., 2010).

Aunque al conocimiento de la EICH han contribuido, principalmente, los estudios con modelos animales, no son muchos los que han analizado la patología ocular. Así, Hassan y cols. (2005) describieron daños en la glándula lagrimal en un modelo murino de trasplante alogénico de médula ósea, similares a los observados en humanos; Lorenzo Perez y cols. (2011) demostraron también daños en estructuras glandulares, así como la infiltración de linfocitos T y daño en la córnea y el limbo esclerocorneal; y, por otro lado, Herretes y cols. (2015), utilizando un modelo menos severo de EICH, demostraron la infiltración de células del sistema inmune del donante en estructuras oculares.

Los tratamientos para la EICH ocular, al igual que con el ojo seco, son limitados y destinados a disminuir los síntomas. Así, lo más frecuente es el uso de sustitutivos de lágrima, fármacos antiinflamatorios y corticoides (Balasubramaniam et al., 2015; Ogawa y Kuwana, 2003; Shikari et al., 2013).

## 1.5 Las células mesenquimales estromales

Entre las múltiples terapias experimentales, la terapia celular, basada en el tratamiento de dolencias mediante la infusión de células vivas, ha sido objeto de gran interés en los últimos años. Entre las células utilizadas en estas terapias se encuentran las células mesenquimales estromales (CME), anteriormente conocidas como células madre mesenquimales (Horwitz et al., 2005). El tratamiento experimental con CME se ha ampliado también a patologías de la córnea de diversa índole.

### 1.5.1 Origen de las CME

El origen del concepto de célula madre hay que buscarlo en el científico evolucionista Ernst Haeckel. Para Haeckel, los árboles filogenéticos (en alemán “stammbaum”) llevaban a la conclusión de que los distintos organismos pluricelulares entroncaban con los mismos organismos unicelulares, a los que se refirió como “stammzellen” o “stem cells” (traducido al español como células madre o células troncales). Haeckel presumía una analogía entre este proceso evolutivo y el proceso ontogenético, por el que un individuo pluricelular se origina de una sola célula:

*“The name ‘stem cell’ seems to me the most simple and appropriate one, because all other cells stem from it and because it is in its most literal sense the stem father as well as the stem mother of all the countless generations of cells of which later on the multicellular organism is composed.”* (Haeckel, 1877, a través de Maehle, 2011).

También a mediados del siglo XIX, con los primeros experimentos sobre la médula ósea, se hacían las primeras observaciones sobre la formación de hueso a partir de ésta (Bianco et al., 2008). Sin embargo, no fue hasta cien años después cuando Tavassoli y Crosby (Tavassoli y Crosby, 1968) demostraron este potencial osteogénico de la médula ósea. Por su parte, Friedenstein y sus colaboradores trabajaron en los años 60 y 70 para demostrar que el poder osteogénico de la médula ósea era debido a una población de células distintas de los progenitores hematopoyéticos, que eran, hasta la fecha, las células madre mejor conocidas (Owen y Friedenstein, 1988). Estas células capaces de formar hueso (células madre estromales de la médula ósea) se caracterizaban por su adherencia al plástico y la formación de colonias en cultivo, así como la diferenciación hacia osteoblastos, condrocitos, adipocitos y fibroblastos. Esta capacidad de diferenciarse hacia tejidos derivados del mesodermo, llevó a Caplan, (1991) a acuñar el término “mesenchymal stem cells”, traducido como células madre mesenquimales,

haciendo referencia al tejido conjuntivo embrionario del que se diferencian los tejidos conjuntivos, musculares y los tejidos epiteliales derivados del mesodermo (endotelio y mesotelio).

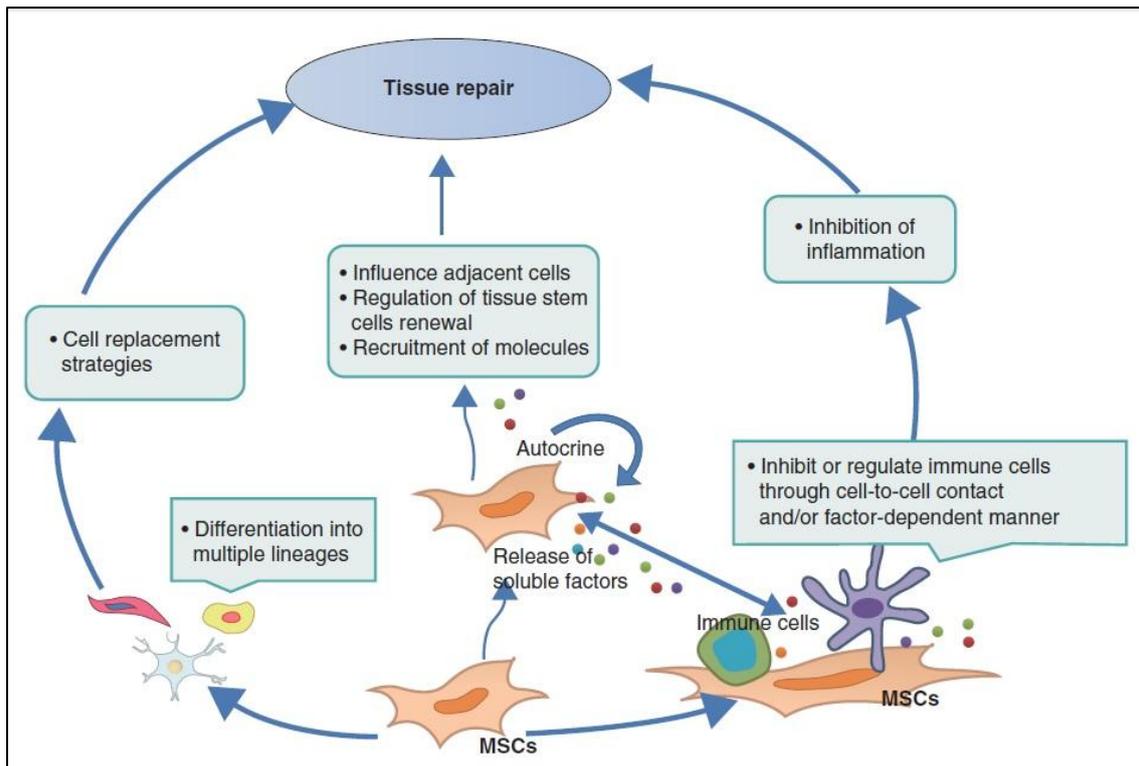
El aislamiento de células madre embrionarias en cultivo en 1981 por Sir Martin John Evans y Matthew Kaufman (Evans y Kaufman, 1981)<sub>2</sub> elevó el interés por los trabajos con células madre. Este clima de interés, facilitado quizá también por los problemas éticos del uso de células embrionarias, provocó que el descubrimiento de unas células madre pluripotentes en el individuo adulto hiciera estallar el entusiasmo (Bianco, 2011).

### **1.5.2 Denominación y criterios mínimos**

La idoneidad del término “stem” ha sido puesta en duda por muchos autores. Este calificativo tiene unas implicaciones en cuanto a capacidad de autorrenovación y diferenciación que no parecen cumplir todas las células de un cultivo de CME (Bianco et al., 2008; Lindner et al., 2010). En estos cultivos, la capacidad de formación de colonias parece residir en un grupo de células, que sí podrían ser calificadas como células madre. Estos motivos hacen cuestionar el nombre de células madre mesenquimales y la Sociedad Internacional de Terapia Celular recomienda su denominación como células mesenquimales estromales (Horwitz et al., 2005).

Por otro lado, se han conseguido aislar CME a partir de otros tejidos, distintos de la médula ósea, como tejidos de sostén (Fukumoto et al., 2003), músculo y tendones (Jankowski et al., 2002) y, de forma destacada, de tejido adiposo (Peng et al., 2008), placenta y cordón umbilical (Erices et al., 2000). El aislamiento de CME de estos diferentes tejidos implica el uso de técnicas diferentes, e incluso para la obtención de CME de un mismo tejido se han desarrollado diferentes métodos (Baksh et al., 2004). La obtención de células de diferentes tejidos y con diferentes técnicas ha hecho necesario definir unas características consensuadas, para definir aquellas células que pueden ser denominadas CME. Y es que, pese a los muchos intentos por hallar un marcador que determine la identidad de las CME, no se ha encontrado ninguno que cumpla con este propósito. Por todo esto, la Sociedad Internacional de Terapia Celular ha establecido unos criterios mínimos que definen a estas células (Dominici et al., 2006):

- Las células deben mostrar capacidad de adhesión al plástico.
- Más de un 95% de las células debe expresar CD105, CD73 y CD90 y en menos de un 2% deben estar ausentes CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 $\alpha$  o CD19 y HLA clase II.
- Por último, debe demostrarse la capacidad de diferenciación hacia osteoblastos, adipocitos y condroblastos.



**Figura 11.** Las CME y sus propiedades aplicables en medicina para la reparación de tejidos. (Imagen tomada de Wang y cols. (2011).

### 1.5.3 Propiedades de las CME aplicables a su uso en medicina

Desde su descubrimiento, han surgido numerosos estudios apuntando al potencial terapéutico de las CME. Las propiedades de las CME que suscitan este interés en distintos campos de la medicina son, principalmente, su potencial de diferenciación, la secreción de sustancias que ayudan a la regeneración de tejidos, su capacidad para modular el sistema inmune y su tendencia a migrar hacia los lugares donde existe un daño (Squillaro et al., 2016) (Fig. 11).

### **1.5.3.1 Potencial de diferenciación**

Desde el principio, una de las propiedades de las CME que más han llamado la atención de los investigadores es su capacidad para diferenciarse hacia distintos tipos celulares. Las primeras evidencias demostraron la diferenciación de las CME hacia osteoblastos, adipocitos y condroblastos (Caplan, 1991), hasta el punto de convertirse esta en una característica definitoria de las CME (Dominici et al., 2006). Pero, posteriormente, se han logrado obtener otras células del linaje mesenquimal, como mioblastos y tenocitos (Chen et al., 2013) e incluso de otros linajes, como células pancreáticas y neuronas (Squillaro et al., 2016) y también células corneales (Yao y Bai, 2013).

Sin embargo, el potencial de diferenciación de las CME es visto con escepticismo por algunos investigadores. Bianco (2011) apunta que aquellos experimentos que han demostrado la diferenciación de CME hacia células diferentes de osteoblasto, adipocito, condroblasto y fibroblasto, lo han conseguido mediante técnicas *in vitro* que actúan reprogramando la célula, lo que no es suficiente para demostrar esta capacidad de las CME *in vivo*. Por otra parte, hay que hacer otras matizaciones a la capacidad de diferenciación hacia hueso, cartílago y grasa; se ha señalado que, en un cultivo con CME, existe cierta heterogeneidad, no sólo con respecto a la capacidad de autorrenovarse, algo que ya hemos mencionado, sino también con respecto a la multipotencialidad. Dentro de los cultivos de CME existen células con potencial para diferenciarse a los tres linajes, otras sólo para dos y otras que son unipotentes (Baksh et al., 2004).

### **1.5.3.2 Efectos paracrinos**

La idea de aislar unas células con potencial de diferenciación que, una vez implantadas en un tejido dañado, sean capaces de recomponer su estructura, es muy atractiva. Sin embargo, no son muchos los estudios que han podido demostrar la capacidad de las CME de permanecer injertadas en el tejido a largo plazo (Shi et al., 2010). Pero, a pesar del fracaso de estos intentos por reconstruir tejido *in vivo*, son muchos los que han observado efectos beneficiosos en la reparación de tejidos tras el tratamiento con CME (Chen et al., 2013; Wang et al., 2011; Xinaris et al., 2013). Estos beneficios se han atribuido a la liberación de factores paracrinos, que tienen un efecto

inhibidor de la apoptosis y promotor de la proliferación, ayudando así a la regeneración del tejido dañado (Squillaro et al., 2016).

Algunas de las moléculas secretadas por las CME relacionadas con la reparación del tejido son IL-6, IL-8, MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos-1) y TGF- $\beta$ , que atraen a células encargadas de la remodelación del tejido. Producen también inhibidores de metaloproteinasas (TIMPs) e inhibidores de colágeno, fibronectina y otros elementos de la matriz extracelular, ayudando a reducir los procesos de fibrosis. También secretan factores de crecimiento, como VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico) y HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) (Squillaro et al., 2016; Wang et al., 2011).

### ***1.5.3.3 Propiedades inmunomoduladoras***

Las CME han demostrado ser capaces de evitar el reconocimiento de células aloreactivas. Esta capacidad no está tan influenciada, como se creía en un principio, por su falta de expresión de HLA clase II y baja expresión de HLA clase I, sino que es debida, en parte, a la expresión de factores inmunomoduladores (Rasmusson, 2006).

Numerosos estudios han demostrado la capacidad de suprimir la respuesta excesiva de células T, células B, células dendríticas y células NK (Squillaro et al., 2016). En estudios *in vitro*, las CME han sido capaces de inhibir la proliferación de linfocitos T y B, una propiedad que no se ve limitada por la barrera de especie (Rasmusson, 2006). Esta inhibición se produce incluso al interponer una membrana semipermeable, lo que indica que ésta es llevada a cabo mediante factores solubles (Ortiz et al., 2007) o microvesículas (Budoni et al., 2013). Los mecanismos utilizados para lograr esta inhibición varían según la causa de la activación de los linfocitos (Rasmusson et al., 2005). Se ha demostrado, por ejemplo, que la inhibición de la expresión de galectina-1 y galectina-3 por las CME afecta a su capacidad inmunosupresora (Chou et al., 2013).

No todas las clases de linfocitos T ven su activación inhibida por las CME; al cultivar células mononucleares de sangre periférica junto con CME, se ve potenciada la expansión de los grupos de linfocitos T reguladores (Chou et al., 2013). Además, las CME modulan la acción de APCs y la respuesta citotóxica de los linfocitos T y son capaces de reducir la presencia de citoquinas inflamatorias, como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Shi et al., 2010).

#### **1.5.3.4 Las CME “buscan” tejidos dañados**

Se ha propuesto que las CME necesitan estar en un lugar con inflamación para llevar a cabo sus propiedades reparadoras (Shi et al., 2010). Esta teoría se basa en dos principios:

- Las CME infundidas migran, principalmente, hacia lugares con inflamación, aunque muchas tienden a quedarse en la microvasculatura del pulmón (Squillaro et al., 2016).
- La función de inmunosupresión se observa sólo cuando las CME son activadas por factores inflamatorios, como IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . Esta observación ha llevado a muchos a utilizar en sus estudios CME expuestas a estos factores previamente en cultivo (Sart et al., 2014).

#### **1.5.4 CME en el tratamiento de EICH**

Estas propiedades de las CME las han hecho atractivas para diversas clases de estudios clínicos y preclínicos. Entre ellos, destacan aquellos estudios destinados a mejorar el injerto de tejidos trasplantados y también los relacionados con enfermedades hematológicas.

Es cada vez más evidente que, entre las propiedades que pueden tener las CME *in vivo*, está la de crear las condiciones adecuadas para las células madre hematopoyéticas. Por ello, se han desarrollado numerosos estudios destinados a mejorar el injerto de las células en trasplantes con progenitores hematopoyéticos, mediante la infusión conjunta con CME. Pero, además se espera que las CME puedan ser usadas para tratar la EICH por sus propiedades inmunomoduladoras (Chou et al., 2013; Wu et al., 2013).

Los estudios con animales han demostrado que la inoculación de CME junto con el trasplante de células hematopoyéticas, prolonga la supervivencia tras dicho trasplante, promoviendo el injerto de las células. Sin embargo, la prevención o reducción de EICH no ha sido tan exitosa quizá debido a la necesidad de reajustar el tiempo de tratamiento o realizar un acondicionamiento a las CME antes de su aplicación (Chou et al., 2013).

En humanos, se están llevando a cabo bastantes ensayos clínicos, con resultados prometedores en el tratamiento de la EICH aguda. El estudio de algunos casos aislados ha mostrado que, el tratamiento con CME en trasplantes con células madre hematopoyéticas, ha tenido como resultado el rápido injerto de las células

hematopoyéticas y la remisión o no aparición de EICH. Estudios clínicos más amplios muestran que el tratamiento de EICH aguda con CME reduce la incidencia y severidad de una EICH crónica posterior (en Squillaro et al., 2016 se puede encontrar una revisión de algunos de estos estudios).

### **1.5.5 CME en patologías de la superficie ocular**

La capacidad de inmunomodulación y de promoción de la reparación de tejidos son propiedades útiles también para toda clase de trasplantes sólidos. El trasplante de córnea es la forma más común de trasplante de tejidos humanos y las CME han surgido como una posibilidad a estudiar para promover la supervivencia del injerto. Hasta la fecha se han llevado a cabo varios estudios con animales, con resultados dispares, ya que algunos han publicado resultados muy positivos (Arnalich-Montiel et al., 2008; Oh et al., 2012; Treacy et al., 2014), mientras que algunos otros muestran resultados fallidos (Oh et al., 2009). Estos distintos estudios sugieren que existe un potencial en las CME para promover el injerto de córneas trasplantadas, pero es necesario aún investigar sobre el mejor momento y el método de aplicación de estas células.

El tratamiento con CME está siendo evaluado también en modelos animales de daño corneal provocado, por ejemplo, por quemadura alcalina (Almaliotis et al., 2015; J. Y. Lee et al., 2014; Pınarlı et al., 2014; Rohaina et al., 2014; Yao et al., 2012), por etanol (Oh et al., 2014) o mediante queratectomía (Mittal et al., 2016). Los mecanismos de aplicación varían, desde la utilización de membranas amnióticas hasta inyecciones subconjuntivales e intralimbales. De estos estudios se extraen conclusiones positivas sobre la aplicabilidad de dichas células para tratar daños corneales, sin que medie para ello la diferenciación de las CME en células corneales, si bien éstas han llegado a injertarse en algunos casos (Almaliotis et al., 2015; Mittal et al., 2016).

La capacidad de las CME para diferenciarse a células corneales también ha sido evaluada. Algunos estudios *in vivo*, utilizando animales con distintas deficiencias en proteínas de la córnea, muestran la capacidad de las CME para injertarse en el estroma y expresar marcadores propios de queratocitos (Coulson-Thomas et al., 2013; Liu et al., 2010). A este propósito puede ser de utilidad un tipo celular de la córnea aislado más recientemente y denominado como células mesenquimales limbares (Polisetty et al., 2008). A estas células se atribuyen características similares a las CME (adherencia al plástico y también expresión de ciertos marcadores de superficie). Estas células han

demostrado su capacidad de diferenciación hacia otros tipos celulares de la córnea, así como su capacidad de inmunosupresión (Bray et al., 2014; Hashmani et al., 2013; Katikireddy et al., 2014).

La naturaleza inflamatoria de la enfermedad de ojo seco, la hace también un buen candidato para el tratamiento con CME. Beyazyıldız y cols. (2014), consiguieron mejorar el volumen de lágrima y la inflamación ocular, utilizando un tratamiento tópico con CME, en un modelo de ojo seco en ratas. En otro modelo de ojo seco, esta vez en ratones y de naturaleza inflamatoria, al ser generado por inyección de concavalina A en la glándula lagrimal, los autores también observaron una mejoría en el volumen de lágrima y una disminución en la infiltración de linfocitos  $CD4^+$  tras la inyección periorbital de CME (Lee et al., 2015b). Finalmente, en un estudio clínico con 22 pacientes con ojo seco secundario a EICH crónica, se inyectaron CME por vía intravenosa, lo que tuvo como resultado la mejoría de la mitad de los pacientes (12) en los test de ojo seco. Estos resultados fueron asociados a un aumento en el número de linfocitos T  $CD8^+/CD28^-$ , con una baja capacidad proliferativa (Weng et al., 2012).

# **Hipótesis y objetivos**



El síndrome de ojo seco representa una de las afecciones oculares más comunes y afecta a entre un 10% y un 15% de la población mundial de edad avanzada (Stewart et al., 2005). Aun cuando no se conocen actualmente los mecanismos patogénicos que originan el ojo seco, existe una creciente evidencia que sugiere que el ojo seco es una enfermedad multifactorial compleja caracterizada por un proceso inmune e inflamatorio, que afecta a la glándula lagrimal y a la superficie ocular. Dentro de los tipos de ojo seco hiposecretor de mayor gravedad, se encuentran entidades como el síndrome Sjögren o el ojo seco secundario a la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) (Lemp et al., 2007b).

La EICH es la mayor causa de morbilidad y mortalidad entre los pacientes sometidos a alotrasplante de células progenitoras hematopoyéticas. Ésta se debe al efecto inmune de los linfocitos T del donante sobre determinados órganos y tejidos del paciente. Uno de los órganos diana más frecuentemente afectados por la EICH es el ojo. Así, entre el 60-90% de los pacientes con EICH presenta afectación ocular, lo que se conoce como Enfermedad de Injerto contra Huésped Ocular (EICHo) (Balasubramaniam et al., 2015). En última instancia, la superficie ocular se ve afectada con el desarrollo de queratitis y ulceraciones corneales (Shikari et al., 2013). Nuestro grupo ha utilizado con anterioridad un modelo murino de EICH para el estudio de distintos aspectos de esta enfermedad en el que la afectación ocular es evidente (Lorenzo et al., 2011).

En este contexto, las células mesenquimales estromales (CME) se perfilan como un potencial candidato de terapia celular, debido a su multipotencialidad, la facilidad de obtención y expansión *in vitro* y sus propiedades antiinflamatorias (Rasmusson, 2006; Shi et al., 2010). Son numerosos los trabajos realizados, tanto con modelos animales como en ensayos clínicos, en los que CME expandidas *ex vivo* han sido capaces de reparar el daño, tanto traumatológico como de cualquier otro origen, y recuperar la función normal, al menos parcialmente (Almaliotis et al., 2015; He et al., 2014; Roddy et al., 2011). Según algunos estudios, las CME son capaces de migrar hacia los lugares con inflamación (Sanchez-Abarca et al., 2015; Squillaro et al., 2016).

A la vista de lo anterior, nos planteamos las siguientes hipótesis:

- El modelo de EICH en ratón reproduce las características de la EICHo que se observan en humanos, incluyendo las alteraciones de la película lagrimal propias del ojo seco.

- Las CME son efectivas para el tratamiento de la EICHo, dada la naturaleza inflamatoria de esta enfermedad. La inflamación que se produce en la córnea en la EICH supone un estímulo que permite la migración de las CME hacia ella, lo que puede ayudar a reparar el tejido.

Con estas hipótesis como punto de partida, nuestros objetivos principales son:

1. Conocer la capacidad de migración hacia la córnea de las CMEh inyectadas por vía subconjuntival, así como su capacidad de diferenciación en células corneales.
2. Avanzar en el conocimiento de la EICHo, como modelo de ojo seco.
  - a. Evaluar la presencia de signos de ojo seco, como hiperosmolaridad y descenso de volumen lagrimal.
  - b. Determinar los cambios patológicos que suceden en la córnea de los ratones con EICHo, analizando la infiltración de células inmunitarias y las posibles alteraciones del epitelio corneal.
3. Conocer el efecto del tratamiento con CMEh.
  - a. Analizar los posibles efectos del tratamiento sobre la presencia de los signos de ojo seco.
  - b. Comparar los fenómenos de infiltración de células inmunitarias y alteraciones del epitelio corneal tras el tratamiento con CMEh.

# **Material y Métodos**



### 3.1 Animales

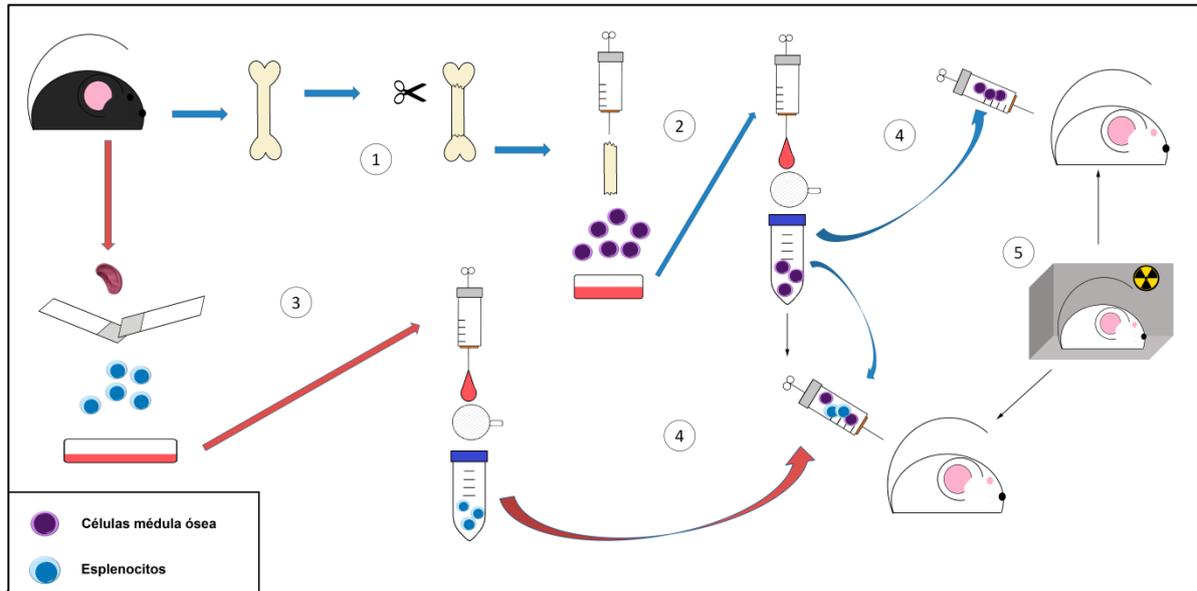
Todos los protocolos de mantenimiento, manipulación y eutanasia de los animales empleados en este estudio fueron llevados a cabo siguiendo las directrices del Consejo de las Comunidades Europeas (Directiva 2010/63/EU) y la legislación española (Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, BOE de 8 de febrero de 2013) para el uso y cuidado de animales de laboratorio en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. Además, todos los proyectos que incluían la utilización de animales, fueron evaluados por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca antes de comenzar la experimentación (número de permiso del comité de ética JLR/bb).

#### 3.1.1 Generación del modelo de EICHo

Para la generación del modelo de EICHo se realizó un trasplante de médula ósea a los ratones (Fig. 12). Se utilizaron ratones hembra BALB/c (H2<sup>d</sup>) y macho C57BL/6 (H2<sup>b</sup>) de entre 8 y 10 semanas de edad, que se obtuvieron de Charles River Laboratories (France), y fueron alojados con libre acceso a comida y agua *ad libitum* en condiciones libres de patógenos específicos. Se extrajeron la médula y el bazo de los machos C57BL/6 (H2<sup>b</sup>), previamente sacrificados por dislocación cervical, mediante métodos anteriormente descritos (Lorenzo et al., 2011; Sanchez-Abarca et al., 2015). Las células de médula ósea se recolectaron de tibia y fémur. Tras extraer estos huesos, se retiró cuidadosamente el tejido muscular y se separaron ambos huesos por la articulación de la rodilla. Para acceder a la cavidad medular, se cortaron los extremos distales de ambos huesos. Las células de médula ósea se recogieron empujando por esta cavidad medio de cultivo (DMEM con penicilina/estreptomicina al 1%) contenido en una jeringa de 1 ml con una aguja de 25G hacia una placa de Petri estéril. La separación de células del bazo se llevó a cabo aplastando cuidadosamente los tejidos para liberar las células, para lo que se utilizaron portaobjetos esmerilados, previamente esterilizados. Ambos preparados de células fueron transferidos a sendos tubos de 15 ml, pasándolos a través de un filtro de 50 µm de tamaño de poro, para centrifugar (10 min a 300 xg) y resuspender las células para su posterior recuento.

Los receptores fueron hembras BALB/c (H2<sup>d</sup>), a las que se sometió a una irradiación corporal total (850 cGy divididos en dos fracciones separadas 4 h) de una fuente de cesio (GammaCell 200, Nordion International, Ottawa, ON, Canadá) como régimen de

condicionamiento. Tras la irradiación, se inocularon  $5 \times 10^6$  células de médula ósea de los ratones donantes por vía intravenosa junto con esplenocitos ( $4 \times 10^6$  o  $5 \times 10^6$  células) como fuente de linfocitos T, resuspendidas en  $300 \mu\text{l}$  de DMEM con antibióticos. Para el grupo control de médula ósea el trasplante se realizó inoculando sólo células de médula ósea. La inyección se realizó a través de las venas de la cola.



**Figura 12.** Esquema de la generación del modelo de EICH

1. Se extrajeron la tibia y el fémur y se cortaron las epífisis para acceder a la cavidad medular.
2. Con una jeringa, se empujó el contenido de la cavidad medular hacia una placa estéril, para, después, filtrarlo hacia un tubo de 15 ml.
3. Paralelamente, se recogió el bazo y se disgregó utilizando portaobjetos esmerilados, filtrando, finalmente, hacia un tubo de 15 ml.
4. Se centrifugaron los preparados de células, se contaron éstas y se hicieron los preparados para la inyección

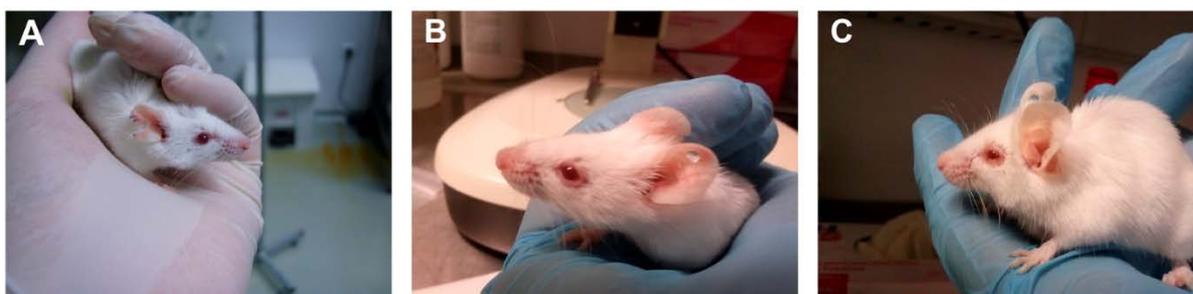
### 3.1.2 Seguimiento de los signos de EICHo

Los ratones enfermos fueron valorados dos veces por semana, atendiendo a la aparición de signos de EICH, como fue descrito por Cooke y cols. (1996). Estos signos incluyen postura, actividad, erizamiento del pelo e integridad de piel y se les asignó un valor entre 0 y 2 en función de su grado de severidad (Tabla 2). Al ser sumados, se obtiene una puntuación de EICH de 0 a 10.

<b>Criterio</b>	<b>Grado 0</b>	<b>Grado 1</b>	<b>Grado 2</b>
<i>Pérdida de peso</i>	Pérdida menor del 10%	Pérdida entre 10% y 25%	Pérdida mayor del 25%
<i>Postura</i>	Normal	Encorvamiento en reposo	Encorvamiento severo. Afecta al movimiento
<i>Actividad</i>	Normal	Disminución de leve a moderada	Inmóvil a menos que se le estimule
<i>Textura de pelaje</i>	Normal	Encrespado de leve a moderado	Bastante encrespado. Pobre acicalamiento
<i>Integridad de la piel</i>	Normal	Descamación en patas o cola	Áreas de piel desnuda evidentes

**Tabla 2.** Evaluación de signos de EICH. Modificada de Cooke y cols. (1996).

También se les pesó, calculando el porcentaje de pérdida de peso, tras lo cual les fue asignado un valor de 0 (menos de un 10% de pérdida), 1 (entre un 10 y un 25% de pérdida) o 2 (más de un 25% de pérdida de peso). Además se monitorizaron las características macroscópicas de los ojos de estos ratones, teniendo en cuenta: pérdida de pelo periocular, alteración del borde palpebral y blefarospasmo (Fig. 13). A cada ojo se le asignó un valor en función del número de estas características que presentaba: ninguna (0), una (1), dos o más (2).



**Figura 83.** La severidad de la afectación ocular fue puntuada de 0 a 2, según tres signos clínicos: pérdida de pelo periocular, alteración del borde palpebral y blefarospasmo. (puede ser repetitivo)

- Una puntuación de 0 significa que ninguno de estos signos fue observado (A).
- Una puntuación de 1 indica que uno de los parámetros mencionados fue detectado (B).
- Una puntuación de 2 fue asignada cuando se observaron dos o más signos de los descritos (C).

Las observaciones fueron llevadas a cabo por dos personas distintas, para minimizar la subjetividad de las valoraciones. Como se explicará en los resultados, para algunas valoraciones se utilizó un sistema de puntuación en el que, al valor de 0 a 10 descrito para puntuar la EICH, se le sumó el valor dado al ojo correspondiente. Esto da lugar a una puntuación de 0 a 12, que permitió distinguir entre una EICH ocular leve (puntuaciones de 0 a 5) o una EICH ocular severa (puntuaciones de 6 a 12).

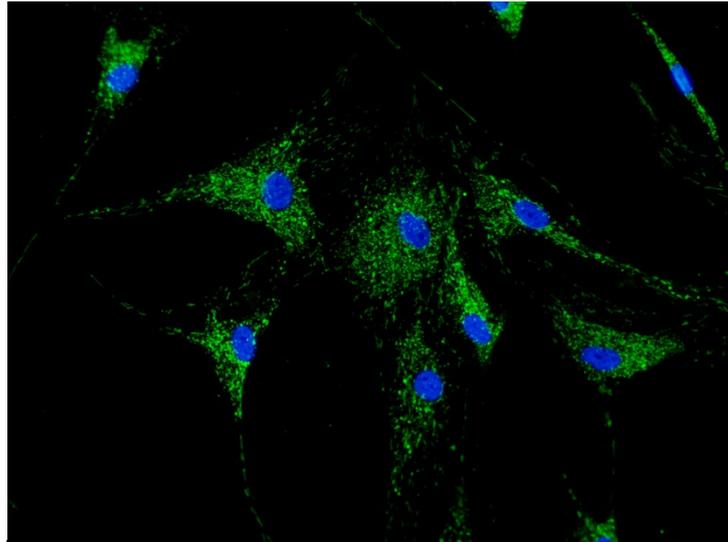
## **3.2 Tratamiento con CMEh**

### **3.2.1 Cultivo de CMEh**

Las CME humanas (CMEh) fueron proporcionadas por el Departamento de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca. El aislamiento, expansión y transfección de CMEh se hizo a partir de muestras de médula ósea humana. La extracción de la médula ósea se realizó en todos los casos bajo anestesia local, por punción de cresta ilíaca o esternón. 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.

A continuación, se llevó a cabo la separación celular por gradiente de densidad, siguiendo el método de Minguell y Erices (2006). Se diluyó la muestra en medio Hanks (Hanks Salt Solution, Gibco) y se centrifugó con Ficoll (GE Healthcare BioScience) durante 30 min a 500 xg. Se recuperaron las células mononucleadas de la interfase y se lavaron dos veces en medio Hanks (10 min a 300 xg). Las células se resuspendieron en el medio de expansión de CME, consistente en DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium-low glucose, Gibco) suplementado con suero bovino fetal al 10% y penicilina/estreptomicina al 1%. Después se cultivaron a una concentración máxima de  $10^6$  células/cm<sup>2</sup> en frascos de cultivo en el medio de expansión correspondiente. Se mantuvieron en estufa de CO<sub>2</sub> (a 37°C y 90% de humedad) 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. A continuación, se procedió a despegar las células para realizar el primer pase mediante tripsinización; y se replantaron para su expansión a una concentración de 5000 células/cm<sup>2</sup>. La selección de la población mesenquimal se realizó a través de sucesivos pases, empleándolas para el modelo animal en pase 3.

En algunos experimentos, las CMEh fueron transfectadas con el vector pLV-CMV-Luc2-ires-GFP que permitiría el seguimiento celular mediante fluorescencia debido a la expresión de GFP (Green Fluorescent Protein) (Fig. 14). Para la transfección se empleó sobrenadante con partículas lentivirales que contenían el vector. Partiendo de CMEh en fase 2 al 40% de confluencia,



**Figura 14.** Células mesenquimales estromales en cultivo

se cambió el medio de expansión por medio de transfección 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 8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  para aumentar la eficiencia de la transfección. Se mantuvo en paralelo un cultivo sin medio de transfección como control. Tras 24 h a 37°C en la incubadora de CO<sub>2</sub> se cambió el medio de transfección por medio fresco de expansión y se mantuvo el cultivo en condiciones estándar de expansión de CMEh hasta el momento de su uso en el modelo animal. Las células GFP<sup>+</sup> fueron analizadas mediante citometría de flujo para determinar la eficiencia de la transfección.

### 3.2.2 Inyección subconjuntival

Para el tratamiento con inyección subconjuntival, los animales fueron sedados con isoflurano al 1,5%. A continuación se instiló una gota de anestésico local en el ojo a tratar y se realizó la inyección de 20  $\mu\text{l}$  del medio de tratamiento (TFS con o sin CMEh), utilizando una jeringa de 0,5 ml con una aguja incorporada de 27G (Terumo), a nivel subconjuntival, a unos 5 mm del limbo esclerocorneal, aproximadamente. Tras la inyección, se instiló una gota de ciprofloxacino tópico (3 mg/ml; Alcon).

Durante la realización de esta tesis se han llevado a cabo varios experimentos con distintos grupos experimentales. Los ojos analizados en los distintos experimentos corresponden a alguno de los siguientes grupos (Tabla 3):

<i>Grupo</i>	<b>Irradiación</b>	<b>5x10<sup>6</sup> MO</b>	<b>4x10<sup>6</sup> bazo</b>	<b>Animal tratado con CMEh</b>	<b>Ojo tratado con CMEh</b>	<b>Ojo tratado con TFS</b>
<i>Control</i>	NO	NO	NO	NO	NO	NO
<i>MO</i>	SI	SI	NO	NO	NO	NO
<i>EICH</i>	SI	SI	SI	NO	NO	NO
<i>EICH+CME</i>	SI	SI	SI	SI	SI	NO
<i>EICH+CME OI</i>	SI	SI	SI	SI	NO	NO
<i>EICH+TFS</i>	SI	SI	SI	NO	NO	SI

**Tabla 3** Grupos experimentales utilizados según el proceso de trasplante y el tratamiento recibidos.

- Control: córneas de animales que no fueron manipulados antes de ser sacrificados.
- MO: córneas de animales que recibieron irradiación corporal total y trasplante con  $5 \times 10^6$  células de médula ósea y no desarrollan EICH.
- EICH: córneas de animales que recibieron irradiación corporal total y trasplante con  $5 \times 10^6$  células de médula ósea y  $4 \times 10^6$  o  $5 \times 10^6$  células de bazo, provocando EICH. Según la dosis de células del bazo, se subdividen, a su vez, en córneas *4M* o *5M* si el animal recibió  $4 \times 10^6$  o  $5 \times 10^6$  células, respectivamente.
- EICH+CME: córneas de animales que recibieron irradiación corporal total y trasplante con  $5 \times 10^6$  células de médula ósea y  $4 \times 10^6$  o  $5 \times 10^6$  células de bazo y que, además, provienen del ojo que se trató (ojo derecho) con una inyección subconjuntival a día 10 con  $2 \times 10^6$  CMEh. Según la dosis de células del bazo, se subdividen, a su vez, en córneas *4M* o *5M* si el animal recibió  $4 \times 10^6$  o  $5 \times 10^6$  células, respectivamente.
- EICH+CME OI: córneas del ojo no tratado (ojo izquierdo) de animales que recibieron irradiación corporal total y trasplante con  $5 \times 10^6$  células de médula ósea y  $4 \times 10^6$  o  $5 \times 10^6$  células de bazo y que, además, fueron tratados con una inyección subconjuntival a día 10 con  $2 \times 10^6$  CMEh en el ojo derecho. Según la dosis de células del bazo, se subdividen, a su vez, en córneas *4M* o *5M* si el animal recibió  $4 \times 10^6$  o  $5 \times 10^6$  células, respectivamente.

- EICH+TFS: córneas de animales que recibieron irradiación corporal total y trasplante con  $5 \times 10^6$  células de médula ósea y  $4 \times 10^6$  células de bazo y que, además, fueron tratados con una inyección subconjuntival a día 10 con TFS.

### 3.3 Osmolaridad

La osmolaridad de la superficie ocular se midió usando TearLab Osmolarity System (TearLab Corp San Diego, CA, USA), un sistema LOC (lab-on-a-chip) capaz de recolectar una muestra de lágrima y simultáneamente medir su impedancia eléctrica. Primero se aplicaron los procedimientos de control de calidad, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Con un chip desechable, se recogieron 50 nL de lágrima del canto lateral del ojo (Fig. 15). Tras unos segundos, se obtuvieron las lecturas de osmolaridad en miliosmoles por litro.



**Figura 15.** La osmolaridad se midió mediante el TearLab Osmolarity System

### 3.4 Volumen de lágrima



**Figura 16.** El volumen de lágrima se estimó con el test del hilo de rojo fenol

La producción de lágrima se midió con el test del hilo de rojo fenol (PRT-TEST; Tianjin Jingming New Technological Development Co., Ltd. Tianjin, China). Con unas pinzas, se sujetaron los hilos, que se aplicaron a la superficie ocular en el canto lateral del ojo durante 30 s (Fig. 16). Posteriormente, se obtuvieron imágenes del hilo bajo un microscopio con cámara integrada (Olympus Provis

AX70) y se midió la longitud del marcaje rojo mediante un programa de análisis de imagen (Image J<sup>®</sup>, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

### 3.5 Análisis histológico

Los animales fueron sacrificados a distintos días postrasplante: en los experimentos con animales trasplantados con  $5 \times 10^6$  esplenocitos, los animales se sacrificaron a 20, 30 y 40 días postrasplante; en los experimentos con animales trasplantados con  $4 \times 10^6$  esplenocitos los animales se sacrificaron a día 28 postrasplante. Se procedió a la enucleación de los ojos y se separaron las córneas, que fueron fijadas por inmersión en paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente (TA) durante 4 h. Posteriormente se crioprotegieron en sacarosa al 30% y se incluyeron en OCT<sup>®</sup> para obtener criosecciones de 12  $\mu\text{m}$  de grosor en un criostato.

Antígeno	Anticuerpo	Casa comercial	Dilución de uso
<b>Caspasa 3</b>	conejo	Cell Signaling	1:500
<b>CD3</b>	conejo	Abcam	1:200
<b>GFP</b>	IgG policlonal cabra	Abcam	1:500
<b>Mitocondria humana</b>	IgG policlonal ratón	Millipore	1:50
<b>Pax6</b>	IgG policlonal conejo	Covance	1:500
<b>SPRR1B</b>	IgG policlonal conejo	Sigma	1:200

**Tabla 4.** Anticuerpos primarios utilizados en los experimentos de inmunofluorescencia

Para la técnica de inmunofluorescencia, las secciones se descongelaron a TA. Los lavados se realizaron en tampón fosfato salino (TFS). Para la detección de GFP, las secciones fueron sometidas entonces a un tratamiento para recuperación antigénica: se pusieron las secciones en un tampón de citrato sódico 10 mM y se realizaron dos lavados de 3 min en el microondas a potencia media (450 W). Se incubó el tejido con el anticuerpo primario (Tabla 4) en TFS con Triton X-100 al 0,02% y suero del animal del que procediera el anticuerpo secundario. Tras lavar el exceso de anticuerpo primario en TFS con Triton X-100 al 0,02%, se incubaron con el anticuerpo secundario (Tabla 5), asociado a un fluorocromo, en el mismo medio utilizado para el primario, durante una hora. A este medio se añadió también 4',6-diamino-2fenilidol (DAPI, Sigma) a una concentración de 1:10000 para marcar todos los núcleos de las células. Finalmente, se lavaron las secciones

y se montaron para observarlas bajo un microscopio de epifluorescencia (Olympus Provis AX70). Las medidas y recuentos se realizaron sobre imágenes tomadas con el microscopio y mediante un programa de análisis de imagen (Image J<sup>®</sup>, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Antígeno	Anticuerpo	Conjugado con	Casa comercia	Dilución de uso
<b>IgG de conejo</b>	IgG de burro	Cy3	Jackson	1:250
		Cy5		1:250
<b>IgG de cabra</b>	IgG de burro	Alexa fluor 488	Jackson	1:750
<b>IgG de ratón</b>	IgG de burro	Cy3	Jackson	1:250

**Tabla 5.** Anticuerpos secundarios utilizados en los experimentos de inmunofluorescencia.

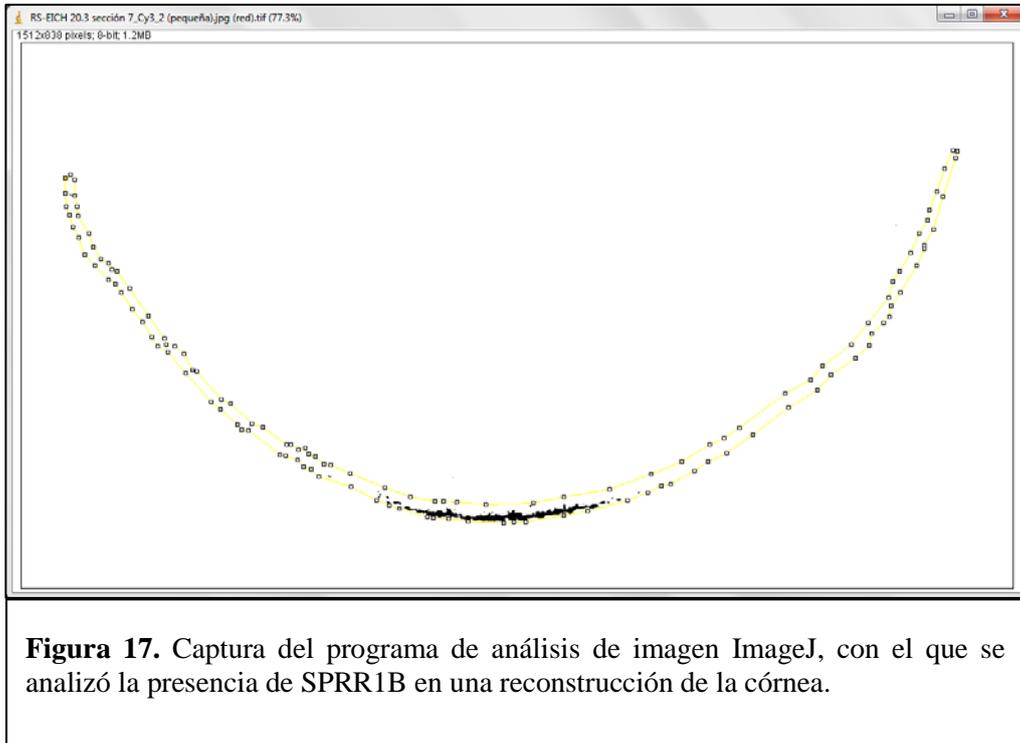
### 3.6 Análisis de imagen

#### 3.6.1 Pax6

Para analizar la presencia de Pax6 en el epitelio corneal, se llevó a cabo un recuento de los núcleos Pax6<sup>+</sup>. Para el recuento se utilizaron 5 secciones no consecutivas por córnea. Se obtuvieron 3 imágenes a 200 aumentos de cada sección, tomadas de las zonas central y paracentral. En estas imágenes se contó el número total de núcleos en el epitelio corneal y el número de núcleos marcados con el anticuerpo anti-Pax6 con el programa ImageJ, obteniendo el porcentaje de núcleos totales que eran Pax6<sup>+</sup>.

#### 3.6.2 SPRR1B

El análisis de la aparición de SPRR1B en el epitelio corneal se realizó mediante la estimación del área epitelial marcada con el anticuerpo anti-SPRR1B. De nuevo, se utilizaron 5 secciones no consecutivas por córnea. Se realizó una reconstrucción de la córnea (Fig. 17) a partir de imágenes a 200 aumentos, utilizando un microscopio de célula viva (Zeiss Axio Observer Z1, Carl Zeiss Microscopy, LLC, United States). Sobre estas imágenes, se delimitó el área del epitelio corneal y se analizó el porcentaje de área con marcaje para SPRR1B, utilizando el programa ImageJ.



### 3.7 Análisis de expresión génica

Para los estudios de expresión génica, se llevaron a cabo experimentos de PCR (polymerase chain reaction). A 21 días postrasplante se enuclearon los ojos y se separaron las córneas, con especial cuidado de no incluir otras estructuras como el limbo esclerocorneal o el iris, y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. El ARN total fue aislado utilizando RNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando para la disgregación del tejido micropistilos estériles, una vez añadido el tampón de lisis. El ADN copia (ADNc) fue sintetizado a partir de 200 ng de ARN, utilizando un kit de retrotranscripción (High Capacity Reverse Transcription Kit; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la PCR cualitativa se empleó el GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, USA), utilizando cebadores específicos para *GAPDH* humana. La especificidad de los cebadores se comprobó mediante BLAST. El protocolo consistió en 10 min de desnaturalización inicial a 95°C seguido de 40 ciclos consistentes en: 30 s de desnaturalización a 95°C, 30 s de alineamiento y 1 min de elongación a 68°C. Como control positivo se utilizó una muestra de ADNc de CMEh.

Para PCR cuantitativa (qPCR) se obtuvieron cebadores específicos para *TNF $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* , *MMP9*, *PAX6* y *GAPDH* (Tabla 6), siendo este último utilizado como control endógeno, como ya se ha utilizado anteriormente en estudios similares (Herretes et al., 2015). Se usó

una mezcla con el fluoróforo SYBR<sup>®</sup> Green (Power Sybr Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, Carls- bad, CA). El protocolo consistió en 10 min de activación inicial a 95°C seguido de 40 ciclos consistentes en 15 s de desnaturalización a 95°C y 1 min de alineamiento y elongación a 60°C.

La expresión relativa se obtuvo por el método de C<sub>T</sub> comparativa ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ), para lo cual se siguieron las recomendaciones de Schmittgen y Livak (2008). En primer lugar se analizaron las eficiencias para los distintos genes de interés, llevando a cabo un experimento de PCR con diluciones seriadas de ADNc con un factor de dilución 1/10, partiendo de una concentración de 1000 ng/μl hasta una concentración de 0,1 ng/μl. Se ajustaron las condiciones de PCR para cada gen de manera que las eficiencias coincidieran con la del control endógeno y fueran del aproximadamente el 100 % (una diferencia como máximo de un 10%).

Una vez definidas las eficiencias, se hicieron los cálculos de expresión relativa siguiendo la fórmula siguiente:

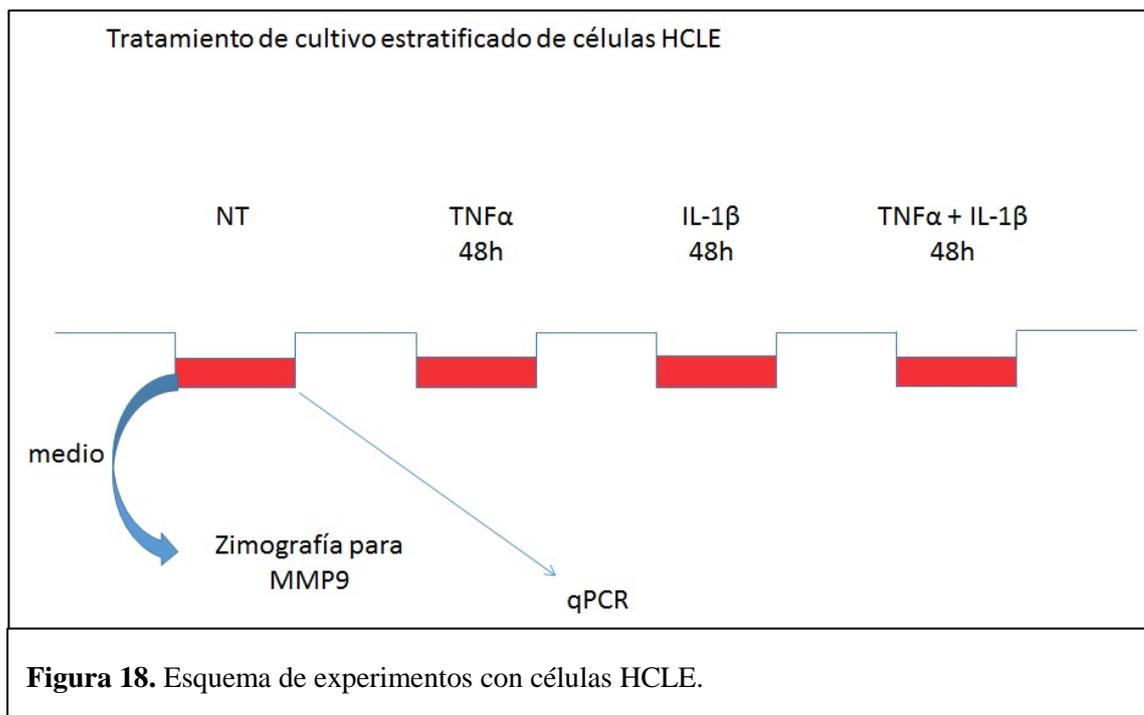
$$2^{-[(C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ control endógeno})_{\text{condición}} - (C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ control endógeno})_{\text{control}}]}$$

Gen	Referencia ENSEMBL	Secuencia 5'-3'	Amplicón
<i>TNF-α</i>	<b>ENSMUSG00000024401</b>	<b>S:</b> TCAGCCTCTTTCATTCCTG <b>A:</b> GGGTCTGGGCCATAGAACTGA	<b>139 pb</b>
<i>IL-1β</i>	<b>ENSMUSG00000027398</b>	<b>S:</b> CAACCAACAAGTGATATTCTCCA <b>A:</b> GGGTGTGCCGTCTTTCATTA	<b>127 pb</b>
<i>MMP9</i>	<b>ENSMUSG00000017737</b>	<b>S:</b> CGACGACGACGAGTTGTG <b>A:</b> CTGTGGTGCAGGCCGAATAG	<b>128 pb</b>
<i>Pax6</i>	<b>ENSMUSG00000027168</b>	<b>S:</b> AGTGAATGGGCGGAGTTATG <b>A:</b> ACTTGGACGGGAACTGACAC	<b>131 pb</b>
<i>gapdh</i>	<b>ENSMUSG00000057666</b>	<b>S:</b> ACTGGCATGGCCTTCCG <b>A:</b> CAGGCGGCACGTCAGATC	<b>63 pb</b>
<i>GAPDH</i>	<b>ENSG00000111640</b>	<b>S:</b> GAGTCAACGGATTTGGTCGT <b>A:</b> GACAAGCTTCCCGTTCTCAG	<b>185 pb</b>

**Tabla 6.** Cebadores utilizados en los experimentos de PCR.

### 3.8 Cultivo de células epiteliales corneo-limbares humanas (HCLE)

Se hicieron algunos experimentos utilizando una línea inmortalizada de células HCLE en el laboratorio del Profesor Pablo Argüeso, en el Schepens Eye Research Institute (Harvard Medical School, Boston). Allí se cultivaron estas células, primero como monocapas en medio de queratinocitos sin suero (KSFM; Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU) hasta que estuvieron confluentes. Después, las células se cultivaron en Dulbecco's modified Eagles's medium (DMEM)/F-12 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EEUU) con suero bovino fetal al 10%, penicilina/estreptomicina al 1% y 10 ng/ml de factor de crecimiento epitelial (EGF) durante 7 días para lograr la estratificación de las células y su diferenciación.



Una vez estratificadas, las células fueron tratadas con TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  o ambas citoquinas. Antes del tratamiento, se hicieron 3 lavados con TFS. A continuación se incubaron las células 1 h en medio DMEM/F12 sin suero y con penicilina/estreptomicina al 1%. Pasado ese tiempo, las células se cultivaron durante 48 h en el mismo medio sin más añadido (control sin tratamiento) o bien añadiendo TNF- $\alpha$  (40 ng/ml), IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) o ambas citoquinas (a las mismas concentraciones). El medio fue renovado a las 24 h. Finalmente, se recogió el sobrenadante para llevar a cabo una zimografía y se extrajo ARN de las células (Fig. 18). Los experimentos se realizaron 3 veces, con triplicados en cada una de ellas.

### 3.8.1 Análisis de expresión génica de células HCLE

La extracción de ARN de células HCLE se llevó a cabo utilizando TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) siguiendo el protocolo del fabricante. Se utilizó 1 ml de TRIzol<sup>®</sup> por 10 cm<sup>2</sup> de placa y se incubaron las células 5 min para permitir la completa disociación de complejos de nucleoproteínas. La retrotranscripción se llevó a cabo a partir de 1 µg de ARN total con un kit de retrotranscripción (iScript; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Con el ADNc obtenido, se llevó a cabo una qPCR con cebadores específicos para *MMP9* y *Pax6* humanas, utilizando *GAPDH* como control endógeno. En este caso el kit utilizado para la amplificación fue SYBR Fast master mix (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, EEUU). El protocolo consistió en 2 min de activación inicial a 95°C seguido de 40 ciclos de 5 s de desnaturalización a 95°C y 30 s de alineamiento y elongación a 60°C. La expresión relativa se obtuvo por el método de C<sub>T</sub> comparativa ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ), como se ha descrito anteriormente.

### 3.8.2 Zimografía

El sobrenadante de las células se centrifugó a alta velocidad (21130 xg) durante 5 min para eliminar los restos de células. Se tomaron 40 µl de muestra y se mezclaron en tampón de carga no reductor (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glicerol, 1% SDS y 0.01% azul de bromofenol) y se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida al 7,5 % con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) y con 1 mg/ml de gelatina (gelatina de piel bovina tipo B, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EEUU). Después el gel se incubó en tampón Tris 50 mM con CaCl<sub>2</sub> 5 mM y Triton X-100 al 2,5 % durante una noche. A continuación el gel se lavó en agua destilada y se incubó en tampón Tris 50 mM con CaCl<sub>2</sub> 5 mM a 37°C durante 2 días. Se tiñó el gel en una solución de azul de Coomassie (40% metanol, 10% ácido acético y 0.025% azul de Coomassie R-250). Finalmente, se lavó el gel en agua destilada, se fotografió y se midió la actividad gelatinasa con Image J<sup>®</sup>.

## 3.9 Análisis estadístico

Los datos se presentan como media ± desviación estándar. Se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov para medir la normalidad de la distribución de los datos. En función de esto y del tamaño de muestra, se utilizó el test *t* de Student o *U* de Mann-Whitney, cuando se compararon dos grupos. Cuando se analizaron las diferencias entre más de dos

grupos, se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA) o un test de Kruskal-Wallis, en función de los mismos criterios. Como posttest se utilizaron el test de Bonferroni (si se utilizó ANOVA) o el test de Dunn (en caso de haber utilizado Kruskal-Wallis). Se consideraron diferencias significativas con un valor  $P < 0,05$ .

# **Resultados**



## 4.1 Efecto terapéutico de las CMEh

Al comienzo de nuestra investigación, llevamos a cabo la generación del modelo de EICH siguiendo el protocolo utilizado por nuestro grupo hasta el momento: inoculando  $5 \times 10^6$  células de médula ósea y  $5 \times 10^6$  esplenocitos (Lorenzo et al., 2011; Sanchez-Abarca et al., 2015). Sin embargo, tras varios trasplantes con este protocolo y avanzada la investigación, detectamos una elevada mortalidad, ya que un gran número de ratones no llegaba a los 30 dpt. Por ello, decidimos cambiar la dosis de células del bazo inoculadas, bajándola hasta los  $4 \times 10^6$  esplenocitos. Como se expondrá más adelante, este cambio parecía traducirse solamente en una menor mortalidad y en una EICH más leve en algunos animales durante los primeros dpt. Aunque una vez transcurridas cuatro semanas la severidad de la EICH era similar con ambos protocolos, cuando realizamos el estudio histológico detectamos un comportamiento distinto en varios parámetros. Por ello, se hace necesario describir separadamente los resultados de los distintos grupos de animales con EICH tratados con uno u otro protocolo. Así, hablaremos de experimentos *5M* o experimentos *4M*, dependiendo de si se trata de experimentos con animales con EICH generada con  $5 \times 10^6$  o con  $4 \times 10^6$  esplenocitos, respectivamente.

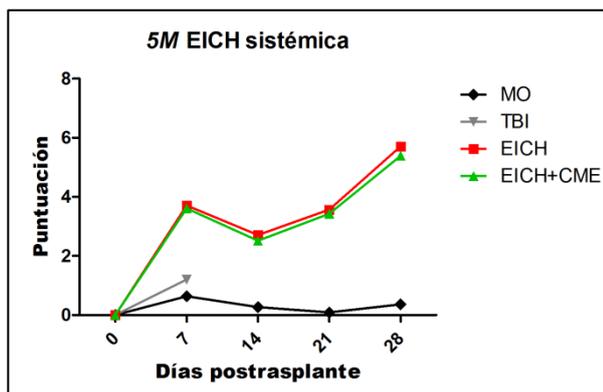
### 4.1.1 Evolución de los signos de EICH

La EICH ocular en ratones se desarrolla presentando claros signos que han sido descritos anteriormente (Lorenzo et al., 2011). Valorar la aparición de signos de la enfermedad a nivel sistémico y ocular en animales tratados y no tratados fue, por tanto, el primer paso para detectar posibles efectos del tratamiento con CMEh.

#### 4.1.1.1 Animales de experimentos *5M*

En la primera semana tras el trasplante empezaron a aparecer los primeros signos de enfermedad, observándose pérdida de peso, pelo más erizado, declive en la actividad y la adopción de una postura encorvada. La puntuación fue similar tanto en tratados como en no tratados, con valores de 3,6 y 3,7 respectivamente (Fig. 19). Entre el día 4 y el día 7 empezaron a aparecer signos oculares (Fig. 20A), predominando entre ellos el blefarospasmo. Es de señalar que no existe gran diferencia en la afectación ocular entre los grupos antes de la inyección (antes del día 10), habiendo incluso un mayor porcentaje de ojos del grupo *EICH* sin signos aparentes de la patología: el 35,7% de los ojos en el grupo *EICH*, frente al 21,7% y 13,0% en los grupos *EICH+CME* y *EICH+CME OI*, respectivamente (Fig. 20E).

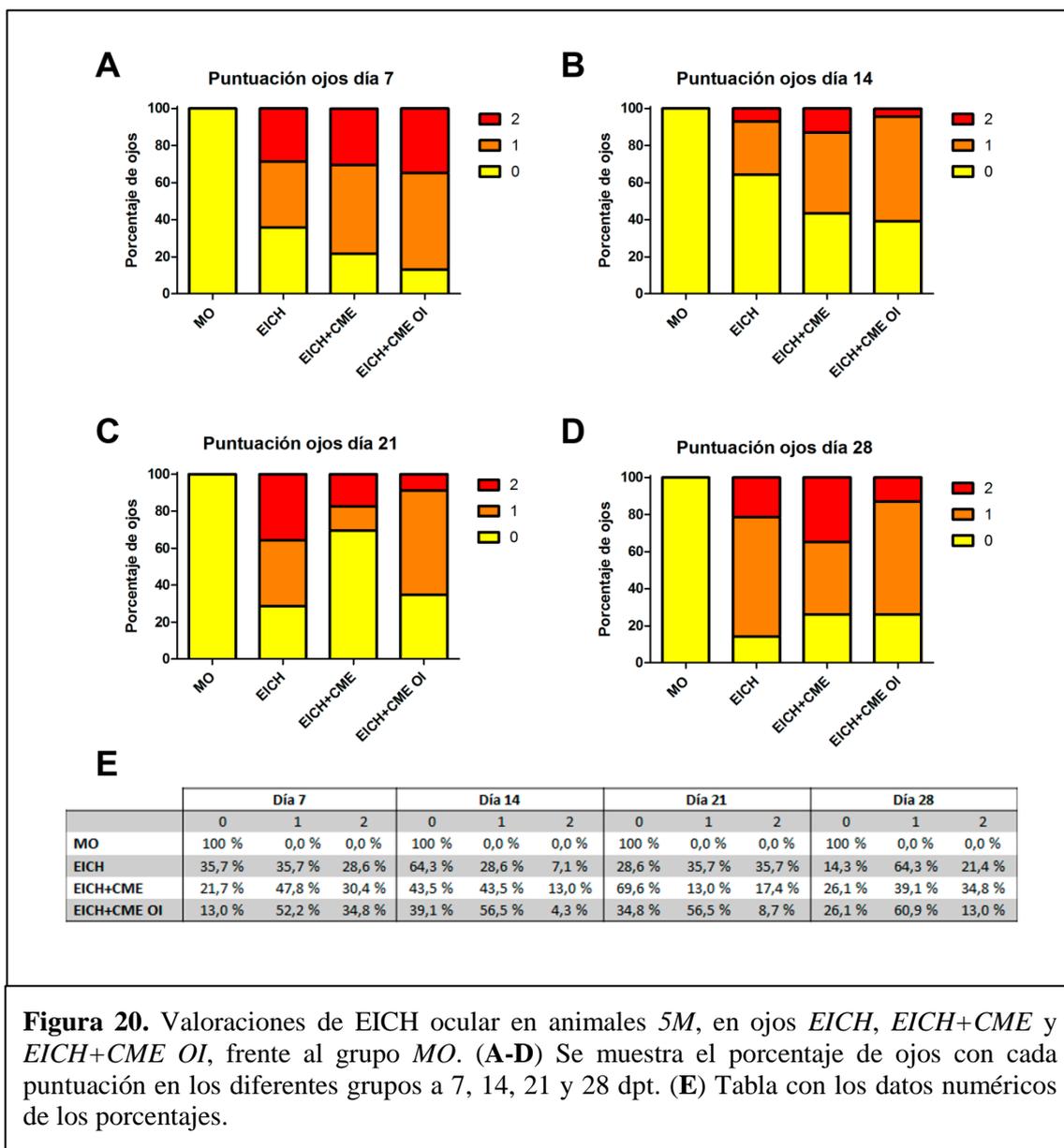
En el día 10 se realizó la inyección con CMEh. A las dos semanas postrasplante, todos los ratones experimentaron una ligera mejoría, incluidos aquellos animales no tratados (Fig. 19). El peso aumentó en todos ellos y, en algunos, también se observaba una mayor actividad del ratón, presentando una puntuación de 2,7 en animales no tratados y de 2,5 en animales tratados. También disminuyó la



**Figura 19.** Evolución de la puntuación de EICH en animales 5M, en los grupos *EICH* y *EICH+CME*, a lo largo de los diferentes días postrasplante analizados frente a animales *MO* y *TBI*.

presencia de signos de EICHo: el 64,3% de los ojos *EICH* no mostraban ningún signo de enfermedad ocular, al igual que el 43,5% en el grupo *EICH+CME* y el 39,1% de los ojos *EICH+CME OI* (Fig. 20B y E).

En la tercera semana, detectamos un nuevo deterioro de salud en los animales. Se produjo pérdida de peso y aumento en las puntuaciones de postura y actividad, apareciendo también los primeros signos de afectación de la piel. La puntuación de EICH sistémica volvió a subir, llegando a un 3,6 en animales no tratados y a un 3,4 en animales tratados (Fig. 19). La valoración de los ojos empeoró en los no tratados (bastante en los de animales sin tratamiento y ligeramente en los ojos del grupo *EICH+CME OI*) y también en algunos ojos tratados. Sin embargo, la mayoría de los ojos que habían recibido CMEh mejoraron su aspecto, pasando el porcentaje de ellos sin ningún signo aparente a ser el 69,6 %. Por su parte, en el grupo *EICH* los ojos sin signos de enfermedad bajaron hasta el 28,6%, mientras que en los del grupo *EICH+CME OI* disminuyeron ligeramente hasta un 34,8% (Fig. 20C y E).



**Figura 20.** Valoraciones de EICH ocular en animales 5M, en ojos *EICH*, *EICH+CME* y *EICH+CME OI*, frente al grupo *MO*. (A-D) Se muestra el porcentaje de ojos con cada puntuación en los diferentes grupos a 7, 14, 21 y 28 dpt. (E) Tabla con los datos numéricos de los porcentajes.

Finalmente, en la cuarta semana el declive de los ratones fue en aumento, apareciendo zonas sin pelaje y una pronunciada pérdida de peso (Fig. 21). La puntuación de EICH se incrementó hasta un 5,7 en animales no tratados y hasta un 5,4 en animales tratados. En relación con el estado de los ojos, se produjo un agravamiento de la enfermedad tanto en los animales no tratados como en los tratados con CMEh (Fig. 20D). Así, los animales tratados mostraron signos oculares de EICH en un porcentaje similar a los no tratados (sólo el 14,3% de los ojos del grupo *EICH* no mostraban signos de EICHo, por un 26,1% tanto en los ojos del grupo *EICH+CME* como en los del grupo *EICH+CME OI*).

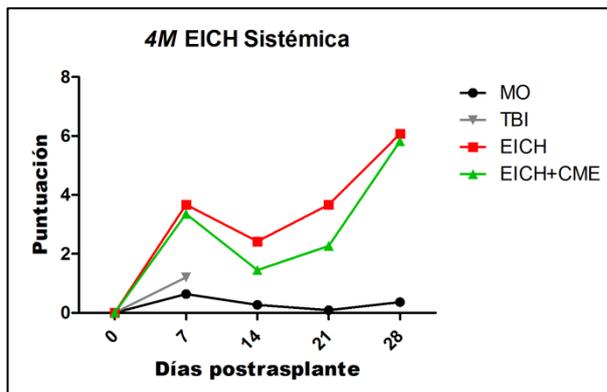
En general, se puede apreciar una evolución similar de la enfermedad a nivel sistémico en ambos grupos. En relación a los ojos, sólo a día 21 mostraron un aspecto algo mejor los tratados (Fig. 20). Sin embargo, al observar las valoraciones de uno y otro ojo en el mismo ratón, no se apreciaba mejor aspecto en el ojo tratado que en el no tratado, si bien es cierto que



**Figura 21.** Pérdida de pelaje en la zona dorsal de un ratón con la piel afectada por EICH a 28 dpt.

la enfermedad puede afectar con distinta virulencia a uno y otro ojo.

#### 4.1.1.2 Animales de experimentos 4M

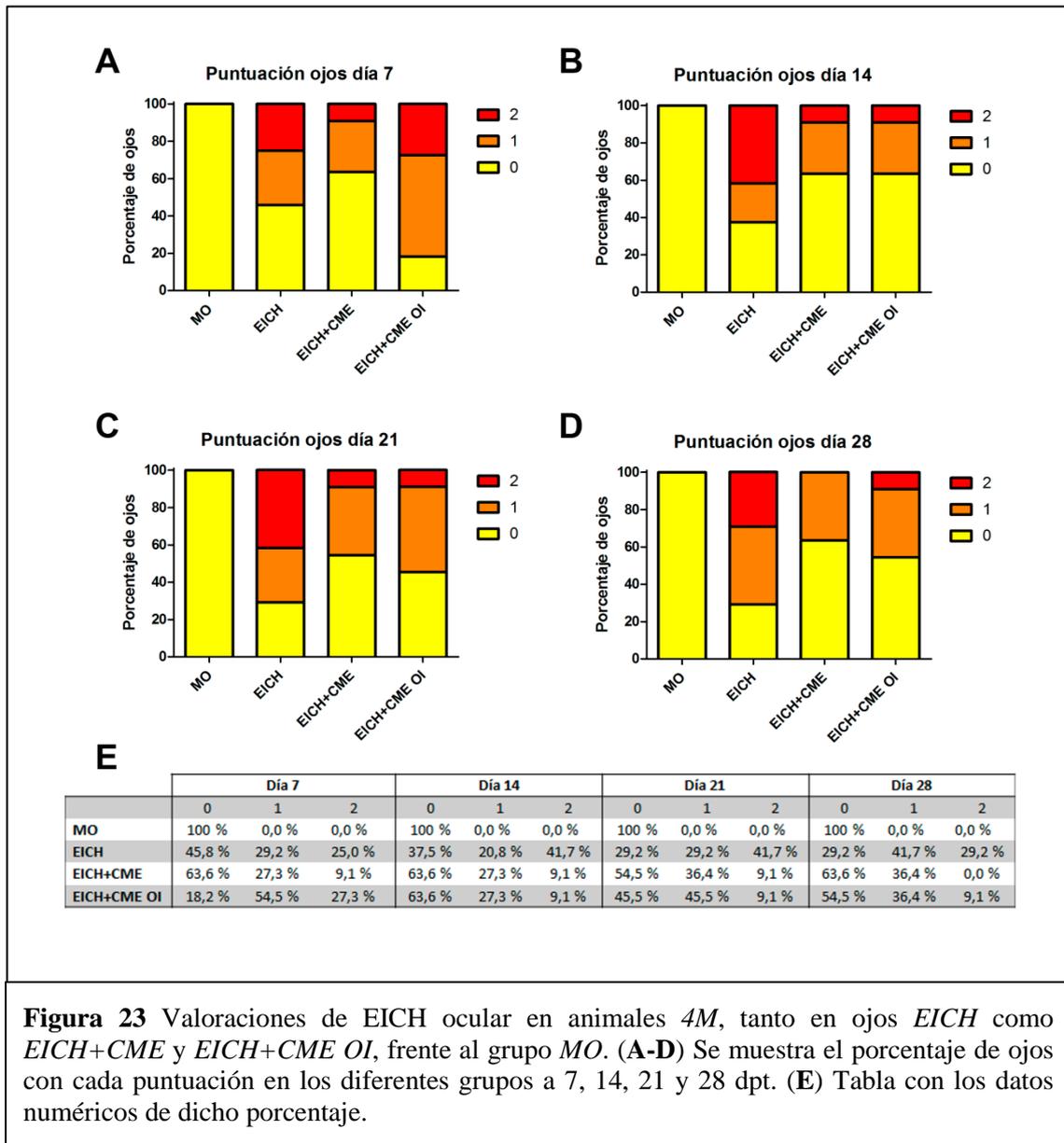


**Figura 22.** Evolución de la puntuación de EICH en animales 4M, tanto EICH como EICH+CME, a lo largo de los diferentes días postrasplante analizados, frente a animales MO y TBI.

Los primeros signos aparecieron, de forma similar que en los animales 5M, entre los días 4 y 7. De nuevo, no se apreciaban diferencias evidentes en la severidad de la enfermedad a nivel sistémico (la media era de 3,7 en los no tratados y 3,4 en los tratados) (Fig. 22), aunque sí había un mayor número de ojos sanos entre los que fueron tratados a día 10. El 63,6% de los ojos EICH+CME no mostraban signos

oculares de la enfermedad, por un 45,8% de los ojos EICH y un 18,2% de ojos EICH+CME OI (Figs. 23A y E).

En la segunda semana, la evolución general de la enfermedad mostró una mayor mejoría en los animales que recibieron la inyección de CMEh (puntuación de 1,5) que en los animales del grupo *EICH* (puntuación de 2,5) (Fig. 22). Incluso los ojos no inyectados de los animales tratados (*EICH+CME OI*) parecieron mejorar a este día. El porcentaje de ojos sin signos de EICHo era el mismo (63,6%) en ambos ojos *EICH+CME* y *EICH+CME OI*, mientras que sólo el 37,5% de los ojos *EICH* no presentaban ningún signo (Fig. 23B y E).

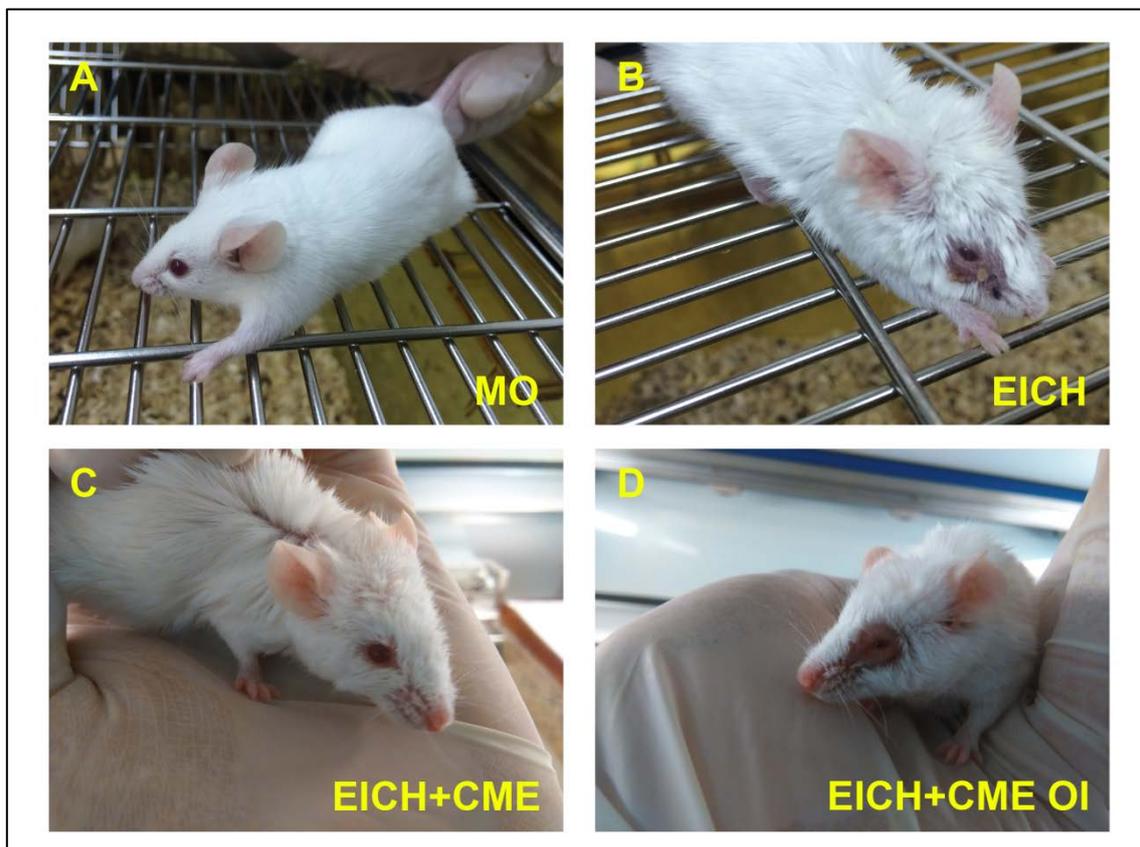


**Figura 23** Valoraciones de EICH ocular en animales *4M*, tanto en ojos *EICH* como *EICH+CME* y *EICH+CME OI*, frente al grupo *MO*. (**A-D**) Se muestra el porcentaje de ojos con cada puntuación en los diferentes grupos a 7, 14, 21 y 28 dpt. (**E**) Tabla con los datos numéricos de dicho porcentaje.

En el día 21 postrasplante, todos los animales con *EICH* empeoraron, aunque la diferencia en el estado general del ratón seguía siendo evidente entre animales tratados y no tratados con CMEh (una puntuación de 2,3 en los tratados frente a un 3,7 en los no

tratados). El estado de los ojos empeoró ligeramente en todos los grupos. Los ojos sin signos de enfermedad bajaron del 37,5% al 29,2% en el grupo *EICH*, mientras que también bajaron en el grupo *EICH+CME OI* (del 63,6% al 45,5%) y algo más ligeramente en el grupo *EICH+CME* (del 63,6% al 54,5%) (Fig. 23C y E).

En la última semana, la enfermedad a nivel sistémico empeoró en todos los animales afectados, llegando a igualarse las puntuaciones de los tratados y no tratados, que se situaron entre el 5,8 (*EICH+CME*) y el 6,1 (*EICH*). Sin embargo, los ojos parecían mejorar muy ligeramente su aspecto, siendo lo más destacable que no observamos ningún ojo del grupo *EICH+CME* con una puntuación de 2 (Fig. 24). Los ojos sin signos de EICHo se mantuvieron en un 29,2% en el grupo *EICH* y aumentaron a más de la mitad, tanto en el grupo *EICH+CME* (63,6%) como en el grupo *EICH+CME OI* (54,4%) (Fig. 23D y E).



**Figura 24.** Afectación ocular en animales 4M. **A:** animal del grupo *MO*. **B:** animal del grupo *EICH*. Las imágenes **C** (grupo *EICH+CME*) y **D** (grupo *EICH+CME OI*) pertenecen al mismo ratón.

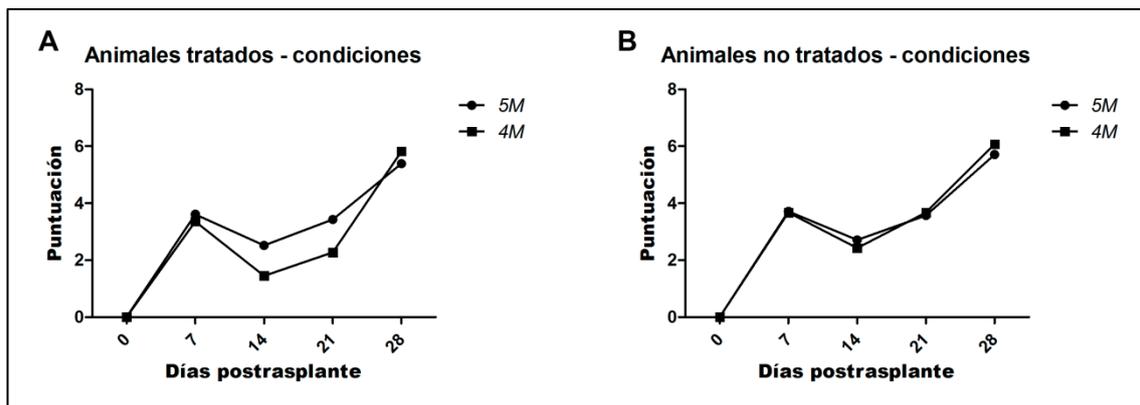
#### 4.1.1.3 Animales del grupo MO y TBI

Los ratones del grupo *MO* no mostraron signos de EICH en ningún momento, ni a nivel sistémico ni a nivel ocular, salvo una ligera pérdida de peso tras el trasplante de la que se fueron recuperando gradualmente (Fig. 19). También los animales del grupo TBI experimentaron una pérdida inicial de peso aunque en general más leve, lo que indica que ésta tiene lugar en parte por un efecto directo de la radiación. Alrededor de los días 10 y 11 los animales del grupo TBI ya presentaban signos evidentes de declive y fueron sacrificados.

#### 4.1.1.4 Comparación entre experimentos 5M y 4M

Cuando comparamos la evolución de la EICH en experimentos *5M* y *4M*, observamos que, mientras que el tratamiento no tiene ningún efecto sobre la puntuación de EICH en animales *5M*, sí se observa una patología más leve de EICH en los animales *4M*. Esta forma más leve de EICH en animales tratados con CMEh era observable a partir de la segunda semana, tras haber recibido el tratamiento. Sin embargo, la puntuación de EICH era similar en animales tratados y no tratados al llegar a la cuarta semana tanto en experimentos *5M* como en *4M* (Fig. 25).

Cuando comparamos a los animales tratados *4M* con los *5M*, observamos una evolución más leve de la EICH en los animales de experimentos *4M*. Sin embargo, la misma comparación con animales no tratados, refleja una evolución similar con ambas dosis de esplenocitos (Fig. 25).



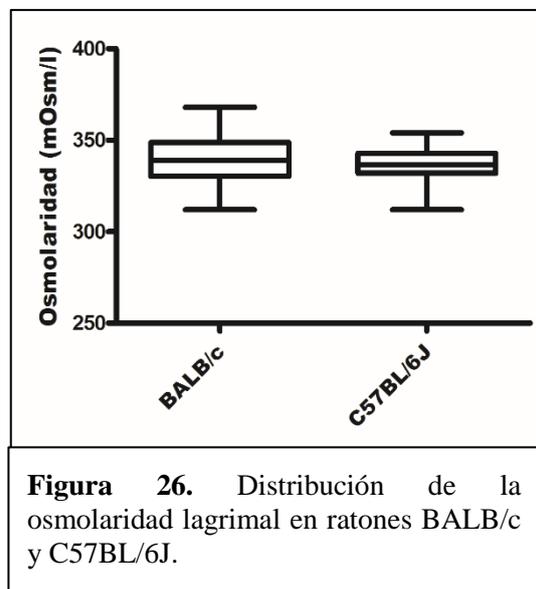
**Figura 25.** Comparación de la puntuación de EICH según la dosis de esplenocitos inoculada. **A:** Animales tratados. **B:** Animales no tratados.

#### 4.1.2 Análisis de la película lagrimal

Algunas de las principales manifestaciones de la EICHo son la inestabilidad de la película lagrimal y el desarrollo de ojo seco (Balasubramaniam et al., 2015; Shikari et al., 2013). Teniendo esto en cuenta, nos planteamos evaluar el estado de la película lagrimal en los ratones con EICH, para lo cual elegimos los parámetros de volumen y osmolaridad de la lágrima.

##### 4.1.2.1 Puesta a punto del TearLab Osmolarity System para su uso en ratones

Para medir la osmolaridad de la lágrima de los ratones, decidimos utilizar el osmolarímetro TearLab Osmolarity System. Puesto que este instrumento no había sido utilizado previamente en ratones, lo primero que hicimos fue comprobar que este aparato era válido para su uso en ellos. Por un lado, había que comprobar que el volumen de lágrima del ratón era suficiente para que el instrumento pudiera dar una medida fiable. Por otro, había que comprobar que las medidas



**Figura 26.** Distribución de la osmolaridad lagrimal en ratones BALB/c y C57BL/6J.

normales dejaran un margen suficiente para que los posibles incrementos en la osmolaridad pudieran ser medidos, teniendo en cuenta el rango de medida del instrumento.

Llevamos a cabo mediciones en 31 ratones BALB/c y 19 C57BL/6J, en ambos ojos y en condiciones control, es decir, sin manipulación previa de los ratones. El resultado fue una media de  $338 \pm 13$  mOsm/L en los ratones BALB/c y una media de  $335 \pm 13$  mOsm/L en el caso de ratones C57BL/6J (Fig. 26) El límite máximo de osmolaridad medible por el osmolarímetro está en 400 mOsm/L. El 92% de los ojos analizados tenían una osmolaridad menor que 355 mOsm/L en ratones BALB/c y menor que 351 mOsm/L en el caso de ratones C57BL/6J. Por tanto, se consideró que el margen en el rango de medida del instrumento sería suficiente para llevar a cabo los siguientes experimentos. Los datos de osmolaridad obtenidos fueron similares a los publicados en

anteriores estudios utilizando otros métodos y con iguales o mejores valores de dispersión (Tabla 7).

Método	Línea	Osmolaridad (mOsm/l)	N	Fuente
Impedancia eléctrica	BALB/c	338 ± 14	31	Este estudio
	C57BL/6J	335 ± 13	19	
A partir de [Na]	BALB/c	285 ± 72	4	Stewart et al., 2005
	C57BL/6J	177 ± 61	4	
A partir de [Na]	129/SV	317 ± 112	4	Chen et al., 2010
	129/SV PKC $\alpha$ K.O.	359 ± 77	4	
Descenso crioscópico	DBA y BALB/c	325 ± 2 <sup>a</sup>	6	Gilbard et al., 1987
	NZB/NZW F <sub>1</sub>	323 ± 1 <sup>a</sup>	-	

**Tabla 7** Comparación de lecturas de osmolaridad de la lágrima en ratón, con diferentes métodos, en este y anteriores estudios. <sup>a</sup>Datos mostrados como media ± SEM.

Además, consideramos importante determinar la repetibilidad de las medidas realizadas con el osmolarímetro. Para comprobarlo, en una muestra menor de individuos (9 ratones BALB/c), realizamos una segunda medición en un intervalo de 15 min y calculamos el coeficiente de correlación intraclase. Este coeficiente nos da una idea de la fiabilidad de las mediciones, comparando la variabilidad de las distintas mediciones realizadas sobre un mismo ojo con la variabilidad total entre los distintos ojos. El resultado fue un valor  $r = 0,95$ , mostrando una excelente fiabilidad.

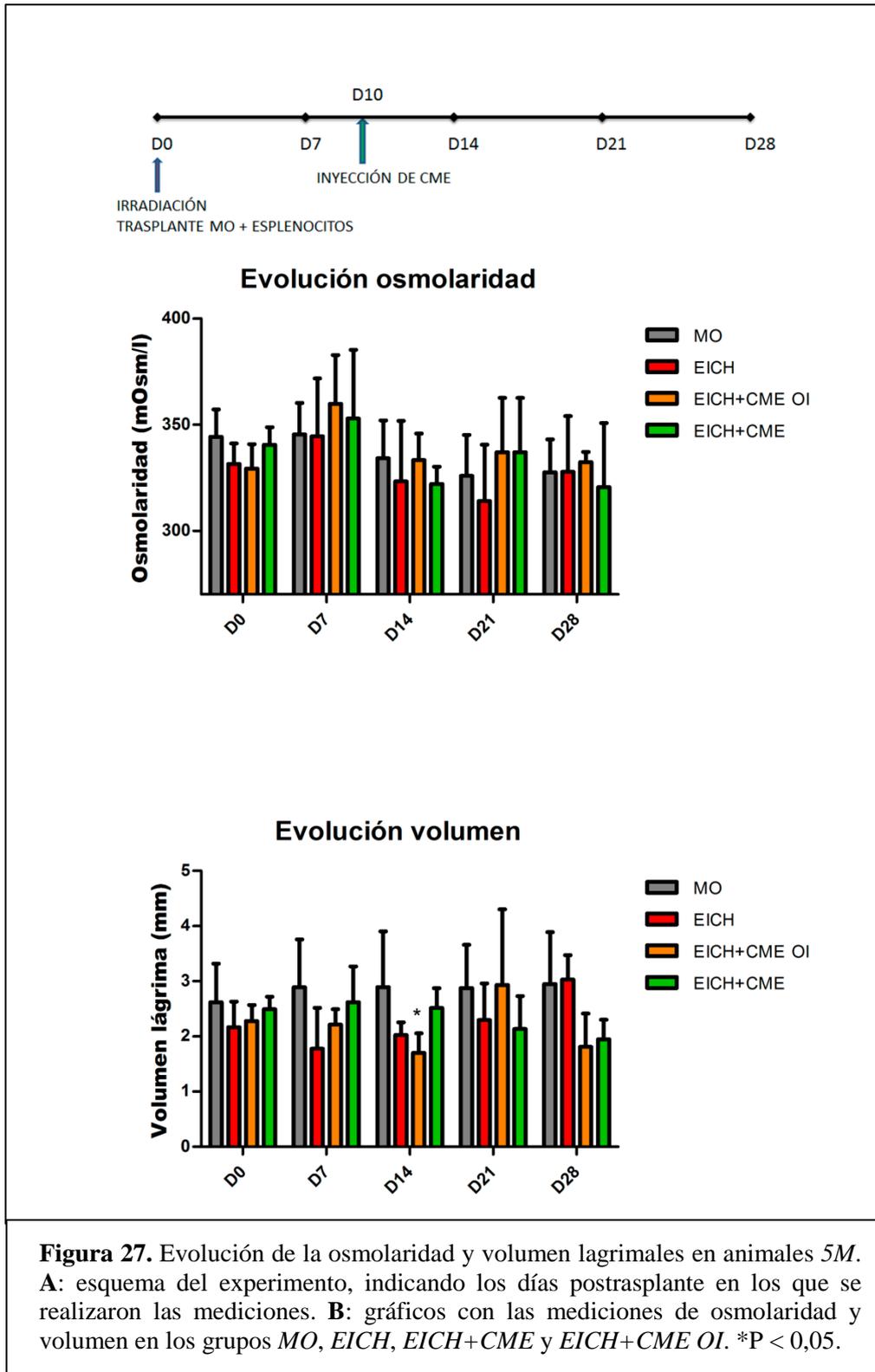
#### 4.1.2.2 Evolución de la osmolaridad y del volumen de lágrima en EICH

Grupo	Irradiación	5x10 <sup>6</sup> MO	4x10 <sup>6</sup> bazo	Animal tratado con CMEh	Ojo tratado con CMEh	Ojo tratado con TFS
MO	SI	SI	NO	NO	NO	NO
EICH	SI	SI	SI	NO	NO	NO
EICH+CME	SI	SI	SI	SI	SI	NO
EICH+CME OI	SI	SI	SI	SI	NO	NO

**Tabla 8.** Grupos animales utilizados para la valoración de la película lagrimal.

Para el estudio de la evolución del estado de la película lagrimal en nuestro modelo de EICH, utilizamos los grupos *MO*, *EICH*, *EICH+CME* y *EICH+CME OI* (Tabla 8).

#### 4.1.2.2.1 Animales de experimentos 5M



Comenzamos a realizar las mediciones de osmolaridad y volumen lagrimales en algunos animales 5M, pero los resultados no parecían concluyentes. Tras el trasplante, se producía un aumento en la osmolaridad y, en algunos, un descenso en el volumen de

lágrima a día 7 (Fig. 27). Pero, en los días siguientes nos encontrábamos con un alto número de decesos. En los animales que sobrevivieron las cuatro semanas que duraba el experimento, la evolución de ambos parámetros era muy desigual entre individuos y la comparación entre grupos variaba mucho de una semana a otra. Mientras que, por ejemplo, a día 14 el volumen de lágrima parecía tener mejores valores en los ojos tratados, en las semanas siguientes se observaba todo lo contrario (Tabla 9). Aumentar el número de individuos lo suficiente para poder observar mejor las posibles tendencias habría supuesto la utilización de un gran número de ratones, por lo que no continuamos con el análisis de lágrima en ratones *5M*.

#### **4.1.2.2 Animales de experimentos 4M**

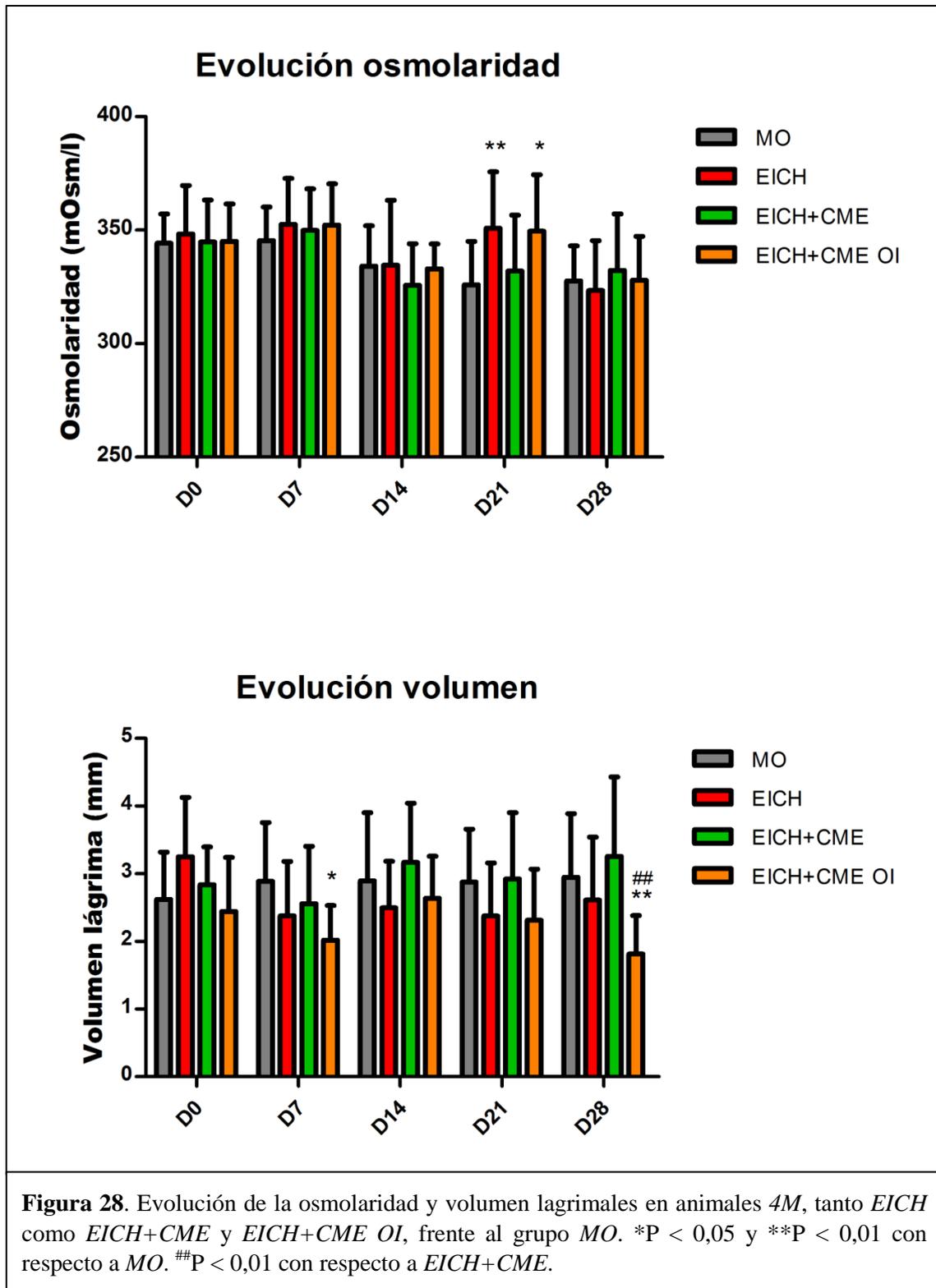
Antes del trasplante, todos los grupos presentaron un nivel de osmolaridad similar y un volumen lagrimal que no mostraba diferencias (Tabla 10). Siete días después del trasplante, la osmolaridad aumentó ligeramente en el grupo *MO* y algo más en los demás grupos (Fig. 28). A pesar de ello, seguía sin haber diferencias estadísticamente significativas. En cuanto al volumen, mientras que aumentó ligeramente en el grupo *MO*, en los demás grupos descendió, llegando a haber diferencias significativas entre el grupo *MO* y el grupo *EICH+CME OI* ( $P < 0,05$ ) (Fig. 28).

En el día 10 postrasplante, se realizó la inyección subconjuntival de *CMEh* en el grupo *EICH+CME*.

A día 14, tanto la osmolaridad como el volumen lagrimales mostraron mejoría en todos los grupos. La osmolaridad descendió en los cuatro grupos a niveles incluso menores que en el día 0 (Fig. 28). Sin embargo, esta mejoría fue muy leve en cuanto al volumen de lágrima en el grupo *EICH*, que no llegó a recuperar los niveles de inicio, mientras que tanto en el grupo *EICH+CME* como *EICH+CME OI* aumentó bastante (Tabla 10). El grupo *MO* mantuvo el nivel de volumen de lágrima sin grandes variaciones.

En la tercera semana, no apreciamos grandes cambios ni en la osmolaridad y ni en el volumen de lágrima en los grupos *MO* y *EICH+CME*. Sin embargo, los dos grupos restantes sufrieron un empeoramiento en ambos parámetros, pero mientras que el descenso en el volumen de lágrima no se tradujo en diferencias significativas con los grupos *MO* y *EICH+CME*, la osmolaridad aumentó hasta mostrar diferencias

estadísticamente significativas entre el grupo *MO* y ambos grupos *EICH* ( $P < 0,01$ ) y *EICH+CME OI* ( $P < 0,05$ ) (Fig. 28).



	MO		EICH		EICH+CME		EICH+CME OI	
	Osmolaridad (mOsm/L)	Volumen (mm)						
<b>Día 0</b>	344 ± 13	2,62 ± 0,70	332 ± 13	2,16 ± 0,47	341 ± 8	2,49 ± 0,23	329 ± 12	2,28 ± 0,29
<b>Día 7</b>	345 ± 15	2,89 ± 0,87	345 ± 27	1,78 ± 0,74	353 ± 32	2,62 ± 0,65	360 ± 23	2,22 ± 0,28
<b>Día 14</b>	334 ± 18	2,89 ± 1,01	323 ± 28	2,03 ± 0,23	322 ± 8	2,51 ± 0,36	333 ± 13	1,70 ± 0,35
<b>Día 21</b>	326 ± 19	2,88 ± 0,78	314 ± 27	2,30 ± 0,66	337 ± 26	2,14 ± 0,60	337 ± 26	2,93 ± 1,37
<b>Día 28</b>	328 ± 16	2,95 ± 0,94	328 ± 26	3,03 ± 0,44	321 ± 30	1,95 ± 0,35	332 ± 5	1,81 ± 0,61

**Tabla 9.** Osmolaridad y volumen de lágrima en los animales *5M*, tanto *EICH* como *EICH+CME* y *EICH+CME OI*, frente al grupo *MO* a 0, 7, 14, 21 y 28 dpt.

	MO		EICH		EICH+CME		EICH+CME OI	
	Osmolaridad (mOsm/L)	Volumen (mm)						
<b>Día 0</b>	344 ± 13	2,62 ± 0,70	348 ± 21	3,25 ± 0,88	345 ± 18	2,84 ± 0,56	345 ± 16	2,44 ± 0,80
<b>Día 7</b>	345 ± 15	2,89 ± 0,87	353 ± 20	2,38 ± 0,80	350 ± 18	2,56 ± 0,85	352 ± 18	2,02 ± 0,51
<b>Día 14</b>	334 ± 18	2,89 ± 1,01	335 ± 29	2,50 ± 0,69	326 ± 18	3,17 ± 0,88	333 ± 11	2,64 ± 0,63
<b>Día 21</b>	326 ± 19	2,88 ± 0,78	351 ± 25	2,38 ± 0,78	332 ± 25	2,92 ± 0,98	350 ± 25	2,32 ± 0,75
<b>Día 28</b>	328 ± 16	2,95 ± 0,94	323 ± 22	2,61 ± 0,93	332 ± 25	3,26 ± 1,18	328 ± 19	1,82 ± 0,56

**Tabla 10.** Osmolaridad y volumen de lágrima en los animales *4M*, tanto *EICH* como *EICH+CME* y *EICH+CME OI*, frente al grupo *MO* a 0, 7, 14, 21 y 28 dpt.

Finalmente, en la cuarta semana apenas observamos cambios en la osmolaridad y el volumen de lágrima en los grupos *MO* y *EICH+CME*, salvo un cierto aumento en el volumen lagrimal de éste último. Tampoco varió significativamente el volumen de lágrima en el grupo *EICH*, mientras que sí descendió en el grupo *EICH+CME OI*, mostrando diferencias significativas tanto con el grupo *MO* como con el grupo *EICH+CME* ( $P < 0,01$ ). En cambio, la osmolaridad mostró un importante descenso en los grupos *EICH* y *EICH+CME OI*, con valores incluso menores (aunque no diferentes estadísticamente) que el grupo *MO*. Cabe señalar que los ratones con *EICH* estaban ya en esta semana bastante afectados por la enfermedad.

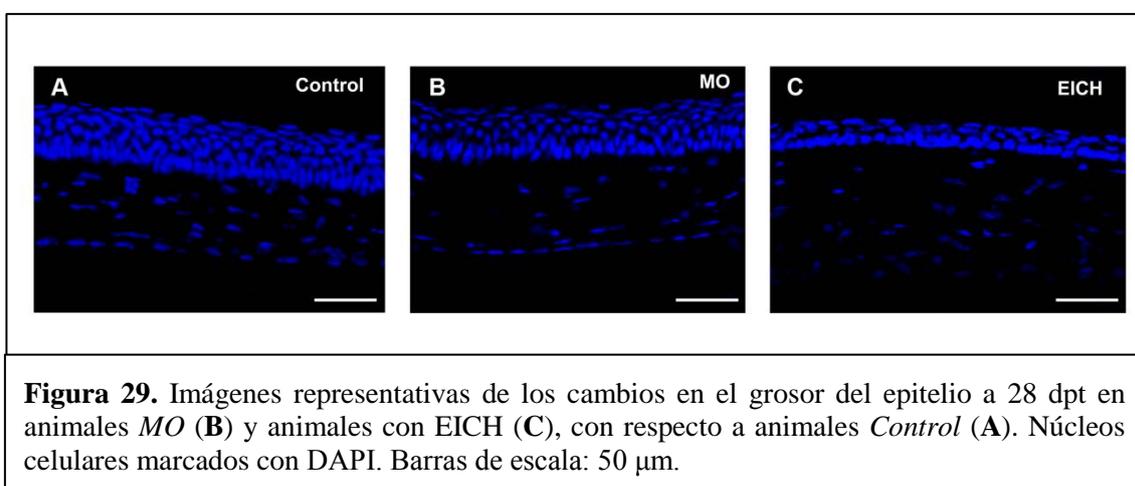
Fue frecuente encontrar valores de osmolaridad anormalmente bajos en animales en un estado grave u ojos extremadamente afectados. Esto se observó a lo largo del experimento, en animales que tuvieron que ser sacrificados antes de finalizar las cuatro semanas por presentar un deterioro excesivo. De igual manera, la mayoría de ojos *EICH* y *EICH+CME OI* mostraron valores bajos de osmolaridad lagrimal en los días finales, coincidiendo con una afectación severa.

#### 4.1.3 Análisis histológico

De nuevo, para el análisis histológico se usaron animales de experimentos *5M* y *4M*, por lo que en cada parámetro se analizan por separado para, después, comparar los resultados con ambos protocolos.

##### 4.1.3.1 Grosor del epitelio

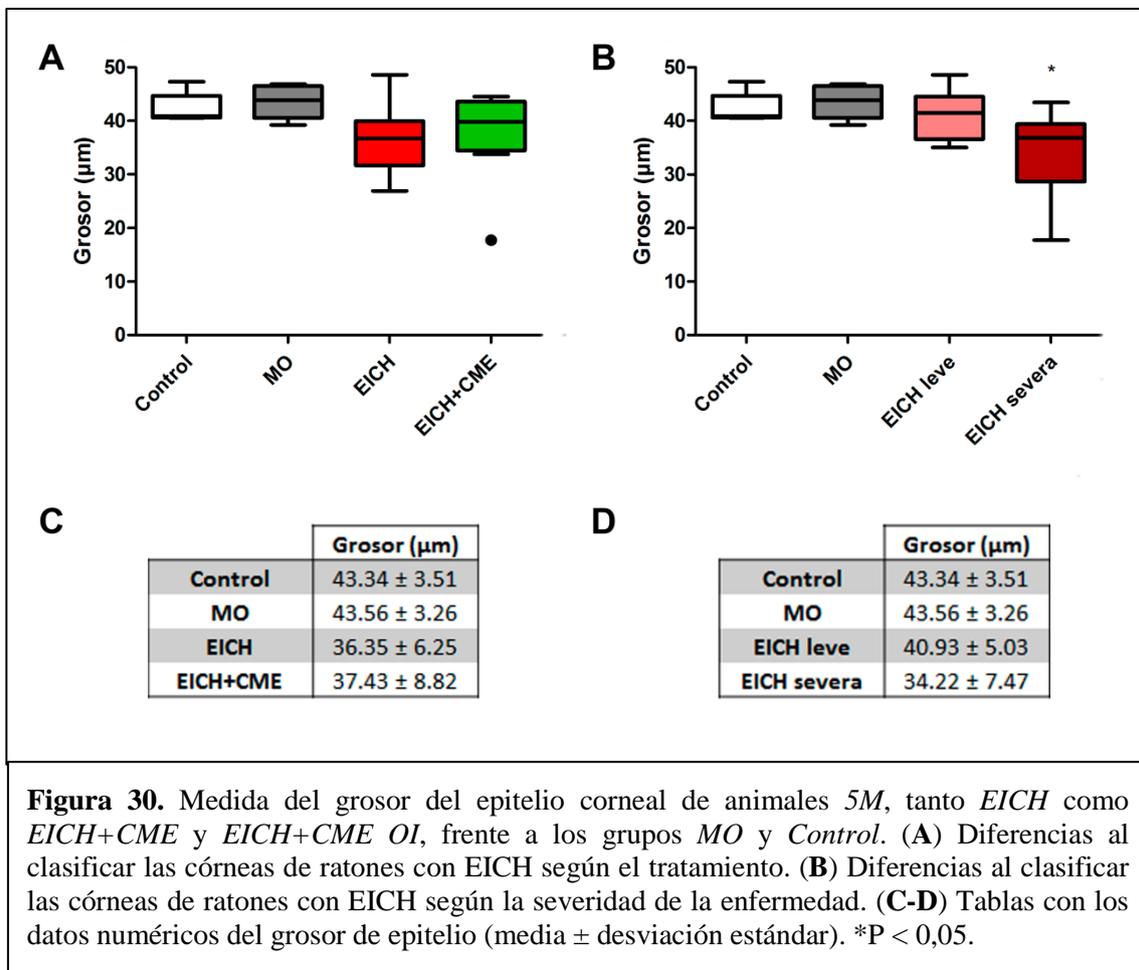
Se analizó el grosor del epitelio corneal de ojos de animales *Control*, animales *MO*, animales *EICH* y de animales tratados con *CMEh* (Fig. 29).



**Figura 29.** Imágenes representativas de los cambios en el grosor del epitelio a 28 dpt en animales *MO* (B) y animales con *EICH* (C), con respecto a animales *Control* (A). Núcleos celulares marcados con DAPI. Barras de escala: 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1.3.1.1 Animales de experimentos 5M

En general, se observó una disminución en el grosor del epitelio corneal en animales con EICH (Fig. 29). Mientras que el grosor del epitelio de ojos de animales *Control* ( $42,29 \pm 2,87 \mu\text{m}$ ) y *MO* ( $43,56 \pm 3,26 \mu\text{m}$ ) mostraba valores similares (Fig. 30), el grosor del epitelio en ojos de animales con *EICH* no tratados y tratados con CMEh fue de  $36,35 \pm 6,25 \mu\text{m}$  y  $37,43 \pm 8,82 \mu\text{m}$ , respectivamente (Fig. 30A y C). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro grupos ( $P = 0,06$ ). Se excluyeron de este análisis las mediciones de algunos animales con un engrosamiento anormal del epitelio, que llegaba a tener en algunas zonas un grosor de  $80 \mu\text{m}$ , ya que eran eventos claramente diferenciados que ocurrían en los animales con afectación ocular más avanzada.



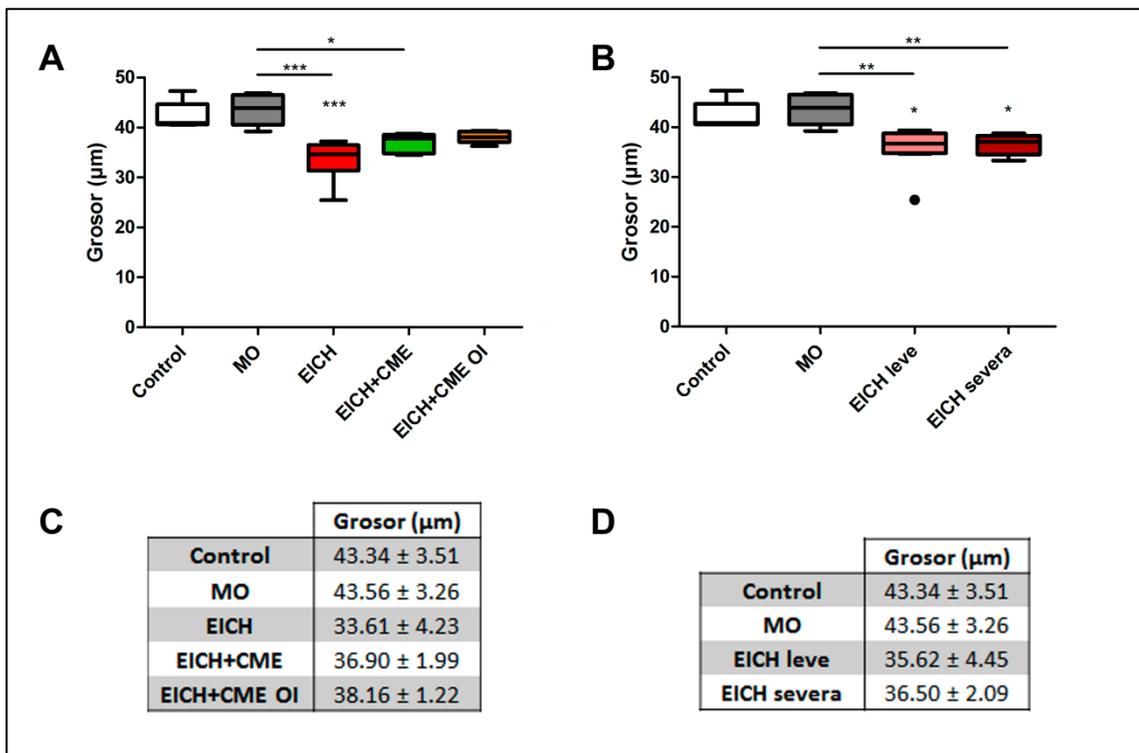
Quisimos saber si los cambios observados en el grosor del epitelio se correspondían con una *EICH* más severa. Transformamos la puntuación de *EICH* dada a los animales, sumando a ésta la puntuación dada al ojo cuya córnea se analizaba. Al observar las

medidas de grosor del epitelio corneal en relación a la puntuación de 0 a 12 así obtenida, se observó que aquellos con una puntuación menor o igual a 5 mostraban unos valores más cercanos a los del grupo *MO* que aquellos con una puntuación igual o mayor que 6. Teniendo esto en cuenta, definimos tres grados de enfermedad:

- Sano, cuando la puntuación era 0.
- Leve, cuando la puntuación era menor o igual a 5.
- Severa, cuando la puntuación era mayor que 5.

Con esta clasificación, encontramos que, independientemente del tratamiento, los ojos de animales que tenían EICH severa en el momento de ser sacrificados, tenían un grosor del epitelio corneal ( $34,22 \pm 7,46 \mu\text{m}$ ) menor que los del grupo *MO*, diferencias que eran estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) (Fig. 30B y D). Las córneas de animales con EICH leve no mostraban diferencias estadísticamente significativas en términos de grosor del epitelio ( $40,93 \pm 5,02 \mu\text{m}$ ).

#### 4.1.3.1.2 Animales de experimentos 4M



**Figura 31.** Medida del grosor del epitelio de animales 4M, tanto *EICH* como *EICH+CME* y *EICH+CME OI*, frente a los grupos *MO* y *Control*. (A) Diferencias al clasificar las córneas de ratones con EICH según el tratamiento. (B) Diferencias al clasificar las córneas de ratones con EICH según la severidad de la enfermedad. (C-D) Tablas con los datos numéricos del grosor de epitelio (media  $\pm$  desviación estándar). \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ .

Las mediciones del grosor del epitelio corneal en ojos del grupo *EICH* dieron como resultado una media de  $33,61 \pm 4,23 \mu\text{m}$ , mientras que en ojos *EICH+CME* y *EICH+CME OI* ésta fue de  $36,90 \pm 1,99 \mu\text{m}$  y  $38,16 \pm 1,22 \mu\text{m}$  respectivamente (Fig. 31A y C). Sólo el grosor de córneas *EICH* mostraba diferencias significativas con el grupo *Control* ( $P < 0,001$ ), mientras que el grupo *MO* tenía un grosor de epitelio significativamente mayor que en las córneas *EICH* ( $P < 0,001$ ) y en las córneas *EICH+CME* ( $P < 0,05$ ).

Al agrupar los valores de grosor de epitelio en función de la severidad de la enfermedad, los resultados eran similares en el caso de *EICH* leve y *EICH* severa ( $35,62 \pm 4,45 \mu\text{m}$  y  $36,50 \pm 2,09 \mu\text{m}$ , respectivamente) (Fig. 31D). Ambos grupos mostraban diferencias tanto con el grupo *Control* ( $P < 0,05$  en ambos casos) como con el grupo *MO* ( $P < 0,01$  en ambos casos) (Fig. 31B).

#### **4.1.3.1.3 Comparación entre experimentos 5M y 4M**

En los resultados expuestos se puede observar cómo en el caso de experimentos *5M* era la severidad de la enfermedad el principal factor que determinaba las diferencias de grosor y no el tratamiento con *CMEh*. Sin embargo, en el caso de experimentos *4M*, el tratamiento mostraba que, si bien todos los animales enfermos tenían una tendencia hacia un grosor menor, sólo los animales no tratados presentaban diferencias significativas con el grupo *Control*; en cambio, la agrupación en función de la severidad de *EICH* no aportaba información adicional y ambos grupos tenían una media de grosor similar. No observamos en los experimentos *4M* ningún animal con engrosamiento del epitelio corneal, algo que sí ocurría en los experimentos *5M* (Figs. 30 y 31).

#### **4.1.3.2 Infiltración de células inmunes en la córnea**

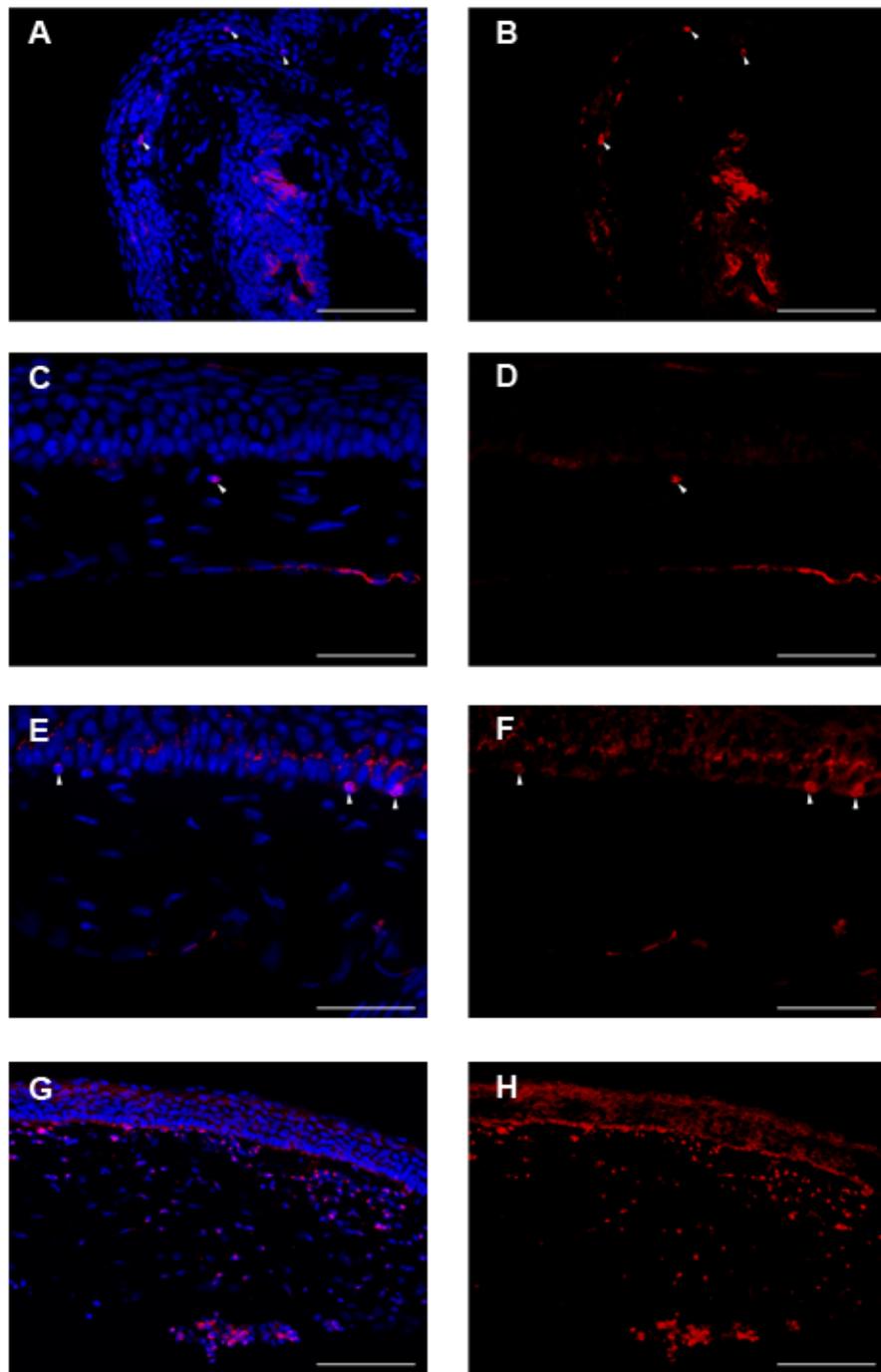
Al observar el tejido corneal de los animales con *EICH* era frecuente encontrar un aumento en la densidad de células en el estroma. Muchas de ellas presentaban núcleos pequeños y redondeados, característicos de linfocitos, por lo que quisimos comprobar si estas células eran linfocitos, principales causantes de la *EICH*. Para ello, utilizamos un anticuerpo anti-CD3, proteína específica de linfocitos T, que forma parte de un complejo de membrana denominado TCR/CD3, en el que se presenta unida al receptor de linfocitos T (TCR).



**Figura 32.** Imagen reconstruida de una córnea de ratón con EICH y división en las zonas consideradas para la gradación. En el estroma se observan, en rojo, células marcadas positivamente para CD3.

#### 4.1.3.2.1 *Animales de experimentos 5M*

No encontramos células CD3<sup>+</sup> en las córneas de animales *Control* y *MO*. En cambio, observamos distintos grados de infiltración de células CD3<sup>+</sup> en las córneas de animales enfermos. En algunos ojos detectamos la aparición de algunas células CD3<sup>+</sup> en la región del limbo esclerocorneal, mientras que en otros a esto se añadía una infiltración masiva que llegaba hasta la córnea central (Fig. 32). Dada la variabilidad en el número de células infiltradas, no parecía útil realizar un recuento, ya que algunas córneas presentaban una entrada masiva de células inmunitarias (más de 100 por sección), mientras que en otras, incluso presentando infiltración, no encontrábamos más de 2 o 3 células por sección. Sin embargo, parecía haber una relación entre el grado de afectación de EICH y la localización de las células CD3<sup>+</sup>. Así, la presencia de células se restringía al limbo o zonas periféricas en los casos más leves, llegando a la córnea central en los más severos.

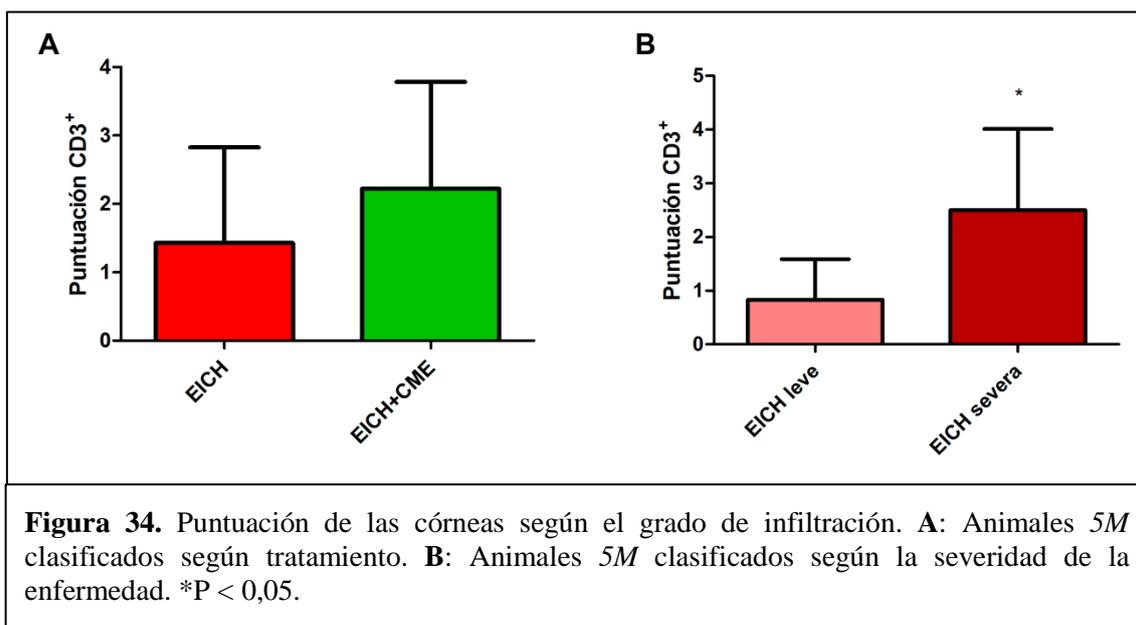


**Figura 33.** Imágenes representativas de distintos grados de infiltración de células  $CD3^+$  (rojo; puntas de flecha) en la córnea. Núcleos marcados con DAPI. (A-B) Córnea con células  $CD3^+$  en el limbo (grado 1). (C-D) Córnea con alguna célula en la zona paracentral (grado 2). (E-F) Varias células en la zona central de la córnea (grado 3). (G-H) Infiltración masiva de células  $CD3^+$  (grado 4). Barras de escala imágenes A, B, G y H: 100  $\mu m$ . Barras de escala imágenes C-F: 50  $\mu m$ .

Para valorar esto, definimos 5 niveles de infiltración de células CD3<sup>+</sup>:

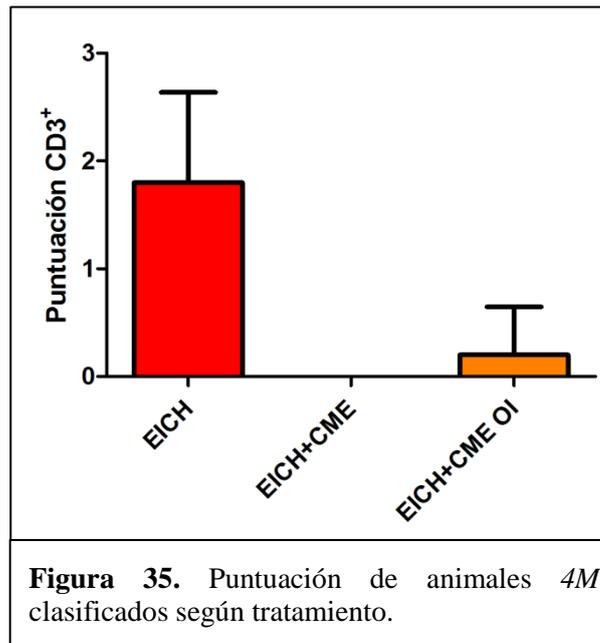
- 0: cuando no había ninguna célula CD3<sup>+</sup>.
- 1: cuando se encontraba alguna célula CD3<sup>+</sup>, pero limitada al limbo esclerocorneal o a la córnea periférica (Fig. 33 A-B).
- 2: cuando se llegaba a ver alguna célula CD3<sup>+</sup> aislada en la córnea paracentral (Fig. 33 C-D).
- 3: cuando las células CD3<sup>+</sup> llegaban a la córnea central, o se encontraban bastantes células en las zonas periférica y paracentral (Fig. 33 E-F).
- 4: cuando la infiltración de células CD3<sup>+</sup> era masiva (Fig. 33 G-H).

No detectamos ningún patrón en el grado de infiltración en función del tratamiento (Fig. 34); pero sí, de nuevo, en función de la severidad de la enfermedad, siendo aquellos animales en peor estado los que mayor infiltración de células CD3<sup>+</sup> mostraban ( $P < 0,05$ ).



#### 4.1.3.2.2 Animales de experimentos 4M

En las córneas de animales *EICH* encontramos también diferentes niveles de infiltración de células CD3<sup>+</sup>. Sin embargo, ninguna córnea *EICH+CME* analizada presentaba marcaje positivo para CD3, mientras que sólo en una córnea *EICH+CME OI* se observaban células CD3<sup>+</sup>, circunscritas al limbo esclerocorneal (Fig. 35).



#### 4.1.3.2.3 Comparación entre experimentos *5M* y *4M*

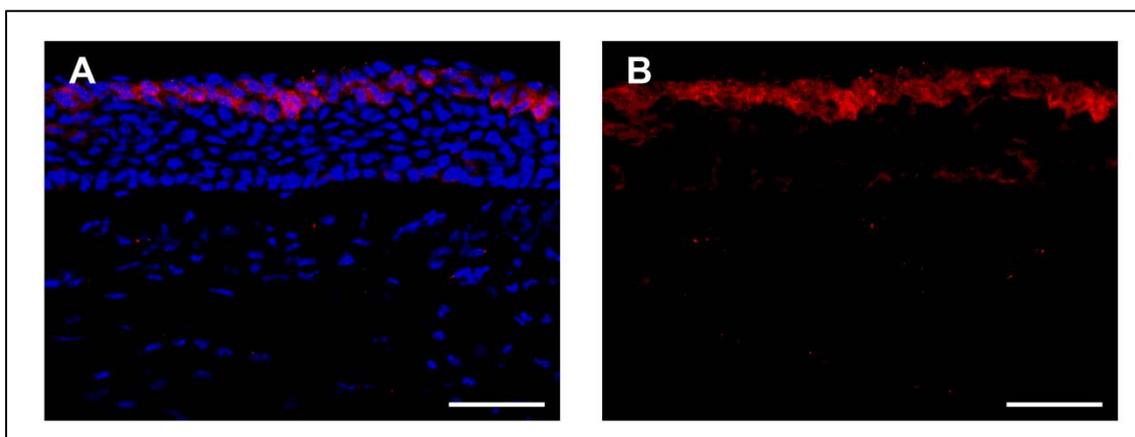
Una vez más, en el caso de experimentos *5M* el tratamiento con CMEh no permite observar grandes diferencias entre córneas tratadas y no tratadas, mientras que es la severidad de la enfermedad la que parece determinar el nivel de infiltración de células CD3<sup>+</sup>. Sin embargo, en los experimentos con *4M*, el tratamiento con CMEh parecía inhibir la infiltración de linfocitos (Figs. 34 y 35). En ambos casos, la infiltración de células CD3<sup>+</sup> se producía predominantemente en la mitad anterior del estroma, más cercana al epitelio.

#### 4.1.3.3 Queratinización del epitelio corneal

##### 4.1.3.3.1 Pax6

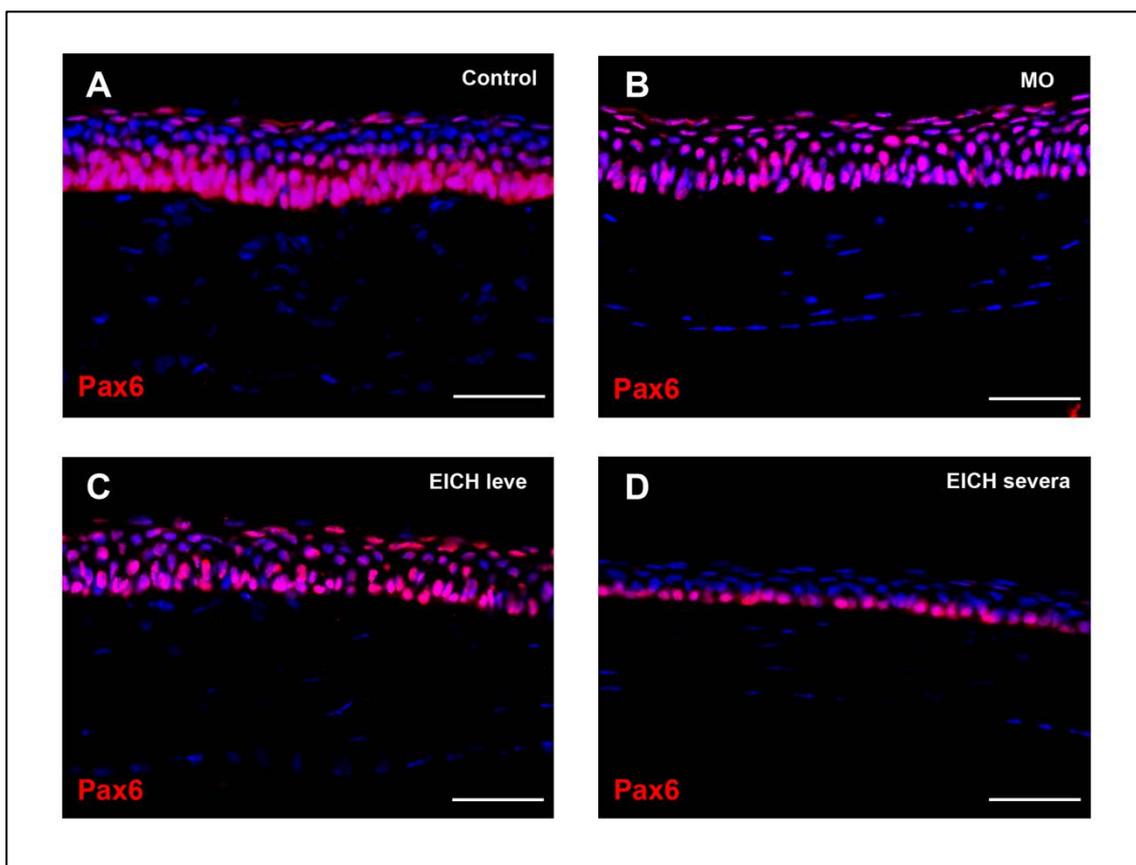
Dado que en algunos animales con EICH avanzada y severa observamos un aumento en el grosor del epitelio y también en el número de estratos, nos preguntamos si esto podría deberse a un proceso de metaplasia escamosa. Para poder determinar si este proceso se estaba produciendo, decidimos analizar la presencia de Pax6, cuya pérdida en el epitelio corneal está relacionada con los primeros estadios de este proceso (McNamara et al., 2014). De esta manera, podríamos saber si en animales que no mostraban dicho aumento en el grosor del epitelio (incluso lo contrario) se estaban dando los primeros pasos del proceso.

#### 4.1.3.3.1.1 Animales de experimentos 5M

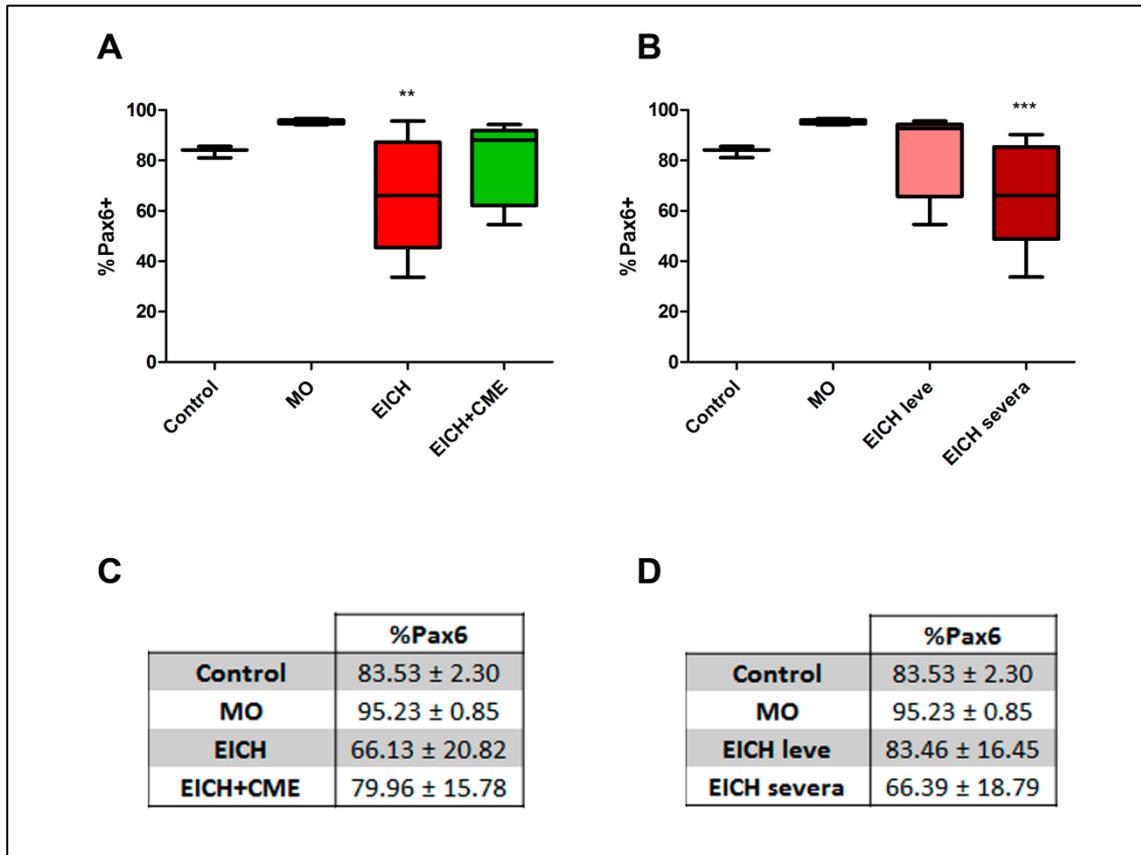


**Figura 36.** Microfotografías representativas del marcaje para Pax6 (rojo) en secciones de córnea con epitelio engrosado. Núcleos celulares marcados con DAPI. El marcaje desaparece de los estratos basales y en los estratos apicales aparece en el citoplasma de las células. Barras de escala: 50 µm.

Cuando analizamos la expresión de Pax6 en córneas con el epitelio engrosado, observamos que ninguna célula en las áreas engrosadas presentaba en su núcleo marcaje



**Figura 37.** Variación del marcaje para Pax6 (rojo) en el epitelio corneal de animales 5M a 28 dpt (C-D) frente a animales *Control* (A) y *MO* (B). Núcleos marcados con DAPI. A mayor severidad de la enfermedad, mayor pérdida de Pax6; esta pérdida es menor en casos de EICH leve (C) que en EICH severa (D). Barras de escala: 50 µm.

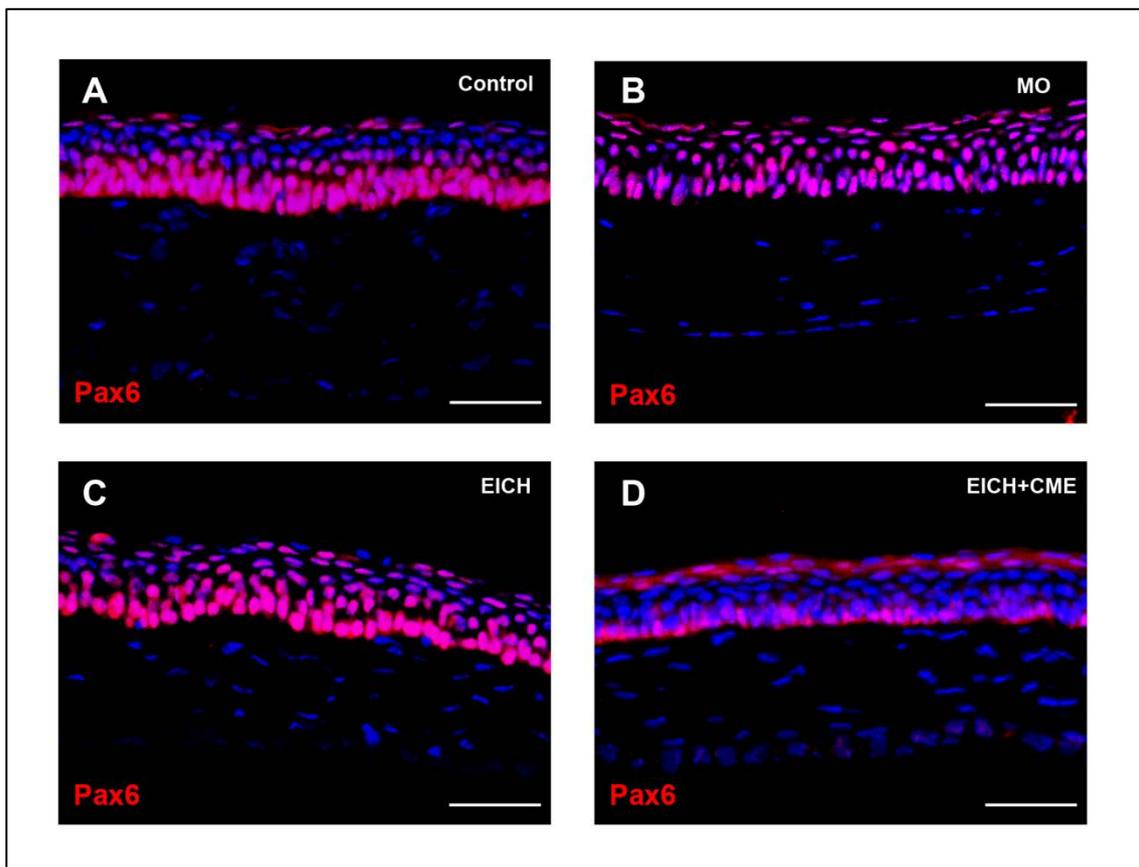


**Figura 38.** Diferencias en el porcentaje de células Pax6<sup>+</sup> en el epitelio corneal de animales *5M* frente al de animales *MO* y *Control*. Resultados en animales EICH según el tratamiento (A) o según la severidad de la EICH (B). (C-D) Tablas con los datos numéricos del grosor de epitelio (media ± desviación estándar). \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001.

positivo para Pax6 (Fig. 36). En las células de estratos apicales se podía observar la presencia de Pax6 en el citoplasma, pero no en el núcleo. Asimismo, las córneas de los demás animales con EICH parecían presentar una disminución de marcaje para Pax6, cuando se comparaban con las córneas de animales del grupo *MO* (Fig. 37). Comparamos el porcentaje de células del epitelio corneal que expresaban Pax6 en ojos de animales *Control*, en ojos de animales *MO*, en ojos tratados con CMEh y en ojos de animales con EICH sin tratar. El porcentaje de células epiteliales Pax6<sup>+</sup> era algo mayor en córneas *MO* (95,2 ± 0,8 %) que en las del grupo *Control* (83,5 ± 0,3 %) (Fig. 37A-B). No encontramos, sin embargo, diferencias estadísticamente significativas entre ambos, como tampoco con el grupo *EICH+CME* (80 ± 15,8 %) (Figs. 38A y C). En cambio, sí hallamos diferencias entre el grupo *MO* y el grupo *EICH* (66,1 ± 20,8 %; P < 0,01). En todo caso, había una gran variabilidad entre los individuos de los grupos con EICH (Figs. 38A y C).

Al introducir la variable de la severidad de la enfermedad, observamos que seguía existiendo gran variabilidad en el porcentaje de Pax6, incluso dentro de los grupos de EICH leve y EICH severa (Fig. 38B y D). No había diferencias entre los grupos *Control* o *MO* y el grupo EICH leve ( $83,46 \pm 16,4 \%$ ), pero sí encontramos diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,001$ ) entre el grupo *MO* y el grupo con EICH severa ( $66,4 \pm 18,8 \%$ ) (Fig. 38B y D).

#### 4.1.3.3.1.2 Animales de experimentos 4M

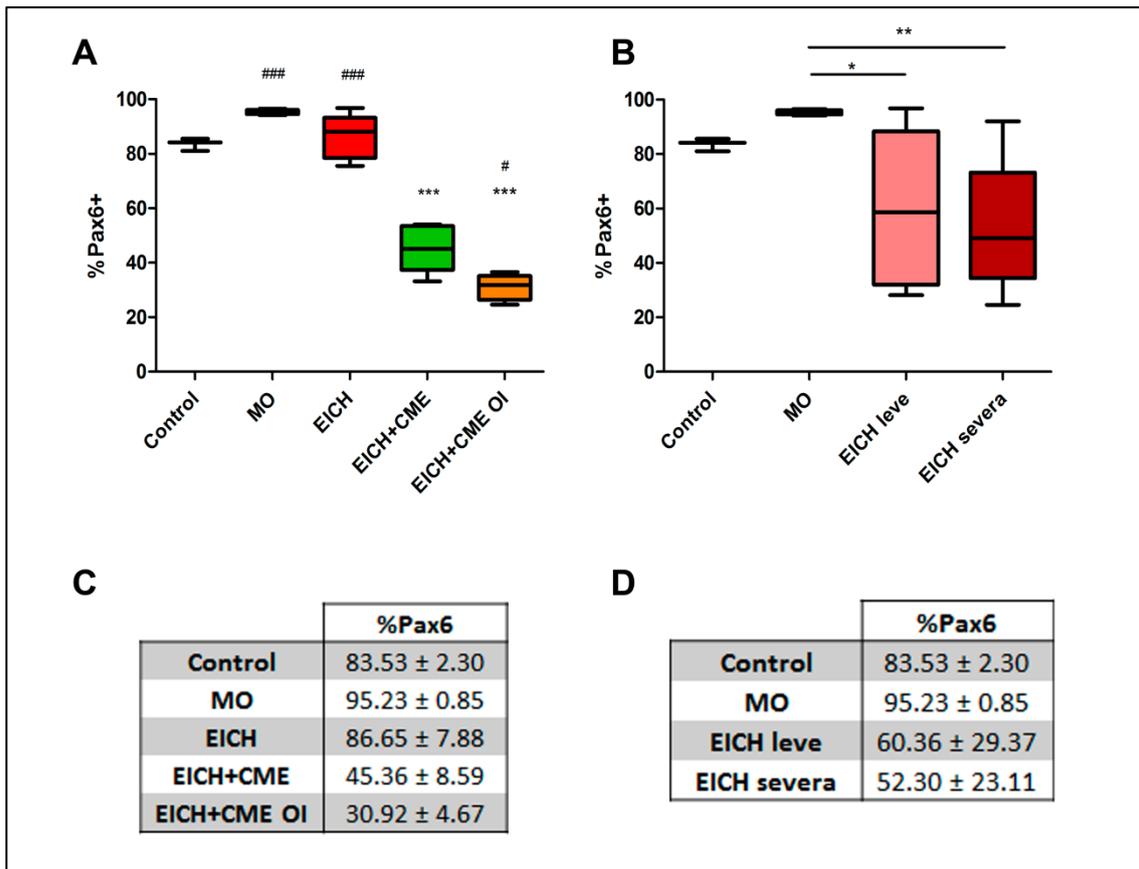


**Figura 39.** Marcaje para Pax6 (rojo) en el epitelio de córneas de animales 4M (C-D) a 28 dpt frente a animales *Control* (A) y *MO* (B). Núcleos marcados con DAPI. El principal factor que determina la presencia de Pax6 es el tratamiento con CMEh; el porcentaje de células Pax6<sup>+</sup> es más similar al grupo *Control* en córneas *EICH* (C) que en córneas *EICH+CME* (D). Barras de escala: 50  $\mu$ m.

El porcentaje de células Pax6<sup>+</sup> era en el grupo *EICH* ( $86,7 \pm 7,9 \%$ ) muy similar al grupo *Control* (Fig. 39A y C). En cambio, tanto las córneas del grupo *EICH+CME* ( $45,4 \pm 8,6 \%$ ) como las del grupo *EICH+CME OI* ( $30,9 \pm 4,7 \%$ ) mostraban un porcentaje de células epiteliales Pax6<sup>+</sup> significativamente menor que el grupo *Control* ( $P < 0,001$  en ambos casos) (Fig. 40A y C). Además, encontramos diferencias

significativas en el porcentaje de células Pax6<sup>+</sup> entre las córneas del grupo *EICH+CME* y las de los grupos *MO* y *EICH* ( $P < 0,001$  en ambos casos) y también con las del grupo *EICH+CME OI* ( $P < 0,05$ ) (Fig. 40A y C).

Al comparar el porcentaje de células Pax6<sup>+</sup> teniendo en cuenta la severidad de la enfermedad, observamos una gran variabilidad dentro de ambos grupos, *EICH leve* ( $60,4 \pm 29,4 \%$ ) y *EICH severa* ( $52,3 \pm 23,1 \%$ ). Aun así, había diferencias estadísticamente significativas entre el grupo *MO* con ambos, tanto el grupo *EICH leve* ( $P < 0,05$ ) como el grupo *EICH severa* ( $P < 0,01$ ) (Fig. 40B y D).



**Figura 40.** Diferencias en el porcentaje de células Pax6<sup>+</sup> en el epitelio corneal de animales *4M* frente a córneas de animales *MO* y *Control*. Resultados al clasificar los animales *EICH* según el tratamiento (**A**) o según la severidad de la *EICH* (**B**). (**C-D**) Tablas con los datos numéricos del grosor de epitelio (media ± desviación estándar). \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ . # $P < 0,05$  y ### $P < 0,001$  con respecto al grupo *EICH+CME*.

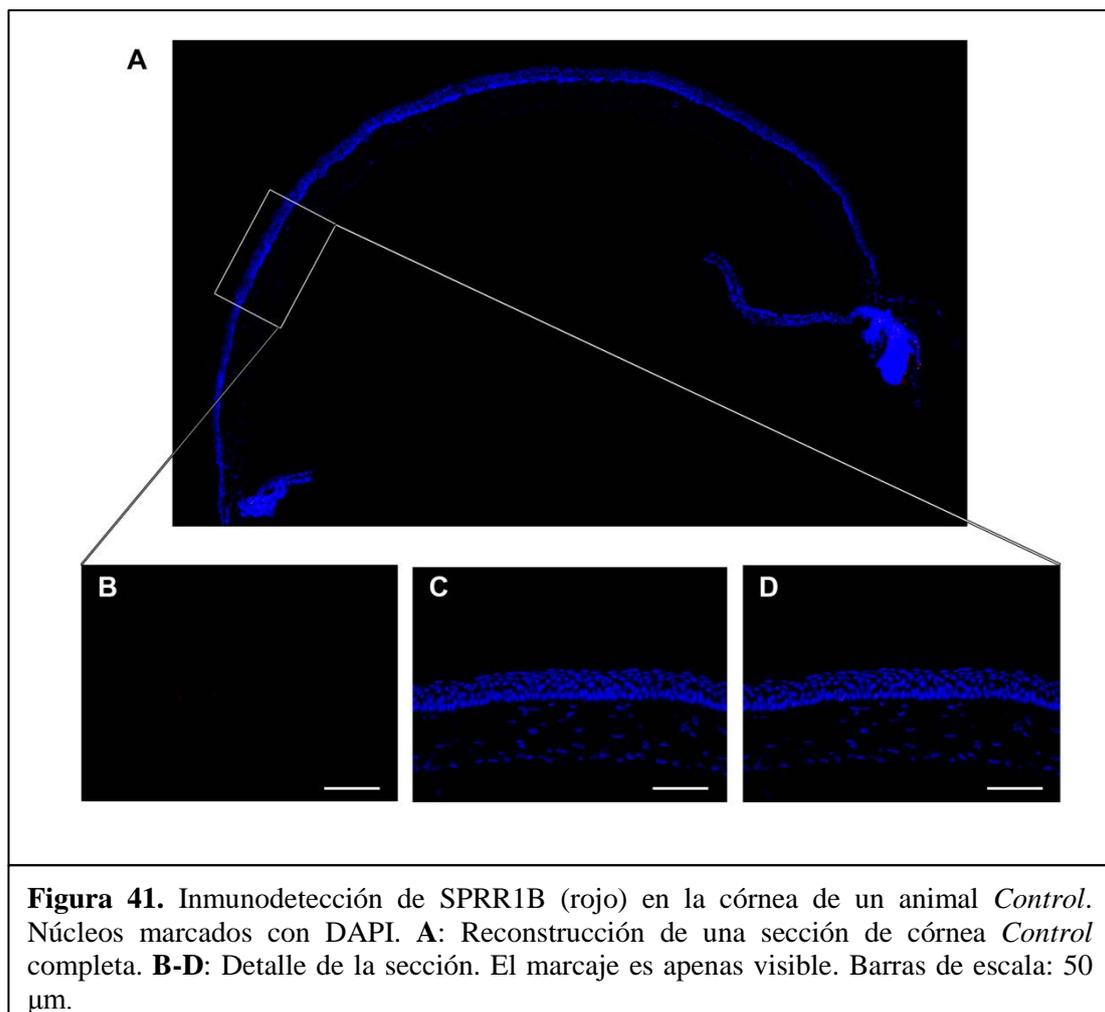
#### 4.1.3.3.1.3 Comparación entre experimentos *5M* y *4M*

El comportamiento de Pax6 era muy distinto en función de la dosis de esplenocitos recibida en el trasplante. En los experimentos *5M* el porcentaje de células Pax6<sup>+</sup> descendía en todos los animales con *EICH* y lo hacía más en aquellos con una *EICH*

severa, no habiendo un gran cambio con el tratamiento con CMEh (Fig. 38). En cambio, en los experimentos *4M*, se observaba un descenso bastante pronunciado en el porcentaje de células Pax6<sup>+</sup> en ambos ojos de animales tratados, mientras que los animales *EICH* presentaban en su córnea un marcaje para Pax6 similar al grupo *Control* (Fig. 40).

En los experimentos *5M*, la variabilidad era grande, ya fueran agrupados los resultados en función del tratamiento o de la severidad de la enfermedad. Sin embargo, en los experimentos *4M*, la variable “tratamiento” era con claridad la más adecuada para explicar los resultados.

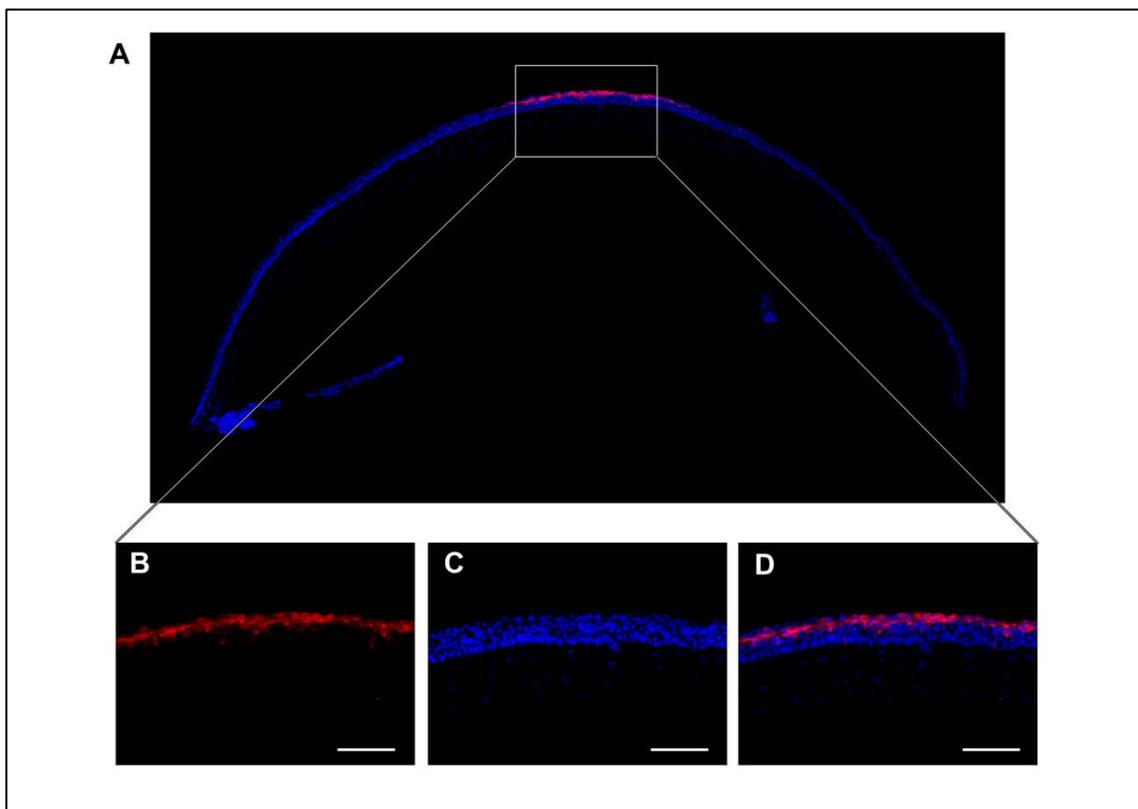
La pérdida de Pax6 se producía en todos los casos en las capas apicales del epitelio (Fig 37 y 39), mientras que las células basales mantenían el marcaje para Pax6. Ningún animal de experimentos *4M* presentaba una pérdida total de células epiteliales Pax6<sup>+</sup>, algo que sí ocurría en algunos animales *5M*, siendo éstos siempre animales en los que había un engrosamiento del epitelio con aumento de capas celulares.



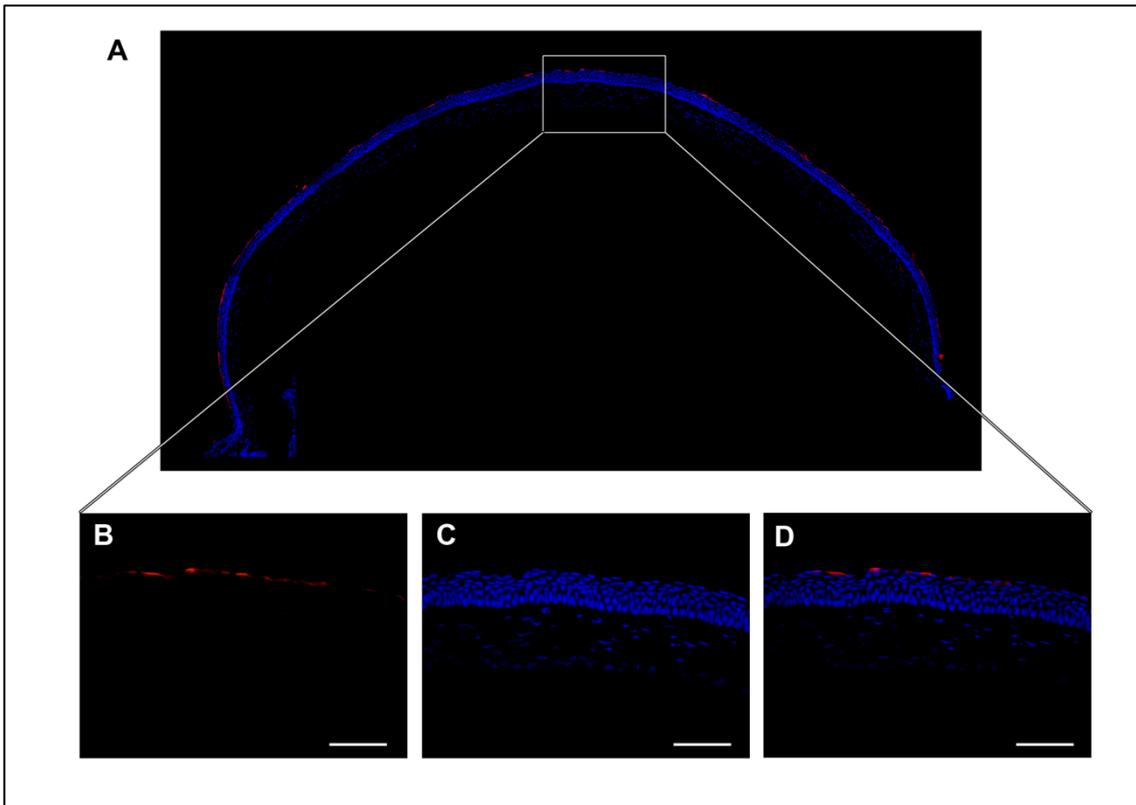
#### 4.1.3.3.2 *SPRR1B*

La importante disminución de Pax6 en el epitelio corneal de animales tratados con CMEh de experimentos *4M* podía estar indicando que el tratamiento inducía la queratinización del epitelio, según lo indicado en estudios anteriores sobre metaplasia escamosa (McNamara et al., 2014). Por ello, era importante confirmar si esto se estaba produciendo. Para ello, llevamos a cabo la inmunodetección de una de las primeras proteínas en aparecer en el proceso de metaplasia escamosa: *SPRR1B* o cornifina B. Para buscar diferencias en la presencia de *SPRR1B*, analizamos el porcentaje del área del epitelio corneal que presentaba marcaje positivo.

En los animales *Control* se podía observar un tenue marcaje en la zona basal del epitelio (Fig. 41). De manera aislada, aparecían zonas con marcaje en la capa apical. El área marcada positivamente para *SPRR1B* era en este grupo el 0,09 (0,09-0,09) % (mediana y rango intercuartílico) (Fig. 44). Un marcaje similar se podía encontrar en el grupo *MO*, si bien se apreciaba una tendencia a disminuir, siendo el área del epitelio marcada el 0,07 (0,03-0,08) %.



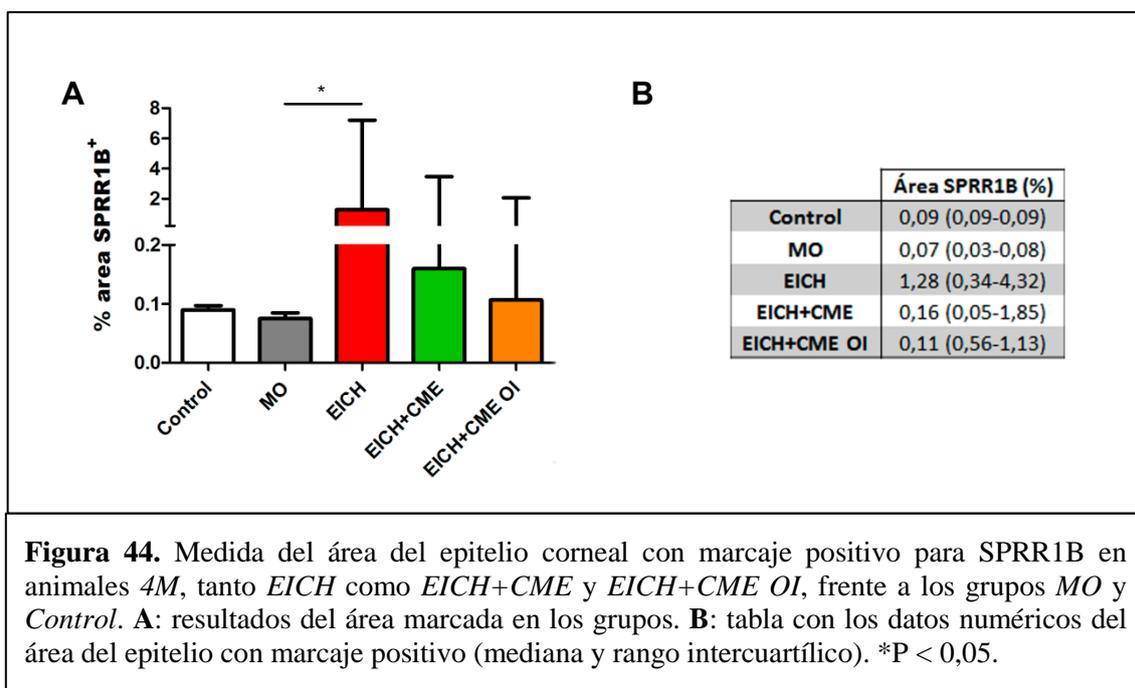
**Figura 42.** Inmunodetección de *SPRR1B* (rojo) en la córnea de un animal *EICH* a 28 dpt. Núcleos marcados con DAPI. **A:** Reconstrucción de una sección de córnea *EICH* completa. **B-D:** Detalle de la sección. El marcaje puede verse claramente (en rojo) en zonas determinadas del epitelio y en los estratos apicales. Barras de escala: 50  $\mu$ m.



**Figura 43.** Inmunodetección de SPRR1B (rojo) en la córnea de un animal *EICH+CME* a 28 dpt. Núcleos marcados con DAPI. **A:** Reconstrucción de una sección de córnea completa *EICH+CME*. **B-D:** Detalle de la sección. La mayoría de las córneas apenas muestra marcaje positivo. Cuando se observa un marcaje mayor, como es en esta imagen, el marcaje se aprecia como una fina capa superficial en el epitelio. Barras de escala: 50  $\mu$ m.

En los animales con EICH encontramos una gran variabilidad entre individuos: en algunos animales el marcaje era prácticamente nulo, mientras que en otros se veía un aumento de SPRR1B en la superficie del epitelio, desapareciendo en la zona basal (Fig. 42B). En el grupo *EICH* había un aumento del porcentaje de área marcada, que se observaba mayoritariamente en la zona central de la córnea (Fig. 42). La mediana del porcentaje del área total del epitelio marcada era un 1,28 (0,34-4,32) %, demostrando una gran variabilidad (Fig. 44). A pesar de esta variabilidad, el mínimo en este grupo *EICH* era un 0,19 %, un valor superior a lo medido en cualquier córnea *Control* o *MO* y llegando a encontrarse un máximo del 7,21 % (Fig. 44). En las córneas de los grupos *EICH+CME* y *EICH+CME OI*, el marcaje para SPRR1B abarcaba alrededor del 0,1 % del área epitelial, aunque encontramos en cada grupo una córnea con un mayor incremento en el área marcada (Fig. 43). Estas córneas, que pertenecían a animales distintos, presentaban un 3,47 % de área marcada en el caso de la córnea *EICH+CME* y un 2,06 % en la córnea *EICH+CME OI*. A diferencia de lo observado en córneas *EICH*,

el marcaje positivo en estos dos animales dibujaba una fina línea en toda la superficie corneal (Fig. 43B). La mediana resultante fue un 0,16 (0,05-1,85) % en las córneas *EICH+CME* y un 0,11 (0,06-1,13) % en las córneas *EICH+CME OI*.



Dada la gran variabilidad observada, el análisis estadístico sólo mostró diferencias significativas entre los grupos *MO* y *EICH* ( $P < 0,05$ ) (Fig. 44).

#### 4.1.4 Análisis de expresión génica

Teniendo en cuenta que una característica del ojo seco es la producción de factores inflamatorios en la superficie ocular y ya que éstos se relacionan directamente con daños en la córnea, quisimos estudiar la producción de dos de los más importantes, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , en todas las situaciones de enfermedad y tratamiento. Puesto que a día 21 parecían darse ciertos indicios de mejoría en los animales tratados, quisimos observar las posibles variaciones de dichos factores a este día.

Otro marcador de daño corneal usado frecuentemente en ojo seco es MMP9, que se encuentra elevado en la lágrima de pacientes con ojo seco y que está relacionado con la pérdida de uniones intercelulares (Huet et al., 2011; Mauris et al., 2015). Por ello, también analizamos su expresión.

Además, valoramos las modificaciones en la expresión de *Pax6*, dada su importancia, ya comentada, en el mantenimiento del fenotipo de epitelio corneal y el posible incremento en la expresión de *SPRR1B*.

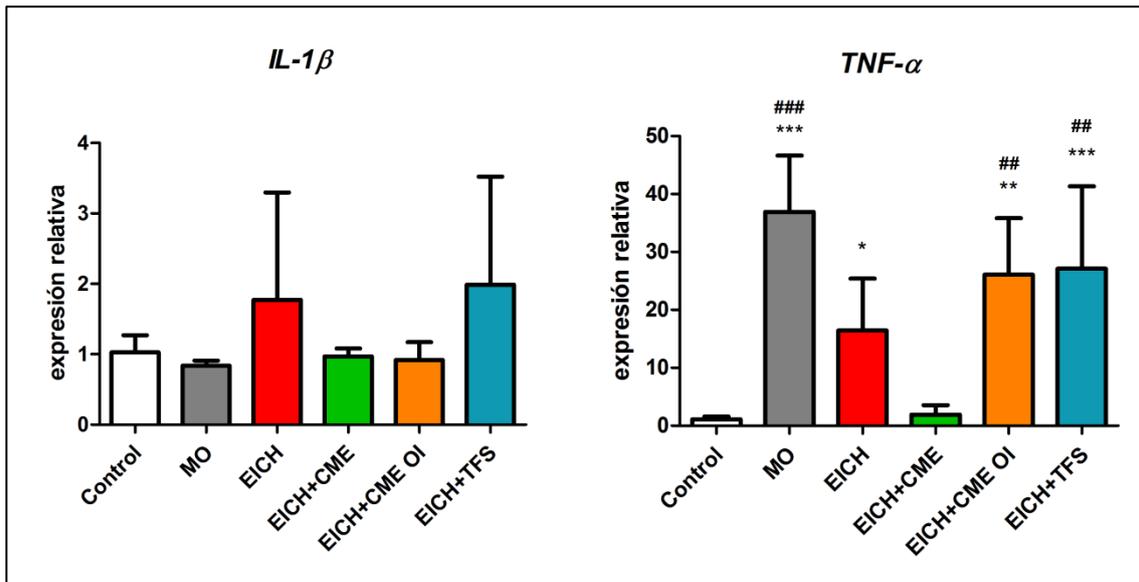
Para ello, se analizaron entre 4 y 5 córneas por condición a 21 dpt. Los grupos fueron los siguientes: *Control*, *MO*, *EICH*, *EICH+CME*, *EICH+CME OI* y *EICH+TFS* (Tabla 11). Para estos experimentos, todos los ratones en los que se generó la EICH fueron trasplantados con  $4 \times 10^6$  esplenocitos.

<i>Grupo</i>	<b>Irradiación</b>	<b>5x10<sup>6</sup> MO</b>	<b>4x10<sup>6</sup> bazo</b>	<b>Animal tratado con CMEh</b>	<b>Ojo tratado con CMEh</b>	<b>Ojo tratado con TFS</b>
<i>Control</i>	NO	NO	NO	NO	NO	NO
<i>MO</i>	SI	SI	NO	NO	NO	NO
<i>EICH</i>	SI	SI	SI	NO	NO	NO
<i>EICH+CME</i>	SI	SI	SI	SI	SI	NO
<i>EICH+CME OI</i>	SI	SI	SI	SI	NO	NO
<i>EICH+TFS</i>	SI	SI	SI	NO	NO	SI

**Tabla 11.** Grupos animales utilizados para la valoración de la película lagrimal.

#### 4.1.4.1 *Expresión de factores inflamatorios*

La expresión de IL-1 $\beta$  no mostró cambios significativos entre las distintas condiciones analizadas. Sólo una córnea del grupo *EICH* y dos del grupo *EICH+TFS* mostraron valores entre 2 y 5 veces superiores al grupo control. Fue frecuente ver una reducción de la expresión de este factor en muchos de los animales trasplantados, sobre todo en el grupo *MO*, que de manera bastante uniforme mostraba un nivel de cambio de -1,2 (Fig. 45).

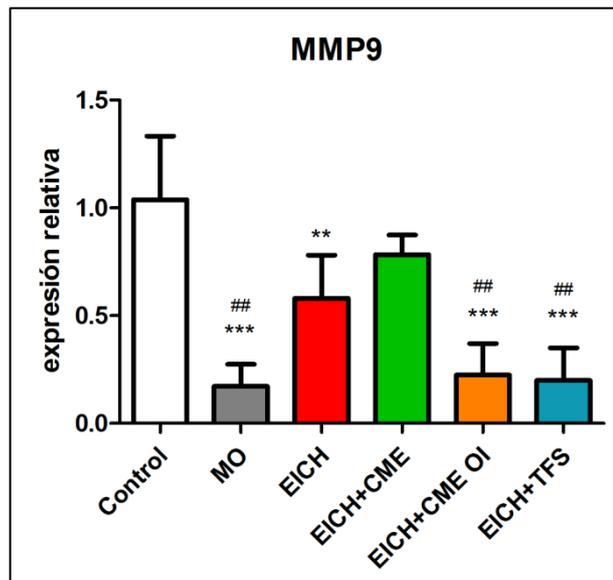


**Figura 45.** Diagramas de la expresión génica de las citoquinas *IL-1β* y *TNF-α* en córneas de animales *4M EICH*, *EICH+CME*, *EICH+CME OI* y *EICH+TFS*, frente a los grupos *MO* y *Control* a 21 dpt. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ . ## $P < 0,01$  y ### $P < 0,001$  con respecto al grupo *EICH+CME*.

En el caso de *TNF-α*, se observó un aumento estadísticamente significativo en su expresión en las córneas de los grupos de animales con *EICH* que no recibieron tratamiento con *CMEh* (Fig. 45). Los grupos *EICH*, *EICH+CME OI*, y *EICH+TFS* mostraron un aumento de 16,4 ( $P < 0,05$ ), 26,1 ( $P < 0,01$ ) y 27,1 ( $P < 0,001$ ) veces el nivel del grupo *Control*, respectivamente. Sin embargo, en el grupo *EICH+CME*, no se encontraron diferencias con el grupo *Control*. Al mismo tiempo, su expresión en este grupo *EICH+CME* (un cambio de 1,9 veces con respecto al control) fue significativamente menor que en los ojos *EICH+CME OI* y también que en los ojos *EICH+TFS* (en ambos casos  $P < 0,01$ ). Algo llamativo resultó el caso de las córneas del grupo *MO*, que mostraron niveles significativamente altos de *TNF-α* (con un cambio de expresión de 36,9) con respecto a los grupos *Control* y *EICH+CME* (en ambos casos  $P < 0,001$ ) (Fig. 45).

El análisis de expresión de *MMP9*, estudiada por su relación con la aparición de ojo seco, produjo también unos resultados algo inesperados (Fig. 46). Al contrario de lo esperado, su expresión fue hasta 5 veces menor en las córneas de animales enfermos sin tratar con *CMEh* que en el grupo *Control*, salvo en una córnea del grupo *EICH* que presentaba una úlcera corneal y en la que su expresión fue 2 veces la del grupo *Control*. Esta reducción fue de -1,7 en el grupo *EICH* ( $P < 0,01$ ), -4,5 en el grupo *EICH+CME OI* ( $P < 0,001$ ) y -5,0 en el grupo *EICH+TFS* ( $P < 0,001$ ). En cambio, en el grupo

*EICH+CME* la expresión recuperó valores similares al grupo *Control* (-1,3 veces los niveles control), sin diferencias significativas con éste. Al mismo tiempo, las córneas del grupo *EICH+CME* tenían niveles de expresión de MMP9 significativamente mayores que las de ojos no tratados de los mismos animales (*EICH+CME OI*) y que las de aquellos tratados con TFS (en ambos casos  $P < 0,01$ ). El grupo *MO* mostró niveles de expresión de MMP9 similares, de nuevo, a los grupos enfermos sin tratamiento (cambio de expresión de -5,8 con



**Figura 46.** Diagrama de la expresión génica de *MMP9* en córneas de animales *4M EICH*, *EICH+CME*, *EICH+CME OI* y *EICH+TFS*, frente a los grupos *MO* y *Control* a 21 dpt. \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ . ### $P < 0,01$  con respecto al grupo *EICH+CME*.

respecto al control), siendo significativamente menores que en el grupo *Control* ( $P < 0,001$ ) y que en los ojos tratados con CMEh ( $P < 0,01$ ) (Fig. 46).

#### 4.1.4.2 Queratinización del epitelio corneal

##### 4.1.4.2.1 Pax6

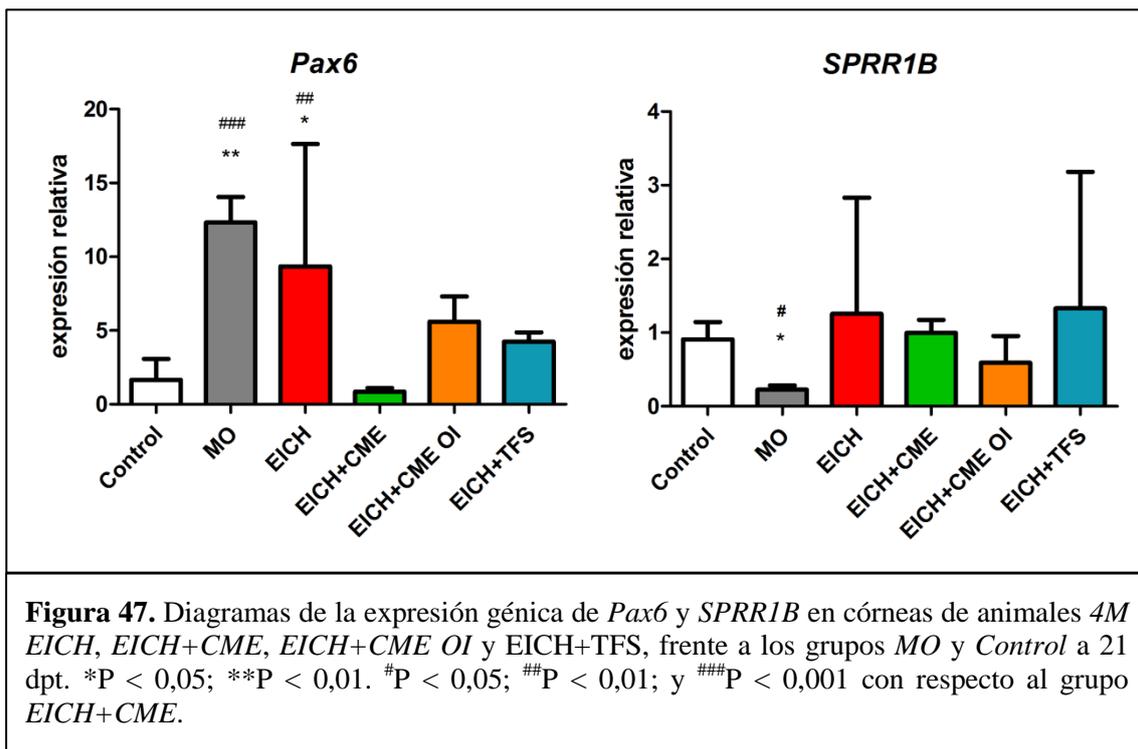
Dadas las variaciones observadas en la presencia de Pax6 en el tejido, quisimos evaluar los cambios a nivel de expresión génica que se podían estar dando a día 21. Encontramos que la expresión de *Pax6* se veía incrementada en todas las córneas de animales trasplantados con respecto al grupo *Control*, salvo en aquellas de ojos tratados con CMEh (de nuevo, incluso el grupo *MO* mostraba un cambio de expresión similar a los grupos enfermos) (Fig. 47). El aumento en el grupo *EICH* fue de 9,3 con respecto al grupo *Control* ( $P < 0,05$ ), mientras que el incremento en los grupos *EICH+CME OI* y *EICH+TFS* fue de 5,6 y 4,3 respectivamente, aunque sin diferencias significativas. Sí se dio un cambio significativo con respecto al grupo *Control* en el grupo *MO* ( $P < 0,01$ ), con una expresión 12,3 veces mayor. Las córneas de animales *EICH+CME* exhibían un nivel de expresión de *Pax6* incluso menor que el grupo *Control* (un cambio de -1,2

respecto al control), habiendo diferencias significativas tanto con el grupo *EICH* ( $P < 0,01$ ) como con el grupo *MO* ( $P < 0,001$ ) (Fig. 47).

#### 4.1.4.2.2 *SPRR1B*

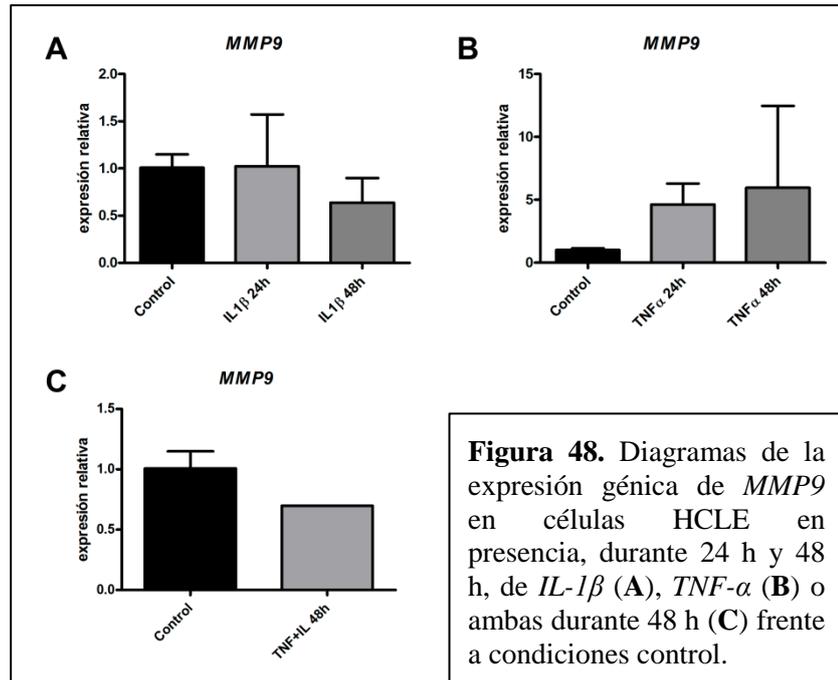
Encontramos una reducción en la expresión de *SPRR1B* en todos los grupos, salvo en las córneas de ojos *EICH+CME*, que mostraron niveles similares al grupo *Control*. Esta disminución de expresión de *SPRR1B* parecía asociada al aumento de expresión de *Pax6*, y fue estadísticamente significativa en el grupo *MO* ( $P < 0,05$ ), con un cambio de expresión de -4,4, mostrando también diferencias significativas con el grupo *EICH+CME* ( $P < 0,05$ ) (Fig. 47).

En los grupos *EICH* y *EICH+TFS* encontramos sendas córneas con una expresión de *SPRR1B* aumentada (hasta 5,4 y 4,6 veces con respecto al grupo *Control*). Este aumento se produjo en aquellos animales que mostraron también un aumento en la expresión de *IL-1 $\beta$* .

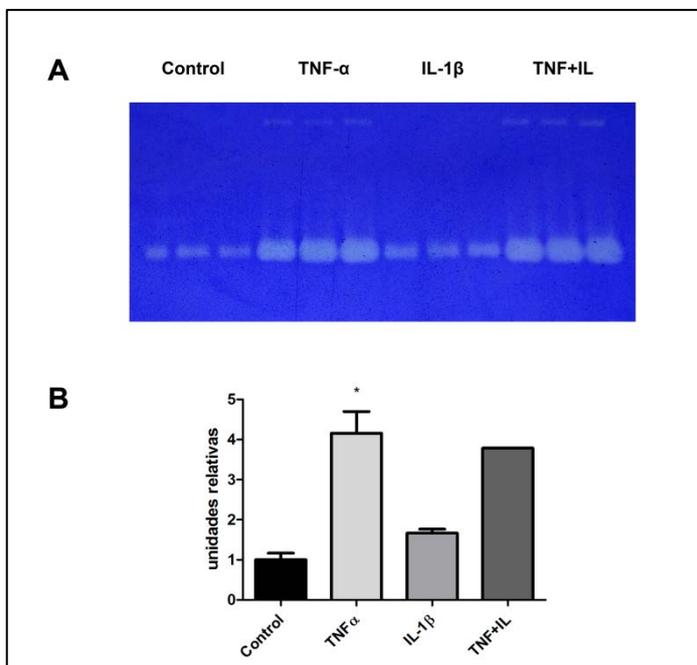


## 4.2 Efecto de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ en células HCLE

Puesto que los resultados de expresión de *MMP9* y *Pax6* no se correspondían con los esperados ni con lo descrito previamente en la bibliografía, quisimos comprobar si alguna de las citoquinas analizadas es capaz



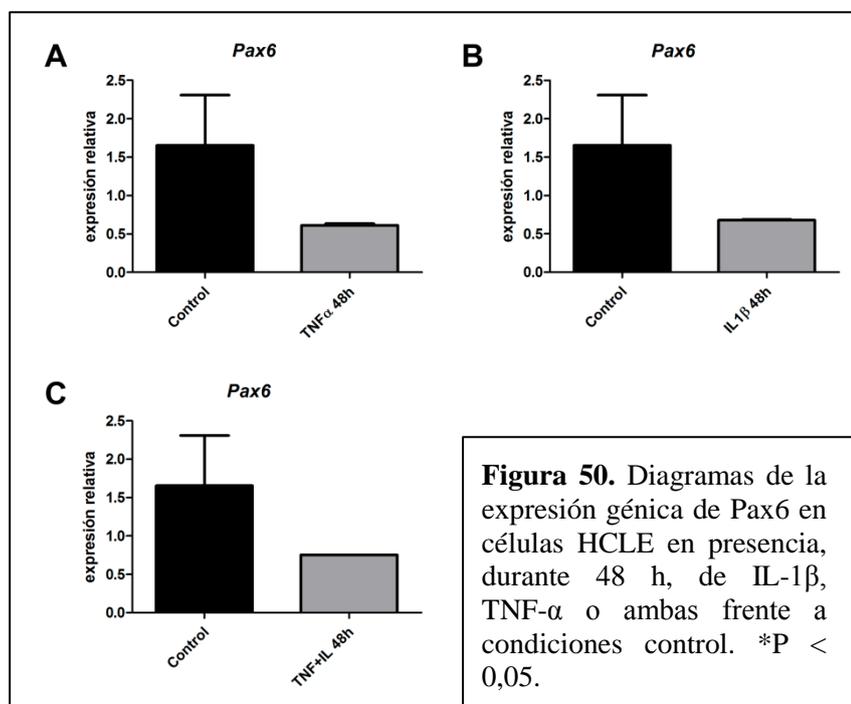
de provocar directamente los cambios de expresión observados. La correlación entre la expresión de estos genes y la de *TNF- $\alpha$*  daba indicios de una posible relación causa-efecto.



Utilizamos un cultivo de células córneo-limbares epiteliales humanas (HCLE). Estas células fueron cultivadas en condiciones adecuadas para alcanzar una estructura estratificada, tras lo cual añadimos al medio de cultivo *TNF- $\alpha$*  o *IL-1 $\beta$* , manteniendo un grupo de células sin tratamiento. Analizamos la expresión génica de *MMP9* por qPCR y también la presencia de *MMP9* en el medio extracelular por zimografía.

En los dos primeros experimentos, observamos que a las 24 h apenas había cambios en la expresión génica de *MMP9* y en sus niveles en el medio, por lo que decidimos prolongar en adelante el experimento hasta las 48 horas (Fig. 48).

La expresión génica de *MMP9* aumentó en las células HCLE tras 48 h con  $\text{TNF-}\alpha$  (cambio de expresión de 5,9) (Fig. 48B), como también lo hizo la cantidad de *MMP9* activa en el medio extracelular (4,2 veces la observada



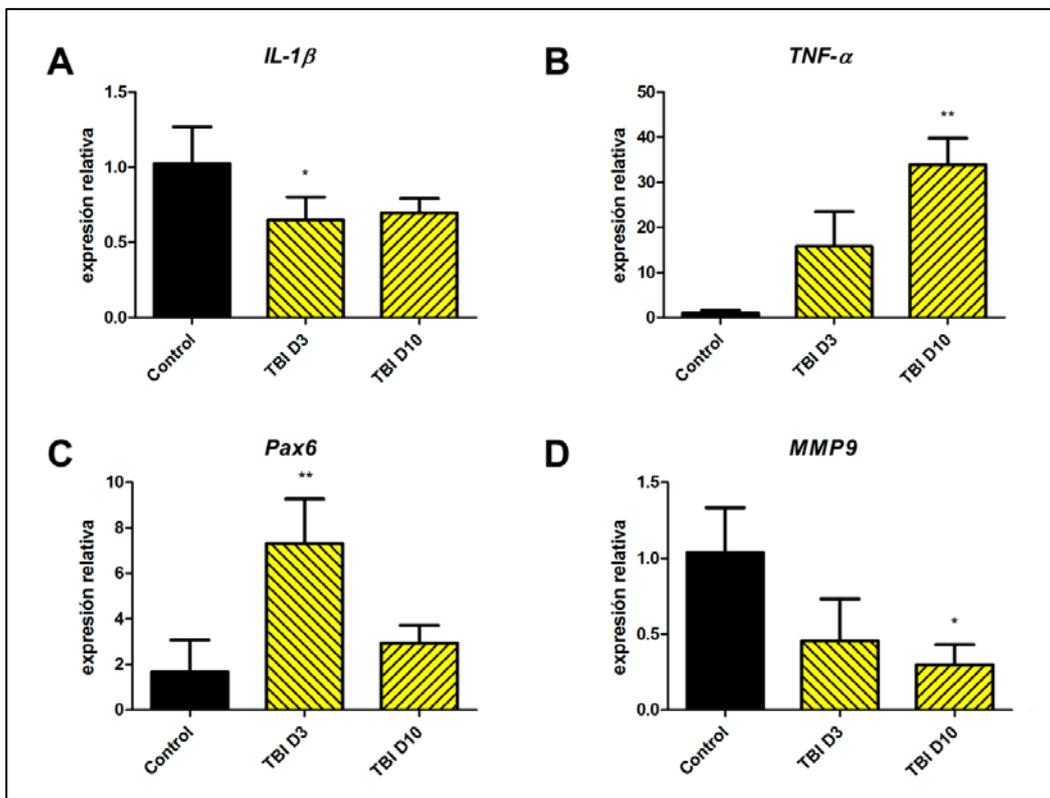
en el grupo sin tratamiento) (Fig. 49). Sin embargo, el cultivo con IL-1 $\beta$  hizo disminuir la expresión génica de *MMP9* (cambio de expresión de -1,6) (Fig. 48A), aunque la cantidad de *MMP9* en el medio se incrementó ligeramente (1,7 veces la observada en el grupo sin tratamiento) (Fig. 49). Finalmente, un experimento preliminar en el que cultivamos las células HCLE con  $\text{TNF-}\alpha$  e IL-1 $\beta$  al mismo tiempo durante 48 horas, mostró una disminución de la expresión génica de *MMP9*, al tiempo que la zimografía mostraba unos niveles de proteína similares a los observados con  $\text{TNF-}\alpha$  solo. Esto apuntaba a una regulación más compleja de *MMP9* y decidimos no seguir en esta dirección porque ya escapaba a los objetivos de esta Tesis.

Analizamos también la expresión de *Pax6* en las muestras de células cultivadas durante 48 horas con  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-1 $\beta$  o ambas citoquinas. Encontramos que en todos los casos había una disminución del transcrito de *Pax6*, siendo esta de -1,6, -1,5 y -1,3 respectivamente (Fig. 50).

### 4.3 Expresión génica en córneas de animales irradiados

Los resultados observados en animales del grupo *MO* hacían pensar que la irradiación podía ser la causante del incremento de expresión de citoquinas. Además, los experimentos con células HCLE no explicaban las variaciones observadas en la expresión de *Pax6*. Por ello, llevamos a cabo un experimento con animales *TBI* y analizamos la expresión de estos genes en los días 3 y 10 tras la irradiación.

La expresión de *IL-1 $\beta$*  fue menor que en el grupo *Control* tanto a día 3 como a día 10 (cambio de expresión de -1,5 y -1,4, respectivamente), siendo estadísticamente significativa a día 3 ( $P < 0,05$ ) (Fig. 51A). La expresión de *TNF- $\alpha$* , por su parte, se vio aumentada a día 3 (cambio de expresión de 15,8) y aún más a los 10 días posirradiación (cambio de expresión de 33,9;  $P < 0,01$ ) (Fig. 51B). *MMP9* redujo su expresión a menos de la mitad a día 3 (-2,2) y a menos de un tercio a día 10 (-3,35), con diferencias significativas respecto al *Control* ( $P < 0,05$ ) (Fig. 51C). Finalmente, *Pax6* aumentó significativamente ( $P < 0,01$ ) a día 3, hasta mostrar un nivel de expresión 7,3 veces superior al grupo *Control*, disminuyendo a día 10 hasta 2,9 veces los niveles del grupo *Control* (Fig. 51D).



**Figura 51.** Diagramas de los cambios en expresión génica de *IL-1 $\beta$*  (A), *TNF- $\alpha$*  (B), *Pax6* (C) y *MMP9* (D) en la córnea de ratones irradiados tras 3 y 7 días posirradiación frente a córneas de animales *Control*. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

## 4.4 Migración de CMEh

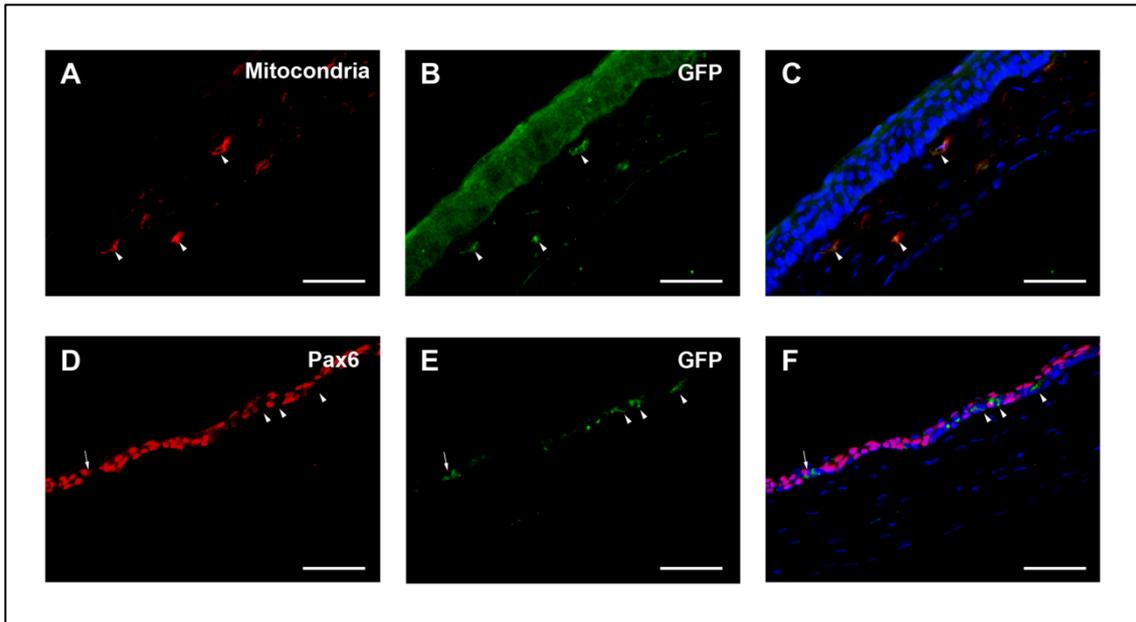
### 4.4.1 Análisis mediante inmunofluorescencia

Para poder seguir el destino de las CMEh inyectadas, éstas fueron transducidas previamente con un vector lentiviral para expresar GFP (Fig. 52). Analizamos la presencia de CMEh en córneas a distintos tiempos: 20, 30 y 40 días postrasplante (dpt). Sobre secciones de estas córneas se realizó una inmunofluorescencia con anticuerpos para GFP y mitocondria humana, de manera que aquellas células que estuvieran marcadas con ambos anticuerpos serían consideradas como CMEh, de manera similar a como se hizo en trabajos anteriores (Lorenzo, 2012; Sanchez-Abarca et al., 2015).

En general, no encontramos células marcadas en las córneas analizadas a ninguno de los tiempos y tampoco en el limbo esclerocorneal. Solamente tras llevar a cabo una recuperación antigénica previa pudimos observar algunas células con marcaje positivo en las córneas de 2 animales. Ambos animales provenían de experimentos 5M, y diferían en el momento en que fueron sacrificados: uno fue sacrificado a los 20 días, mientras que el otro lo fue a los 40 dpt.

El animal sacrificado a 20 dpt, presentaba en su estroma algunas células Mitocondria<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> (Fig. 52). El núcleo de estas células era ahusado, de forma similar a los keratocitos de alrededor.

Por su parte, las células Mitocondria<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> observadas en el animal sacrificado a 30 dpt se situaban en la zona basal del epitelio corneal y en la región periférica. Para comprobar si estas células habían llegado a diferenciarse al fenotipo de epitelio corneal, realizamos un triple marcaje incluyendo también la inmunodetección de Pax6 (Fig. 52D-F). Pax6 es un factor de transcripción que está presente en las células del epitelio corneal, incluso en el individuo adulto, donde determina el fenotipo corneal en detrimento del fenotipo epidérmico (Ouyang et al., 2014). La mayoría de las células Mitocondria<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> eran Pax6<sup>-</sup>, si bien se podía observar alguna célula Mitocondria<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>/Pax6<sup>+</sup>.

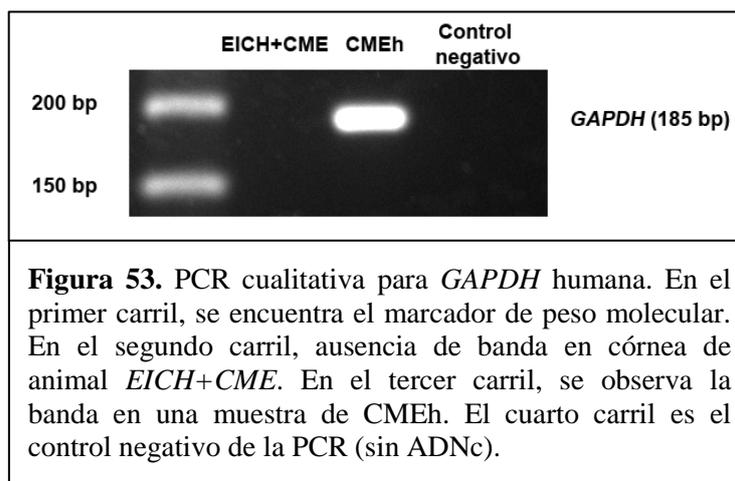


**Figura 52.** CMEh en la córnea de animales a 20 (A-C) y 40 días postrasplante (D-F). **A:** CMEh Mitocondria+ (rojo) en el estroma (puntas de flecha). **B:** CMEh GFP+ en verde (puntas de flecha). **C:** Doble marcaje Mitocondria/GFP (puntas de flecha), con los núcleos marcados con DAPI. **D:** Células epiteliales Pax6+ (puntas de flecha). **E:** CMEh GFP+ en el epitelio (verde). **F:** Doble marcaje Pax6/GFP. La mayoría de las células GFP+ no presentan Pax6 (cabezas de flecha en D, E y F). Célula con doble marcaje Pax6/GFP (flecha). Barras de escala: 50  $\mu$ m.

En el resto de animales analizados no se encontraron células positivas para ambos marcadores, por lo que no se pudo confirmar la presencia de CMEh.

#### 4.4.2 Análisis mediante PCR

Dado que el número de células CMEh detectadas en la córnea de los animales tratados fue muy reducido, llevamos a cabo un nuevo experimento para estudiar mediante PCR las córneas de animales inyectados. Para ello analizamos la presencia del ARNm del



gen *GAPDH* humano en las córneas de ratones inyectados con CMEh, sacrificados a 21 y 28 dpt (11 y 18 días tras la inyección). Como control positivo utilizamos una muestra obtenida a partir de CMEh en cultivo. Los resultados fueron negativos para todas las

córneas analizadas (Fig. 53); es decir, no detectamos amplificación de *GAPDH* en ninguna córnea, mientras que la banda correspondiente a la amplificación de este transcrito sí apareció en la muestra de CMEh.



# Discusión



En el presente trabajo, hemos aunado la investigación en dos campos que aún presentan numerosas incógnitas: por un lado, cuáles son los mecanismos fisiopatológicos de la EICH ocular; por otro, las potenciales aplicaciones de la terapia celular con CME.

Los modelos de EICH en animales han sido la principal fuente de conocimiento para dilucidar cómo se desarrolla esta enfermedad. Sin embargo, debemos tener cautela a la hora de extrapolar lo observado en dichos modelos, dadas las diferencias en la regulación del sistema inmune, especialmente en el caso de los ratones (Mestas y Hughes, 2004). Nosotros nos hemos centrado en la patología de la córnea aunque en el caso de la EICH ocular el daño parece iniciarse en estructuras anejas, como la conjuntiva o las glándulas lagrimales, pero esta parte ha sido estudiada en la tesis doctoral de Elisabet Martín García (Martín, 2017).

La EICH ocular en humanos se manifiesta principalmente causando ojo seco. Es por ello que avanzar en el conocimiento de los mecanismos de la EICH ocular tiene importancia también para dilucidar cómo se llega a una situación de ojo seco o cómo los procesos inflamatorios que tienen lugar en el ojo seco dañan las estructuras oculares. Hemos puesto de manifiesto los cambios en osmolaridad y volumen lagrimales que sufren los ratones de nuestro modelo de EICH. Las alteraciones en estos parámetros constituyen una prueba de que en este modelo se dan características que definen el ojo seco (Nelson et al., 2017). Además, tras el tratamiento con CMEh se muestran signos de mejoría en dichos parámetros.

En este contexto, la córnea es un elemento clave, ya que es la principal fuente de información sobre el estado de la lágrima, gracias a su componente nervioso. Esto la hace protagonista en la sensación de dolor y malestar que causa el ojo seco, ya que los daños en la córnea tienen una repercusión directa en la capacidad visual. Hemos observado en nuestros ratones la queratinización del epitelio corneal, algo característico de los casos más severos de ojo seco (Chen et al., 2009; Li et al., 2008). Las principales consecuencias de este proceso son problemas de visión y la pérdida de componente mucínico de la lágrima que lleva aparejada. De nuevo, el tratamiento con CMEh demuestra una mejora en este aspecto.

Los tratamientos disponibles para enfermos de EICH son limitados. El uso de fármacos antiinflamatorios y corticoides es la solución más común para detener el daño

causado por el sistema inmune, pero todo tratamiento sistémico que vaya en este sentido es un arma de doble filo, ya que afecta también al beneficioso EICL. Por ello, los tratamientos locales orientados a reparar los daños de la EICH son una solución deseable, así como aquellos que sean capaces de restaurar los propios mecanismos reguladores de la acción inmune. Y aquí pueden tener un papel importante las CME como potencial tratamiento, dada su demostrada capacidad inmunorreguladora, que ha sido reafirmada en este trabajo, al observar una reducción en la producción de factores inflamatorios, al igual que en la infiltración de linfocitos en la córnea, tras el tratamiento con estas células.

## **5.1 Efecto terapéutico de las CMEh**

### **5.1.1 Cuestiones sobre la valoración de la EICH ocular**

Para poder conocer el efecto terapéutico de las CMEh sobre la EICH ocular es necesario conocer bien la patología de esta enfermedad, algo que aún no se ha analizado con extensión suficiente en modelos animales. Por ello, en el presente trabajo de tesis doctoral, hemos avanzado en el estudio de los eventos que ocurren en la EICH ocular, al tiempo que valoramos posibles cambios en éstos tras el tratamiento con CMEh.

Los signos de EICH sistémica en ratones han sido descritos elaborando un sistema de puntuación (Cooke et al., 1996) que incluye la observación de cambios en la postura, actividad y textura del pelaje, así como pérdida de peso y daños en la piel que llegan a causar pérdida de pelo. Este sistema de puntuación ha sido modificado en otros trabajos, añadiendo, por ejemplo, la presencia de diarrea (Herretes et al., 2015). Nosotros hemos utilizado el sistema descrito por Cooke y cols. (1996), al que hemos añadido a la hora de analizar el tejido, la puntuación de signos de EICH ocular descritos por otros autores (Lorenzo et al., 2011). Esto nos ha permitido definir dos formas de EICH ocular, reconocibles al menos en animales *5M*.

Otro evento ya descrito en EICH en ratones, es la infiltración de linfocitos T y otras células del sistema inmune en estructuras oculares, incluida la córnea (Hassan et al., 2005; Herretes et al., 2015; Lorenzo et al., 2011). También en humanos está descrito el papel clave de los linfocitos T en la EICH ocular (Rojas et al., 2005). En nuestros experimentos, la migración masiva de linfocitos T en algunas córneas frente a su presencia más discreta en otras, hace que un recuento del número de estas células tenga

como resultado unas medidas de dispersión muy altas dentro de los grupos, por lo que no resulta útil para comparar entre grupos. Para valorar dicha infiltración, hemos descrito aquí los diferentes grados que se pueden observar en ésta, lo que ha servido mejor para la comparación entre grupos.

Para la valoración macroscópica de la superficie ocular, otros investigadores han utilizado la tinción con colorantes vitales, como fluoresceína (Barabino et al., 2005; Dursun et al., 2002; Herretes et al., 2015; Lin et al., 2011; Stevenson et al., 2014). Nosotros hemos optado por la valoración de la lágrima por el test del hilo de rojo fenol, también ampliamente utilizado en animales (Barabino et al., 2005; Dursun et al., 2002; Lin et al., 2011; Stevenson et al., 2014; Stewart et al., 2005), y mediante la medición de la osmolaridad lagrimal, para lo cual pusimos a punto un sistema de medición que había sido utilizado en humanos (Alves et al., 2014; Berchicci et al., 2014; Na et al., 2015; Schargus et al., 2015) e incluso en conejos (Di Tommaso et al., 2012).

Finalmente, otros parámetros que hemos explorado son el grosor del epitelio corneal, posibles signos de queratinización de éste y la expresión génica de factores inflamatorios. El grosor del epitelio corneal disminuye en pacientes con ojo seco (Cui et al., 2014), mientras que la queratinización se produce en estadios más avanzados de ojo seco y EICH ocular (Bron et al., 2017; Munir y Aylward, 2017). La expresión de factores inflamatorios, como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  es común en procesos de daño corneal como el ojo seco y la EICH ocular. El aumento de TNF- $\alpha$  se ha observado anteriormente en ratones con EICH ocular (Herretes et al., 2015).

Mediante la aplicación de todos estos parámetros, consideramos que hemos conseguido una valoración muy precisa sobre el grado de EICHo que sufren los animales y que nos ha permitido detectar las posibles mejorías que presentan los ojos tras la aplicación de las CMEh.

#### ***5.1.1.1 Medición de la osmolaridad de la película lagrimal en ratones***

Según el último informe del DEWS, la hiperosmolaridad es el mecanismo central de la enfermedad de ojo seco (Nelson et al., 2017). El incremento de osmolaridad en la lágrima ha sido observado en humanos (Benelli et al., 2010; Lemp et al., 2011; Suzuki et al., 2010) y también en algunos modelos animales (Chen et al., 2010; Di Tommaso et al., 2012; Stewart et al., 2005). La hiperosmolaridad lagrimal expone a la superficie

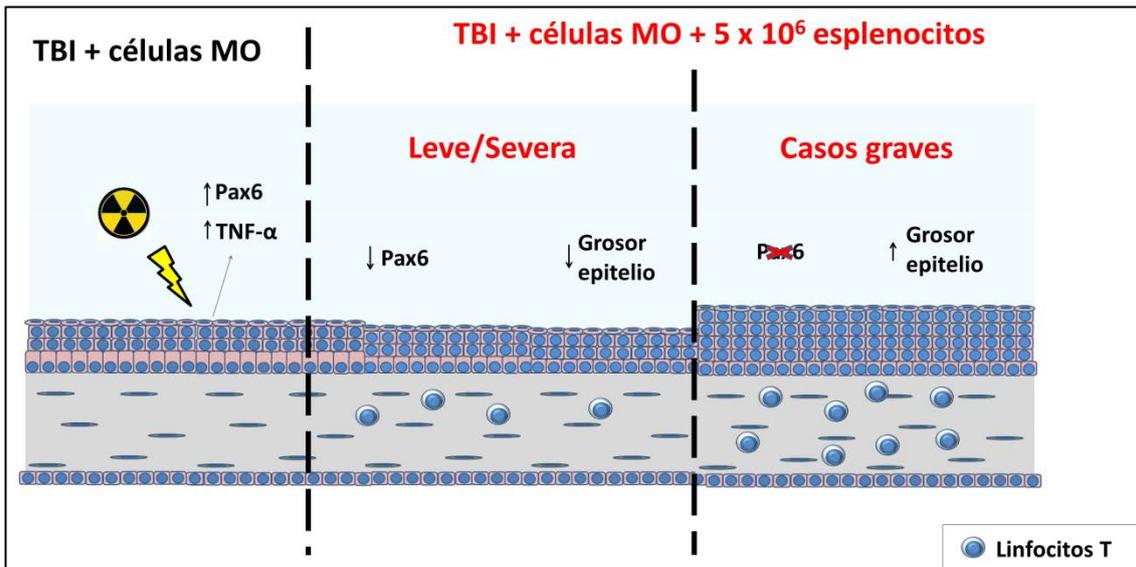
ocular a un estrés osmótico, que daña el epitelio, induciendo apoptosis (Luo et al., 2007) e iniciando un proceso inflamatorio (Luo et al., 2005).

Por todo esto, decidimos utilizar la medida de osmolaridad de la lágrima para la valoración de la superficie ocular. Los métodos utilizados anteriormente en ratones son la estimación de la osmolaridad a partir de la concentración de sodio, considerado por algunos el principal responsable del incremento en la osmolaridad (Chen et al., 2010; Stewart et al., 2005); o mediante el descenso crioscópico, es decir, analizando la variación en el punto de fusión de la lágrima como consecuencia de la variación en la concentración de sus componentes (Gilbard et al., 1987). El cálculo de la osmolaridad a partir de la concentración de sodio muestra valores grandes en las medidas de dispersión, mientras que el cálculo del descenso crioscópico requiere una gran experiencia para ser realizado con precisión (Tomlinson et al., 2010).

Para medir la osmolaridad en humanos disponemos de un osmolarímetro (TearLab Osmolarity System), que utiliza la impedancia eléctrica de la lágrima como forma de aproximarse a su osmolaridad. Este método ha demostrado ser tan eficaz como el del descenso crioscópico (Tomlinson et al., 2010), pero con la ventaja de que el osmolarímetro proporciona la lectura de osmolaridad inmediatamente tras la recogida de muestra de lágrima, reduciendo la probabilidad de alteraciones por evaporación. Este instrumento ha llegado a ser utilizado en conejos (Di Tommaso et al., 2012) y hemos sido los primeros en utilizarlo en ratones (Martínez-Carrasco et al., 2017). Los valores de osmolaridad obtenidos, así como el ICC calculado, nos han permitido concluir que la utilización de este osmolarímetro es posible en ratones y que es un excelente sistema para analizar las posibles modificaciones que sufre la osmolaridad tras un tratamiento.

### **5.1.2 Efecto de las CMEh EICH en animales 5M**

Los primeros experimentos en animales con EICH fueron realizados generando la enfermedad con la inoculación de  $5 \times 10^6$  esplenocitos, como se había hecho en experimentos anteriores (Lorenzo et al., 2011; Sanchez-Abarca et al., 2015). En general, no hemos observado una clara mejoría con el tratamiento con CMEh (Fig. 54).



**Figura 54.** Esquema de los cambios observados en la córnea de animales 5M y de animales TBI y MO. La irradiación provoca un aumento en la expresión de Pax6 y TNF- $\alpha$ . Tanto en casos de EICH leve como severa (aunque a un mayor nivel en estos últimos), se observa disminución de Pax6 en el epitelio corneal, reducción del grosor del epitelio e invasión de linfocitos T. En los casos más graves, la infiltración de linfocitos es masiva y el epitelio pierde totalmente el marcaje nuclear para Pax6 y se engrosa.

La evolución de la enfermedad a nivel sistémico fue similar en animales tratados y no tratados, aunque, en el día 21, los signos de EICH ocular parecieron menos severos en los ojos tratados, existiendo en éstos un mayor porcentaje de ojos con una puntuación de 0. Sin embargo, la osmolaridad y volumen lagrimales no mostraban signos de mejoría.

Desde un primer momento fue evidente, en el análisis del tejido corneal, que había un adelgazamiento del epitelio en muchos individuos. Al llevar a cabo las mediciones, comprobamos que esta reducción en el grosor epitelial ocurría principalmente en los animales con una puntuación de valoración de EICH más alta. Concretamente, aquellos con una puntuación de 6 o más tenían un epitelio de un grosor significativamente menor. El tratamiento con CMEh no se traducía en un mayor grosor del epitelio. El adelgazamiento del epitelio se ha observado anteriormente en pacientes con EICH ocular, algo que algunos atribuyen a una transición epitelio-mesénquima, que podría tener como posible causa la irradiación (Ogawa et al., 2010). La transición epitelio-mesénquima tendría como resultado la aparición de fibrosis, caracterizada por la proliferación de fibroblastos y su diferenciación a miofibroblastos. El adelgazamiento de la córnea se produce en este caso por la pérdida de células epiteliales, que se transforman en fibroblastos, por lo que el adelgazamiento se acompaña de una pérdida

de estratos celulares. Sin embargo, hemos realizado algunos experimentos preliminares de inmunodetección de la alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), una proteína característica de miofibroblastos, sin encontrar marcaje positivo en la córnea. Será necesario realizar este marcaje en un mayor número de animales, pero tampoco apunta en favor de una transición epitelio-mesénquima el hecho de que no hemos observado en nuestros animales una reducción en el número de estratos celulares.

No todas las córneas mostraban un epitelio adelgazado; en algunas se podía observar el fenómeno contrario: un aumento en el grosor acompañado por un aumento en el número de estratos celulares. Esto podía corresponderse con la aparición de metaplasia escamosa, un proceso que se da en casos de enfermedad de ojo seco y que es mediado por factores inflamatorios (Ambroziak et al., 2016; Li et al., 2010). En este proceso, se va produciendo un cambio en la producción de proteínas específicas de epitelio corneal por proteínas epidérmicas como, SPRR1B y CK10. Dado que no sabíamos en qué estadio de metaplasia se encontraban las córneas de nuestros animales, quisimos buscar la característica más temprana de este proceso, por lo que analizamos la presencia de Pax6. La pérdida de Pax6 se ha relacionado con la pérdida de fenotipo corneal y conjuntival (Y. T. Chen et al., 2013; McNamara et al., 2014; Ouyang et al., 2014). La inmunodetección de Pax6 permitió observar una casi total desaparición de Pax6 en el núcleo de células epiteliales de epitelios engrosados y una reducción del porcentaje de células Pax6<sup>+</sup> en el resto. La reducción en el porcentaje de Pax6 fue estadísticamente significativa en el caso del grupo *EICH*, pero no en las córneas *EICH+CME*. Sin embargo, el parámetro que mejor explicaba la pérdida de Pax6 era, como en el caso del grosor del epitelio, la severidad de la enfermedad. McNamara y cols. (2014) observaron una disminución en la expresión génica de *PAX6* en pacientes con síndrome de Sjögren. Esta disminución presentaba una alta correlación con el aumento en marcadores de queratinización, pero sólo en pacientes con altos niveles de IL-1 $\beta$ . Como veremos a continuación, la presencia de células inmunitarias en la córnea de nuestros ratones es mayor en los casos de *EICH* severa, por lo que éstas podrían estar induciendo la pérdida de Pax6 a través de la liberación de factores como IL-1 $\beta$ . Esta relación entre linfocitos T y pérdida de Pax6 mediada por IL-1 $\beta$  ya ha sido demostrada anteriormente en un modelo de ojo seco en ratón (Y. T. Chen et al., 2013).

Como ya hemos mencionado, la infiltración de linfocitos T es característica de la *EICH* ocular. Su presencia en la córnea se presume como la causa de procesos de

apoptosis (Lorenzo et al., 2011), pero también se relaciona con la pérdida de fenotipo corneal, con pérdida de Pax6 en el epitelio (Y. T. Chen et al., 2013). Por ello, analizamos la presencia de células CD3<sup>+</sup> en la córnea, al ser CD3 un marcador de linfocitos, tanto de CD4 como de CD8. La mayoría de córneas analizadas presentaban infiltración de células CD3<sup>+</sup>, que en ocasiones era masiva. La valoración semicuantitativa que elaboramos para poder comparar entre grupos no permitió apreciar diferencias en el caso de ojos tratados con CMEh y, de nuevo, fue la severidad de la EICH el principal factor a la hora de explicar el grado de infiltración. La masiva afluencia de linfocitos T en la córnea de nuestros ratones enfermos es muy similar a la observada en estudios anteriores con este modelo (Herretes et al., 2015; Lorenzo et al., 2011). Nuestros resultados confirman, por tanto, el importante papel que juegan los linfocitos T en los daños corneales producidos por la EICH.

Con todo lo observado, no parece que el tratamiento con CMEh sea efectivo en animales 5M. Cabe la posibilidad de que la EICH fuera en estos animales ya demasiado severa para cuando las CMEh fueron inyectadas, por lo que éstas no pueden ya contrarrestar el daño de la enfermedad.

### **5.1.3 Efecto de las CMEh EICH en animales 4M**

La inoculación de un menor número de esplenocitos en el trasplante produjo una EICH menos severa y, probablemente como consecuencia de esto, el tratamiento con CMEh fue capaz de producir una mejoría en varios aspectos de la afectación ocular (Fig. 55).

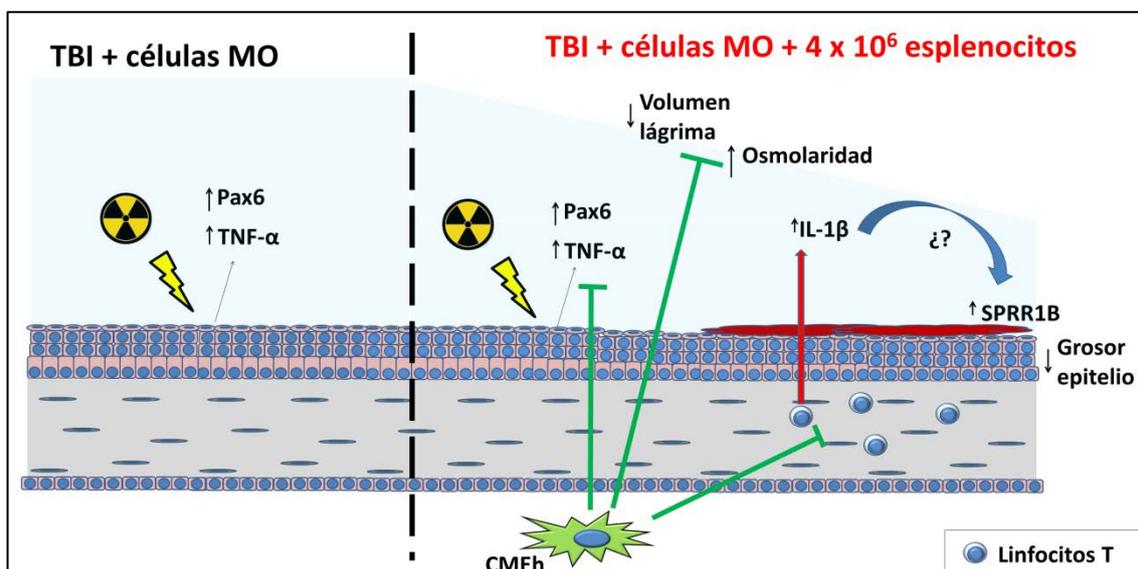
#### **5.1.3.1 Valoración macroscópica**

La evolución de la puntuación de EICH de los animales sin tratar no fue diferente que la de los animales 5M, si bien hubo menos animales que tuvieron que ser sacrificados antes de lo previsto debido a un agravamiento de la enfermedad. Sin embargo, los animales tratados con CMEh a día 10, mostraron una mejor puntuación a día 14 y a día 21. Es cierto que es algo común en este modelo encontrar una mejoría en la segunda semana (Cooke et al., 1996), pero en este caso dicha mejoría fue aún mayor que en los animales que no recibieron tratamiento. Los parámetros en los que la puntuación era menor en los animales tratados fueron postura, actividad y pelo. Todos ellos tienen en común que son indicadores de bienestar animal: la postura encorvada revela dolor, mientras que el dolor y el malestar hacen disminuir la actividad del ratón,

lo que lleva a un menor tiempo invertido en acicalamiento y, así, un pelo más encrespado. En cambio, peso y piel eran similares con tratamiento y sin él. Es improbable (aunque no descartable) que las CMEh inyectadas localmente puedan liberar factores que afecten a nivel sistémico. Una opción más probable sería que una mejoría en el bienestar del animal tuviera que ver con una mejora de las molestias ocasionadas por la EICH ocular. En lo que se refiere a los signos de EICH ocular, hubo siempre más ojos tratados con puntuación de 0, y es especialmente reseñable el hecho de que, a día 28, ningún ojo inyectado con CMEh mostrara una puntuación de 2.

### 5.1.3.2 Evaluación de la película lagrimal

La osmolaridad y volumen lagrimales empeoran con la EICH ocular (Berchicci et al., 2014; Na et al., 2015; Schargus et al., 2015). En nuestro modelo de EICH, la osmolaridad y el volumen empeoran tras la irradiación y trasplante, pero mejoran en la segunda semana junto con los demás aspectos de la enfermedad. Se hace difícil valorar ambos parámetros, osmolaridad y volumen lagrimales, dado que existe siempre cierta variabilidad y es posible que la enfermedad afecte de diferente manera y a diferentes tiempos en los distintos animales. Sin embargo, se pueden observar importantes diferencias a día 21 posttrasplante. Los ojos no tratados con CMEh muestran peores



**Figura 55.** Esquema de los cambios observados en la córnea de animales *4M* y de animales *TBI* y *MO*. El aumento en la expresión de *Pax6* y *TNF-α* producido por la irradiación se produce también en los animales con EICH. La alteración de la lágrima se refleja en la reducción de su volumen y el aumento de su osmolaridad. La reducción en el grosor del epitelio se acompaña de un aumento en la proteína de queratinización *SPRR1B*, coincidente con la invasión de linfocitos T. Como demuestran otros estudios (Chen et al., 2010), la liberación de *IL-1β* por linfocitos es un factor clave en la metaplasia escamosa.

valores que los ojos *MO*, sobre todo en cuanto a la osmolaridad, mientras que los ojos *MO* y *EICH+CME* presentan valores similares.

Los resultados en la valoración de los signos de *EICH* y de la superficie ocular permiten ser optimistas sobre el tratamiento con *CMEh* en animales *4M*. El volumen y osmolaridad lagrimales han sido utilizados para valorar el efecto de tratamientos para el ojo seco (Benelli et al., 2010; Di Tommaso et al., 2012). Recientemente, en un estudio con *CME* inyectadas en la zona periorbital se logró mejorar la producción basal de lágrima en un modelo de ojo seco, al tiempo que disminuía la inflamación (Lee et al., 2015b). De forma similar, en nuestro estudio la mejora observada con el tratamiento tiene que ver con una reducción de la inflamación, como discutiremos a continuación. El volumen de lágrima también se vio mejorado en otro estudio tras un tratamiento con *CME* por vía tópica (Beyazyıldız et al., 2014).

### **5.1.3.3 Valoración del epitelio corneal**

El epitelio corneal de animales *4M* exhibía una pérdida de grosor, como ocurría en los *5M*. Sin embargo, no se encontró ninguna córnea en la que se diera el efecto contrario, es decir, un engrosamiento del epitelio. Aunque todas las córneas de animales con *EICH* tenían un epitelio de menor grosor, sólo las córneas de animales no tratados (grupo *EICH*) mostraron diferencias significativas.

La presencia de *Pax6* en el epitelio corneal de animales *4M* cambió mucho respecto lo observado en animales *5M*. En el grupo *EICH*, el porcentaje de células *Pax6*<sup>+</sup> a día 28 es similar al de las córneas *Control*, mientras que su expresión génica a día 21 aumenta significativamente. Por su parte, las córneas *MO* mostraban un aumento incluso mayor, tanto en la expresión a día 21 como en el porcentaje de células *Pax6*<sup>+</sup> a día 28. La correlación con el aumento de *TNF- $\alpha$* , hacía pensar en esa citoquina como la causa de del aumento de *Pax6*, algo que se ha observado en células HeLa (Jiang et al., 2003). No hemos encontrado estudios que evalúen la expresión de *Pax6* en células de epitelio corneal tras la adición de *TNF- $\alpha$* . Sin embargo, nuestros experimentos con células HCLE indican que *TNF- $\alpha$* , al igual que *IL-1 $\beta$* , disminuye la expresión de *Pax6*, por lo que hemos de buscar otra causa para el aumento observado en los ratones. Los experimentos con animales *TBI* apuntan a que la correlación entre *TNF- $\alpha$*  y *Pax6* se debe a una causa común, que parece ser la irradiación, ya que ésta aumenta la expresión de ambos genes en la córnea. Por otro lado, también sorprende encontrar una reducción

de casi el 50 % de células Pax6<sup>+</sup> en ambos ojos de animales tratados. La discrepancia entre la expresión génica de *Pax6* y su inmunodetección en el tejido en córneas *EICH+CME OI* puede deberse a un brusco cambio entre el día 21 y el día 28, aunque existe la posibilidad de un aumento en su degradación o regulaciones postranscripcionales que inhiban su traducción, como podría ser la expresión de miRNAs (Shalom-Feuerstein et al., 2012).

La sobreexpresión de *Pax6* puede tener también consecuencias negativas. Algunos estudios señalan que esta sobreexpresión disminuye la proliferación y aumenta la apoptosis (Ouyang et al., 2006). Un experimento con ratones que sobreexpresan *Pax6* en la córnea mostró diversas alteraciones producidas en ésta: algunos animales tenían un epitelio corneal más adelgazado y se producía un aumento en factores inflamatorios y angiogénicos (Davis y Piatigorsky, 2011). En los ratones más graves se producía el efecto contrario, es decir, una disminución en la expresión de *Pax6*, acompañada por una disminución también de *K12* y un aumento en genes de la familia *SPRR* (“small proline-rich protein”) como *SPRR2A*, *2F* y *1A*. De forma similar, es posible que la disminución de Pax6 en nuestros animales *5M* sea un estadio más avanzado del mismo proceso que se observa en los animales *4M*.

La disminución de Pax6 en animales tratados parece un dato negativo, puesto que puede estar significando una queratinización del epitelio como consecuencia del tratamiento. Por ello, era necesario aquí añadir la detección de *SPRR1B*, una proteína localizada de forma temprana en metaplasia escamosa en ojo seco (Li et al., 2008). El análisis del tejido corneal a día 28 revela un aumento de esta proteína en determinadas áreas del epitelio corneal en el grupo *EICH*. Bastante menor es el aumento de *SPRR1B* que se observa en algunas córneas *EICH+CME* y *EICH+CME OI*, que tiene, además, una distribución diferente: mientras que en éstos el marcaje para *SPRR1B* forma una fina capa superficial, en el grupo *EICH* se observaba marcaje positivo en zonas focalizadas, en las que este marcaje abarcaba varios estratos celulares. El análisis de expresión génica a día 21 revela que la expresión de *SPRR1B* disminuye, en general, en aquellas córneas en las que aumenta la expresión de *Pax6*, mientras que en los ojos tratados los niveles de expresión son similares al grupo *Control*.

Los datos mostrados, sobre todo los relativos a la inmunodetección de *SPRR1B* y Pax6 en secciones de córnea, nos permiten afirmar que las variaciones en Pax6 no pueden determinar o predecir por sí solas la existencia de queratinización del epitelio.

En cambio, la aparición de *SPRR1B* sí está relacionada con la infiltración inmune, al ser las córneas *EICH* con mayor infiltración las que presentan una mayor área con marcaje *SPRR1B*<sup>+</sup>. Además, las córneas que a día 21 mostraron un aumento en la expresión de *IL-1 $\beta$*  fueron las únicas en las que se produjo un aumento en la expresión de *SPRR1B*, a pesar de que también en éstas la expresión de *Pax6* estaba incrementada. Esto concuerda con los estudios que sitúan la activación de receptores IL-1R como un factor desencadenante de metaplasia escamosa (Chen et al., 2010; Li et al., 2008).

La alta osmolaridad de la película lagrimal, consecuencia de la enfermedad de ojo seco, provoca graves daños en el epitelio corneal, como la ruptura de uniones intercelulares que perturban la función de barrera del epitelio corneal (Luo et al., 2005). La exposición del epitelio corneal a medios de osmolaridad elevada estimula la producción de citoquinas inflamatorias, así como de enzimas de la familia de las metaloproteinasas (MMPs) (Li et al., 2004; Luo et al., 2005), algo que también se ha observado en modelos de ojo seco (Corrales et al., 2006; Luo et al., 2004). Entre estas MMPs, la MMP9 ha sido ampliamente estudiada en relación con el ojo seco en humanos, ya que es frecuente encontrar un aumento de ésta en la lágrima (Willcox et al., 2017). Esta MMP9 es capaz de alterar las uniones intercelulares, a través del receptor CD147 (Huet et al., 2011; Mauris et al., 2015) lo que es confirmado por la resistencia a la disrupción de la barrera epitelial que se observa en ratones *knockout* para MMP9 (Pflugfelder et al., 2005).

Hemos analizado la expresión de *MMP9* en las córneas de nuestros animales, para comprobar si ésta aumenta con la enfermedad. Sin embargo, lo que hemos encontrado es el efecto contrario: la expresión de *MMP9* disminuye en los animales con *EICH*. La síntesis de MMPs es compleja; las MMPs se sintetizan y liberan inactivas y existen reguladores de su función que son liberados también al medio y activan o inactivan estas proteasas (Sivak y Fini, 2002). Hacia esta compleja regulación de MMP9 apuntan los experimentos con células HCLE, que indican que la presencia de *IL-1 $\beta$* , aun en presencia de *TNF- $\alpha$* , puede provocar la disminución de la expresión génica de *MMP9*, al tiempo que aumenta la cantidad de MMP9 activa en el medio extracelular. No obstante, las córneas *MO* también mostraron una disminución en la expresión de *MMP9*, al igual que se puede observar en córneas *TBI*. Por tanto, aunque es posible que la irradiación sea la causa de la aparición de *IL-1 $\beta$*  en la lágrima (proveniente de la conjuntiva u otras estructuras) y que ésta afecte de la manera observada a la expresión

de *MMP9*, no se puede descartar con nuestros datos que dicho proceso de irradiación cause una disminución en la expresión de *MMP9* por otras vías. Qué ocurre con la producción de *MMP9* es algo que tendrá que ser dilucidado en el futuro.

#### **5.1.3.4 Inflamación de la córnea**

La inflamación es una parte clave de la enfermedad de ojo seco (Bron et al., 2017). La inflamación puede ser consecuencia de la liberación de sustancias inflamatorias ante un daño causado por estrés osmótico (Pflugfelder, 2011). En el caso de la EICH, se produce un daño inflamatorio de estructuras productoras de lágrima, lo que deriva en el aumento de la osmolaridad lagrimal.

La infiltración de células del sistema inmune en la córnea de ratones con EICH ha sido demostrada en varios estudios (Herretes et al., 2015; Lorenzo et al., 2011). La infiltración de linfocitos T en nuestros animales se limita al limbo esclerocorneal y la córnea periférica en los casos leves. En los casos más severos llegan a invadir la córnea central. Sin embargo, las córneas de ojos tratados con CMEh no mostraron ninguna célula  $CD3^+$  y sólo en un caso llegamos a observar marcaje en el limbo de una córnea *EICH+CME OI*. Por tanto, el tratamiento con CMEh fue efectivo para inhibir la infiltración de linfocitos, no sólo en el ojo tratado, sino también en el contralateral. Como ya hemos comentado, se encontraron resultados similares en cuanto a la infiltración de linfocitos T en ratones con ojo seco tratados con CME (Lee et al., 2015b). La prevención de la invasión de linfocitos T es una parte fundamental en los tratamientos de EICH ocular. Entre los tratamientos más frecuentes se encuentra el uso tópico de ciclosporina A y tacrolimus, ambos inhibidores de la calcineurina y, por tanto del crecimiento y desarrollo de linfocitos T. Sin embargo, algunos pacientes no responden al tratamiento y, en el caso del tacrolimus, su uso no es aconsejable a largo plazo (Munir y Aylward, 2017).

La invasión de células  $CD3^+$  llegó en nuestros animales también a la glándula lagrimal (Martín, 2017), como también se ha demostrado en estudios anteriores (Hassan et al., 2005). Dicha infiltración fue menor en los animales tratados con CMEh. Pero no sólo son linfocitos las células del sistema inmune que invaden la córnea, sino también macrófagos y neutrófilos (Herretes et al., 2015). En estudios preliminares, hemos detectado también un aumento de células  $IBA1^+$  en animales con EICH. El recuento de

células con marcaje positivo para esta proteína nos permitirá saber si el tratamiento con CMEh afecta también a la población de la familia monocito/macrófago.

La existencia de privilegio inmune en la córnea hace más difícil para los linfocitos acceder a ella que a otras estructuras, como la conjuntiva o las glándulas lagrimales. Para que esto suceda, ha de romperse este privilegio inmune, algo que puede ocurrir ante una exposición continuada a un estrés desecante. La exposición de células epiteliales corneales a medios con alta osmolaridad se traduce en la liberación de citoquinas como IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  (Li et al., 2006; Lin et al., 2014; Luo et al., 2005, 2004) y éstas sirven como atrayente para las células inmunitarias. Puesto que a día 21 se observa una osmolaridad alta en los ojos no tratados pero no en los tratados ni en los *MO*, quisimos comprobar si existía un cambio en la expresión de estas citoquinas con el tratamiento en ese mismo día.

La expresión de IL-1 $\beta$  sólo estaba aumentada en algún animal *EICH* y *EICH+PBS*. La expresión de esta citoquina se limita a células inmunes, por lo que un aumento en ella se puede deber a un incremento en la presencia de células inmunes activadas. Ningún animal tratado ni *MO* mostró aumento de IL-1 $\beta$ ; al contrario en muchos animales se observaba una disminución de ésta, aunque no estadísticamente significativa. En los experimentos con animales TBI también se pudo observar esta disminución, que se hizo estadísticamente significativa a día 7, lo que podría indicar un daño en la población de macrófagos residentes por efecto de la radiación. En este sentido, diversos estudios demuestran que la irradiación provoca una disminución de todas las poblaciones de células inmunitarias, incluido el linaje monocito/macrófago, tanto en la sangre periférica como en las mucosas (Garg et al., 2010; Schwarte y Hoffmann, 2005).

Por su parte, la expresión de TNF- $\alpha$  experimentó un gran aumento en los animales con *EICH*. Éste aumento fue contrarrestado con el tratamiento de CMEh en las córneas de ojos inyectados, pero no en las contralaterales. Además, TNF- $\alpha$  aumentó también en las córneas *MO*, por lo que, aunque TNF- $\alpha$  influye en la infiltración de linfocitos, parece necesario algún factor más, como el estrés desecante. El aumento de TNF- $\alpha$  es consecuencia de la irradiación, como muestran los experimentos con animales *TBI*. El tratamiento con CMEh actuó, entonces, contra los daños provocados por la irradiación. Esto es importante, ya que en la *EICH* aguda el daño producido por el régimen de

condicionamiento es el desencadenante de la enfermedad (Schroeder y DiPersio, 2011). Algunos estudios demuestran que la reducción de la intensidad de los regímenes de condicionamiento da lugar a una menor incidencia de EICH aguda y una forma más leve de ésta (Chiang et al., 2016; Gyurkocza y Sandmaier, 2014; Mohty et al., 2005). Por ello, reducir las consecuencias de la irradiación conlleva reducir el daño causado por la EICH aguda.  $TNF-\alpha$  es un factor que actúa tanto para activar a las células presentadoras de antígeno, como para atraer a otras células inmunitarias al lugar dañado (Bron et al., 2017; Munir y Aylward, 2017) y que se libera tras la irradiación (Hill et al., 1997; Schwarte et al., 2007). La inhibición de este factor, por tanto, puede ser la vía por la que las CMEh consiguen reducir la infiltración de linfocitos T en la córnea.

Llama la atención el alto nivel de expresión de  $TNF-\alpha$  observado en córneas *MO*. La explicación hay que buscarla en el daño por la irradiación, probablemente, aunque en principio no parecería esperable que los efectos de ésta se prolongasen tanto. Dado que este aumento y el de *Pax6* son las únicas alteraciones encontradas en este grupo, no se puede calificar a estos animales como enfermos, pero es evidente que el tejido corneal ha sufrido algún daño. Por ello, no creemos aconsejable sustituir al grupo *Control* por el grupo *MO* como un grupo de referencia, como se ha utilizado en otros trabajos (Herretes et al., 2015).

## 5.2 Migración de las CMEh

Todo tratamiento con CME debe responder, al menos, a dos cuestiones, máxime cuando está orientado a una futura aplicación en humanos. Por un lado, es obvio que es importante determinar si el tratamiento es beneficioso o no. Pero por otro, es necesario conocer el destino de estas células, tanto para saber si éstas son capaces de integrarse en el tejido y reconstruirlo, diferenciándose a los tipos celulares propios de dicho tejido, como para poder descartar algunas consecuencias indeseables, propias de células a las que se atribuye un potencial de célula madre, como sería la formación de tumores.

En este trabajo utilizamos la inyección subconjuntival como vía de aplicación de las CMEh, al ser menos invasiva y generar pocas complicaciones. Las CMEh inoculadas pudieron ser seguidas gracias a que habían sido transfectadas con un vector lentiviral para expresar GFP, a lo que se añadió la utilización de un anticuerpo que marca las mitocondrias humanas para confirmar el marcaje. Sin embargo, de todos los animales analizados, sólo dos contenían células Mitocondria<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>. Ambos animales eran *5M*, lo

cual puede indicar que sólo en una EICH generada con una dosis alta de esplenocitos existe la posibilidad de observar migración de CMEh hacia la córnea; una forma más severa de EICH puede implicar un daño mayor en la córnea, con la consiguiente liberación de señales que, como se ha visto en otros estudios (Shi et al., 2010; Squillaro et al., 2016), pueden servir de atrayente para las CME. La menor infiltración de linfocitos en animales *4M* que en animales *5M*, que se puede observar en nuestro trabajo, apunta en este sentido. Esto estaría de acuerdo con los resultados obtenidos por Sánchez-Abarca y cols. (2015), donde utilizaron  $5 \times 10^6$  esplenocitos para la generación de EICH y sí encontraron CMEh en la córnea. De los dos animales en los que localizamos células Mitocondria<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>, el animal sacrificado a 20 días postrasplante tenía una puntuación final de EICH de 10 y el sacrificado a 40 días tuvo una puntuación final de 11, lo que muestra un grado bastante severo de enfermedad. Además, en el animal sacrificado a 40 días se puede observar una córnea con un epitelio muy adelgazado, con sólo dos células de grosor (Fig. 52D-F), indicando que ésta córnea estaba visiblemente afectada por la enfermedad. Las células GFP<sup>+</sup> encontradas en el epitelio no mostraban marcaje para Pax6, si bien en alguna se observaba un tenue marcaje coincidente con el núcleo. Esto podría indicar que alguna célula inicia el camino de la diferenciación, aunque sería aventurado hacer una afirmación en este sentido sólo a partir de casos aislados. Ya Lin y cols. (Lin et al., 2013) observaron CME en el epitelio corneal, pero sin llegar a expresar marcadores de diferenciación. Nuestros resultados se ven completados con el análisis del párpado y la glándula lagrimal realizado por E. Martín en su trabajo de tesis doctoral (Martín, 2017). En dicho trabajo se concluye que las CMEh aparecen tanto en el párpado como en la glándula lagrimal. Éstos son lugares de más fácil acceso para dichas células, por encontrarse más cerca del lugar de inyección y por ser las primeras estructuras en presentar inflamación (Munir y Aylward, 2017), lo que supone un estímulo para la migración de las CME.

Si las CMEh se encuentran en la córnea en baja proporción, podría ser difícil detectarlas por inmunofluorescencia en secciones. Por ello, quisimos analizar su presencia mediante la detección de la expresión del gen *GAPDH* humano. No encontramos amplificación de este gen en ninguna de las córneas analizadas. Hay que matizar, que sólo fueron analizadas córneas de animales *4M*. Al no observar un beneficio suficiente del tratamiento con CMEh en animales *5M*, no encontramos suficientes motivos para emplear más animales para detectar su presencia por PCR, ya

que, de estar en la córnea, no se puede decir que estén llevando a cabo una función lo suficientemente útil como para que se justifique éticamente el utilizar más animales. Ya a día 21 se pueden observar distintos signos de mejoría con el tratamiento en animales 4M, por lo que este efecto no puede ser atribuido a la presencia de las CMEh en la córnea. En varios estudios se han inyectado CME por vía intravenosa o intraperitoneal para tratar varias afecciones corneales: daño corneal producido por NaOH (Lee et al., 2014), o etanol (Roddy et al., 2011) y uveítis autoinmune experimental (Ko et al., 2016). En ninguno se encontró rastro de estas células en estructuras oculares, a pesar de observarse efectos beneficiosos por el tratamiento. En cambio, Mittal y cols., (2016) trataron de esta manera ratones en los que realizaron una queratectomía en un ojo, encontrando 7 días después CME (marcadas con GFP) en la córnea dañada pero no en la sana. En todos estos estudios, la acción beneficiosa se achacó a liberación de sustancias, como TSG-6 (*TNF-stimulated gene 6 protein*) (Ko et al., 2016; Roddy et al., 2011) o HGF (*Hepatocyte growth factor*) (Mittal et al., 2016). En nuestro caso, cabe la posibilidad de que las CMEh estén liberando factores como éstos al medio, algo que debería ser estudiado en el futuro.

La inyección subconjuntival de CME ha sido utilizada también anteriormente, con resultados positivos, si bien algunos estudios no han seguido el destino de dichas células (Almaliotis et al., 2015). Lee y cols. (2015b) consiguieron reducir la inflamación en ratones con ojo seco inducido por inyección de concanavalina A en la glándula lagrimal, pero no encontraron células CME injertadas. Yao y cols. (2012) inyectaron CME por vía subconjuntival en ratas con quemadura química por NaOH, tras lo cual encontraron CME en regiones cercanas al lugar de inyección, pero no en la córnea. Por tanto, también es más probable que las CMEh que hemos inyectado se injerten en otras zonas, como la conjuntiva, algo que sí parece ocurrir y ha sido detectado por E. Martín (Martín, 2017). Puesto que estos tejidos mucosos del ojo son probablemente los primeros en resultar afectados por la EICH (Munir y Aylward, 2017), si las CMEh son capaces de restaurarlos, eso tendría un efecto positivo sobre la córnea.

Los mejores resultados en cuanto a injerto y diferenciación de CME en la córnea se han obtenido mediante inyección intraestromal. Arnalich-Montiel y cols. (2008), tras lesionar la córnea de conejos por ablación, inyectaron en la córnea CME humanas obtenidas de tejido adiposo, y, si bien no obtuvieron grandes resultados en la regeneración de la córnea, observaron que estas células permanecían hasta 3 meses en la

córnea y llegaban a expresar proteínas propias de queratocitos, como keratocán. Tanto Liu y cols. (2010) como Coulson-Thomas y cols. (2013) utilizaron la vía intraestromal para inyectar células mesenquimales procedentes de cordón umbilical y tratar deficiencias corneales en ratones. En ambos casos, se demostró la permanencia de las células hasta 10-12 semanas y, en el caso de Liu y cols. (2010), se comprobó la expresión de keratocán y ALDH3A1 por dichas células. Aunque en estas investigaciones se detecta la presencia de las CME y su posible diferenciación, no se demuestra una mejoría en la córnea y, además, la vía de administración es demasiado invasiva y supone un gran riesgo de daño corneal (Arnalich-Montiel et al., 2008).

En otros trabajos se ha utilizado la administración de CME por vía tópica. En un estudio se trataron de esta manera los ojos de ratones a los que se causó una quemadura química en la córnea (utilizando NaOH). Las CME (obtenidas de la grasa periorbitaria de pacientes) fueron detectadas en el epitelio y el estroma tanto de la córnea como del limbo esclerocorneal hasta 7 días después (Lin et al., 2013). Otro estudio, esta vez con un modelo de ojo seco en ratas generado mediante la aplicación tópica de cloruro de benzalconio, utilizó CME de médula ósea de ratas como tratamiento, también tópico, encontrando una semana después CME en la conjuntiva y las glándulas de Meibomio (Beyazyıldız et al., 2014). De nuevo, la conjuntiva y otros tejidos circundantes, son lugares más propicios para encontrar las CME aplicadas, cosa que ocurre en nuestro caso como se ha demostrado en el trabajo de E.Martín (2017). Hemos de recordar que la córnea posee mecanismos que pueden limitar la migración de células de forma selectiva.

A la luz de estos resultados, podemos decir que la aplicación de CMEh por vía subconjuntival sólo podría terminar con la migración de estas células hacia la córnea en casos de daño bastante severo, como puede ser el caso de la generación de EICH con  $5 \times 10^6$  esplenocitos. Sin embargo, los efectos beneficiosos del tratamiento con CMEh por esta vía no requieren de la migración de las CMEh a la córnea, como muestran nuestros resultados y también los de estudios anteriores (Yao et al., 2012). En nuestro caso, el mecanismo de acción de las CME es algo que habrá que estudiar en el futuro.

### **5.3 Futuras direcciones**

En este trabajo hemos demostrado algunos efectos beneficiosos del tratamiento con CMEh por vía subconjuntival en la córnea de ratones con EICH. Una debilidad, que

tendrá que ser solventada en el futuro, es que no hemos podido completar mediciones de osmolaridad en animales tratados sólo con TFS. Serán necesarios estos experimentos para confirmar que la mejora en cuanto a la osmolaridad de la lágrima es debida a las CMEh y no un efecto de la inyección con un tampón de baja osmolaridad, como es el TFS. Sin embargo, los datos del test del hilo de rojo fenol indican que el volumen no mejora con la inyección de TFS y el aspecto de los ojos no es en absoluto mejor. También será bueno analizar el tejido corneal de estos animales mediante inmunofluorescencia, para determinar la posible infiltración de linfocitos T, aunque el aumento en la expresión de *IL-1 $\beta$*  en algunos ratones ya indica que la inyección de TFS no mejora este aspecto y que, por tanto, son las CMEh las responsables de que no encontremos rastro de linfocitos T en las córneas de ojos tratados.

Las CMEh no migran hacia la córnea, por lo que será necesario determinar por qué mecanismo actúan para inducir mejoras en la enfermedad. Algunos trabajos apuntan a la liberación de factores como TSG-6 (*TNF-stimulated gene 6 protein*) (Roddy et al., 2011) o HGF (*Hepatocyte growth factor*) (Mittal et al., 2016) como responsables del efecto beneficioso de las CME, por lo que en el futuro habrá que resolver si es la liberación de alguno de estos factores la responsable de los efectos sobre la EICH ocular. TSG-6 es una proteína producida por algunas células ante señales inflamatorias y que tiene actividad antiinflamatoria (Milner y Day, 2003; Wisniewski y Vilček, 1997). Se ha demostrado su liberación por parte de CME e incluso se ha propuesto su nivel de expresión como un marcador de la eficacia de las CME para reducir la inflamación (Lee et al., 2014). La aplicación tópica de TSG-6 ha mostrado ser capaz de proteger la superficie ocular ante daños con origen inflamatorio (Lee et al., 2015a; Roddy et al., 2011). Por su parte, HGF es un factor presente de forma natural en la lágrima y se cree que su liberación por las CME puede ayudar a la regeneración del epitelio corneal (Mittal et al., 2016).

Los ojos *EICH+CME OI* no ven reducido el nivel de expresión de *TNF- $\alpha$*  con el tratamiento, pero sí se observan cambios similares a las córneas *EICH+CME* en cuanto al porcentaje de células Pax6<sup>+</sup> y en cuanto a la infiltración de células CD3<sup>+</sup>. Por tanto, no se puede descartar un efecto beneficioso también en el ojo no inyectado de animales tratados. Dada la íntima relación entre el sistema nervioso y el sistema inmune en la córnea (Hori et al., 2010; Li et al., 2004; Niederkorn, 2006), es posible que la respuesta se halle en los nervios corneales. De hecho, Yamaguchi y cols. (2016) observaron

efectos en los ojos contralaterales de individuos en los que se produjo un daño corneal, incluyendo cambios en la densidad de nervios corneales y en células dendríticas. En futuros trabajos, será necesario seguir de cerca los efectos de la enfermedad y el tratamiento sobre los nervios corneales. Estos datos también llaman la atención sobre la utilización del ojo contralateral como grupo sin tratamiento, algo frecuente que se hace para reducir el número de animales a utilizar.

# **Conclusiones**



In accordance with the stated objectives and based on the results obtained in the present doctoral thesis, we have reached the following conclusions:

1. The murine model of GVHD used in the present work reproduces disturbances similar to those observed in the dry eye disease in humans. Therefore, this is a valid model for the study of the disease.

2. The GVHD model used in this study shows disturbances in both the tear film (hyperosmolarity and decrease in tear volume) and the cornea (inflammation and squamous metaplasia).

3. The use of Pax6 loss as a marker of squamous metaplasia is valid only in very severe cases of the disease, where lymphocytic infiltration is present.

4. In experiments with similar GVHD models, the use as a control of animals subjected to total body irradiation and transplanted with only bone marrow cells is not completely reliable, given that irradiation induces corneal disturbances.

5. The treatment with hMSC applied by subconjunctival injection has no visible effects in mice with GVHD induced with a high dose of splenocytes ( $5 \times 10^6$ ), but it does have an effect when a lower dose of splenocytes is used ( $4 \times 10^6$ ).

6. After the treatment with hMSC there is an improvement in tear film disturbances, a decrease in the presence of SPRR1B, a return to normal *TNF- $\alpha$*  gene expression values and avoidance of lymphocytic infiltration, in animals transplanted with a low dose of splenocytes.

7. The improvement in corneal disturbances is not due to hMSC migration, which does not occur.

# **Bibliografía**

- Almaliotis, D., Koliakos, G., Papakonstantinou, E., Komnenou, A., Thomas, A., Petrakis, S., Nakos, I., Gounari, E., Karampatakis, V., 2015. Mesenchymal stem cells improve healing of the cornea after alkali injury. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 253, 1121–1135. doi:10.1007/s00417-015-3042-y
- Alves, M., Reinach, P.S., Paula, J.S., Vellasco e Cruz, A.A., Bachette, L., Faustino, J., Aranha, F.P., Vigorito, A., de Souza, C.A., Rocha, E.M., 2014. Comparison of Diagnostic Tests in Distinct Well-Defined Conditions Related to Dry Eye Disease. *PLoS One* 9, e97921–e97921. doi:10.1371/journal.pone.0097921
- Ambati, B.K., Nozaki, M., Singh, N., Takeda, A., Jani, P.D., Suthar, T., Albuquerque, R.J.C., Richter, E., Sakurai, E., Newcomb, M.T., Kleinman, M.E., Caldwell, R.B., Lin, Q., Ogura, Y., Orecchia, A., Samuelson, D.A., Agnew, D.W., St. Leger, J., Green, W.R., Mahasreshti, P.J., Curiel, D.T., Kwan, D., Marsh, H., Ikeda, S., Leiper, L.J., Collinson, J.M., Bogdanovich, S., Khurana, T.S., Shibuya, M., Baldwin, M.E., Ferrara, N., Gerber, H.-P., De Falco, S., Witta, J., Baffi, J.Z., Raisler, B.J., Ambati, J., 2006. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature* 443, 993–997. doi:10.1038/nature05249
- Ambroziak, A.M., Szaflik, J., Szaflik, J.P., Ambroziak, M., Witkiewicz, J., Skopiński, P., 2016. Immunomodulation on the ocular surface: A review. *Cent. Eur. J. Immunol.* 41, 195–208. doi:10.5114/ceji.2016.60995
- Argüeso, P., Spurr-Michaud, S., Russo, C.L., Tisdale, A., Gipson, I.K., 2003. MUC16 mucin is expressed by the human ocular surface epithelia and carries the H185 carbohydrate epitope. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 2487–2495. doi:10.1167/iovs.02-0862
- Arnalich-Montiel, F., Pastor, S., Blazquez-Martinez, A., Fernandez-Delgado, J., Nistal, M., Alio, J.L., De Miguel, M.P., 2008. Adipose-derived stem cells are a source for cell therapy of the corneal stroma. *Stem Cells* 26, 570–9. doi:10.1634/stemcells.2007-0653
- Augusteyn, R.C., 2004. Alpha-Crystallin: a Review of Its Structure and Function. *Clin. Exp. Optom.* 87, 356–66. doi:10.1111/j.1444-0938.2004.tb03095.x
- Baksh, D., Song, L., Tuan, R., 2004. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J. Cell. Mol. Med.* 8, 301–16. doi:008.003.03 [pii]
- Balasubramaniam, S.C., Raja, H., Nau, C.B., Shen, J.F., Schornack, M.M., 2015. Ocular Graft-Versus-Host Disease. *Eye Contact Lens Sci. Clin. Pract.* 41, 256–261. doi:10.1097/ICL.0000000000000150
- Barabino, S., Chen, Y., Chauhan, S., Dana, R., 2012. Ocular surface immunity: Homeostatic mechanisms and their disruption in dry eye disease. *Prog. Retin. Eye Res.* 31, 271–285. doi:10.1016/j.preteyeres.2012.02.003
- Barabino, S., Shen, L.L., Chen, L., Rashid, S., Rolando, M., Dana, M.R., 2005. The controlled-environment chamber: A new mouse model of dry eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 2766–2771. doi:10.1167/iovs.04-1326
- Benedek, G.B., 1971. Theory of transparency of the eye. *Appl. Opt.* 10, 459–73. doi:10.1364/AO.10.000459
- Benelli, U., Nardi, M., Posarelli, C., Albert, T.G., 2010. Tear osmolarity measurement using the TearLab™ Osmolarity System in the assessment of dry eye treatment effectiveness. *Contact Lens Anterior Eye* 33, 61–67. doi:10.1016/j.clae.2010.01.003
- Berchicci, L., Iuliano, L., Miserocchi, E., Bandello, F., Modorati, G., 2014. Tear osmolarity in ocular graft-versus-host disease. *Cornea* 33, 1252–1256. doi:10.1097/ICO.0000000000000283
- Beyazyıldız, E., Pınarlı, F.A., Beyazyıldız, Ö., Hekimoğlu, E.R., Acar, U., Demir, M.N., Albayrak, A., Kaymaz, F., Sobacı, G., Delibaşı, T., 2014. Efficacy of Topical Mesenchymal Stem Cell Therapy in the Treatment of Experimental Dry Eye Syndrome Model. *Stem Cells Int.* 2014, 1–9. doi:10.1155/2014/250230

- Bianco, P., 2011. Back to the future: Moving beyond “Mesenchymal Stem Cells.” *J. Cell. Biochem.* 112, 1713–1721. doi:10.1002/jcb.23103
- Bianco, P., Robey, P.G., Simmons, P.J., 2008. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell Stem Cell* 2, 313–319. doi:10.1016/j.stem.2008.03.002
- Billingham, R.E., 1966. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect.* 62, 21–78.
- Blanco, T., 2015. Ratonos manipulados genéticamente y sistemas de imagen para una mejor comprensión de la fisiopatología de la córnea. *J. Chem. Inf. Model.* 53, 1689–1699. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Bray, L.J., Heazlewood, C.F., Munster, D.J., Hutmacher, D.W., Atkinson, K., Harkin, D.G., 2014. Immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cell cultures derived from the limbus of human and rabbit corneas. *Cytotherapy* 16, 64–73. doi:10.1016/j.jcyt.2013.07.006
- Bron, A.J., de Paiva, C.S., Chauhan, S.K., Bonini, S., Gabison, E.E., Jain, S., Knop, E., Markoulli, M., Ogawa, Y., Perez, V.L., Uchino, Y., Yokoi, N., Zoukhri, D., Sullivan, D.A., 2017. TFOS DEWS II pathophysiology report. *Ocul. Surf.* 15, 438–510.
- Budoni, M., Fierabracci, A., Luciano, R., Petrini, S., Di Ciommo, V., Muraca, M., 2013. The immunosuppressive effect of mesenchymal stromal cells on B lymphocytes is mediated by membrane vesicles. *Cell Transplant.* 22, 369–379. doi:10.3727/096368911X582769
- Caplan, A., 1991. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 9, 641–50. doi:10.1002/jor.1100090504
- Collin, H.B., Collin, S.P., 2000. The corneal surface of aquatic vertebrates: microstructures with optical and nutritional function? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355, 1171–1176. doi:10.1098/rstb.2000.0661
- Collin, H.B., Collin, S.P., 1996. The fine structure of the cornea of the salamanderfish, *Lepidogalaxias salamandroides* (Lepidogalaxiidae, teleostei). *Cornea* 15, 414–426. doi:10.1097/00003226-199607000-00012
- Conrady, C.D., Joos, Z.P., Patel, B.C.K., 2016. Review: The lacrimal gland and its role in dry eye. *J. Ophthalmol.* 2016. doi:10.1155/2016/7542929
- Cooke, K.R., Kobzik, L., Martin, T.R., Brewer, J., Delmonte, J., Crawford, J.M., Ferrara, J.L., 1996. An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood* 88, 3230–3239. doi:10.1172/JCI12156
- Copelan, E.A., 2006. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* 354, 1813–1826. doi:10.1056/NEJMra052638
- Corrales, R.M., Stern, M.E., De Paiva, C.S., Welch, J., Li, D.-Q., Pflugfelder, S.C., 2006. Desiccating stress stimulates expression of matrix metalloproteinases by the corneal epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 3293–302. doi:10.1167/iovs.05-1382
- Cortés Gabaudan, F., Ureña Bracero, J., 2011. Diccionmed.eusal.es. Diccionario médico-biológico, histórico y etimológico. Ediciones Universidad de Salamanca.
- Coulson-Thomas, V.J., Caterson, B., Kao, W.W.Y., 2013. Transplantation of human umbilical mesenchymal stem cells cures the corneal defects of mucopolysaccharidosis vii mice. *Stem Cells* 31, 2116–2126. doi:10.1002/stem.1481
- Cui, X., Hong, J., Wang, F., Deng, S.X., Yang, Y., Zhu, X., Wu, D., Zhao, Y., Xu, J., 2014. Assessment of Corneal Epithelial Thickness in Dry Eye Patients. *Optom. Vis. Sci.* 91, 1446–1454. doi:10.1097/OPX.0000000000000417
- Chen, H., Chen, Y., Harn, H., Lin, J., Lin, S., 2013. Stem Cell Therapy for Tendon Injury. *Cell Transplant.* 22, 677–684. doi:10.3727/096368912X655118
- Chen, Y., Thompson, D.C., Koppaka, V., Jester, J. V., Vasiliou, V., 2013. Ocular aldehyde

dehydrogenases: Protection against ultraviolet damage and maintenance of transparency for vision. *Prog. Retin. Eye Res.* 33, 28–39. doi:10.1016/j.preteyeres.2012.10.001

- Chen, Y.T., Chen, F.Y.T., Vijmasi, T., Stephens, D.N., Gallup, M., McNamara, N.A., 2013. Pax6 Downregulation Mediates Abnormal Lineage Commitment of the Ocular Surface Epithelium in Aqueous-Deficient Dry Eye Disease. *PLoS One* 8, e77286. doi:10.1371/journal.pone.0077286
- Chen, Y.-T., Li, S., Nikulina, K., Porco, T., Gallup, M., McNamara, N., 2009. Immune profile of squamous metaplasia development in autoimmune regulator-deficient dry eye. *Mol. Vis.* 15, 563–576.
- Chen, Y.-T., Nikulina, K., Lazarev, S., Bahrami, A.F., Noble, L.B., Gallup, M., McNamara, N. a, 2010. Interleukin-1 as a phenotypic immunomodulator in keratinizing squamous metaplasia of the ocular surface in Sjögren's syndrome. *Am. J. Pathol.* 177, 1333–43. doi:10.2353/ajpath.2010.100227
- Chen, Z., Li, Z., Basti, S., Farley, W.J., Pflugfelder, S.C., 2010. Altered Morphology and Function of the Lacrimal Functional Unit in Protein Kinase C alpha Knockout Mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 5592–5600. doi:10.1167/iovs.09-4562
- Chiang, Y., Tsai, C.-H., Kuo, S.-H., Liu, C.-Y., Yao, M., Li, C.-C., Huang, S.-Y., Ko, B.-S., Lin, C.-T., Hou, H.-A., Chou, W.-C., Liu, J.-H., Lin, C.-C., Wu, S.-J., Hsu, S.-C., Chen, Y.-C., Lin, K.-H., Lin, D.-T., Chou, H.-T., Lu, M.-Y., Yang, Y.-L., Chang, H.-H., Liu, M.-C., Liao, X.-W., Wu, J.-K., Chou, S.-C., Cheng, C.-L., Chen, C.-Y., Tsay, W., Tien, H.-F., Tang, J.-L., Chen, Y.-H., 2016. Reduced incidence of interstitial pneumonitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using a modified technique of total body irradiation. *Sci. Rep.* 6, 36730. doi:10.1038/srep36730
- Chieffi, G., Baccari, G.C., Di Matteo, L., D'Istria, M., Minucci, S., Varriale, B., 1996. Cell biology of the harderian gland. *Int. Rev. Cytol.* 168, 1–80.
- Chou, S.H., Lin, S.Z., Day, C.H., Kuo, W.W., Shen, C.Y., Hsieh, D.J.Y., Lin, J.Y., Tsai, F.J., Tsai, C.H., Huang, C.Y., 2013. Mesenchymal stem cell insights: Prospects in hematological transplantation. *Cell Transplant.* 22, 711–721. doi:10.3727/096368912X655172
- Davis, J., Davis, D., Norman, B., Piatigorsky, J., 2008. Gene expression of the mouse corneal crystallin Aldh3a1: activation by Pax6, Oct1, and p300. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49, 1814–1826. doi:10.1167/iovs.07-1057
- Davis, J., Piatigorsky, J., 2011. Overexpression of Pax6 in mouse cornea directly alters corneal epithelial cells: Changes in immune function, vascularization, and differentiation. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 4158–4168. doi:10.1167/iovs.10-6726
- DelMonte, D.W., Kim, T., 2011. Anatomy and physiology of the cornea and related structures. *J Cataract Refract Surg* 37, 588–598. doi:10.1016/j.jcrs.2010.12.037
- Dhouailly, D., Pearton, D.J., Michon, F., 2014. The vertebrate corneal epithelium: From early specification to constant renewal. *Dev. Dyn.* 243, 1226–1241. doi:10.1002/dvdy.24179
- Di Tommaso, C., Valamanesh, F., Miller, F., Furrer, P., Rodriguez-Aller, M., Behar-Cohen, F., Gurny, R., Moeller, M., 2012. A Novel Cyclosporin A Aqueous Formulation for Dry Eye Treatment: In Vitro and In Vivo Evaluation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 2292–2299. doi:10.1167/iovs.11-8829
- Dilly, P.N., 1994. Structure and function of the tear film. *Adv Exp Med Biol* 350, 239–47.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–7. doi:10.1080/14653240600855905
- Dua, H.S., Faraj, L.A., Said, D.G., Gray, T., Lowe, J., 2013. Human corneal anatomy redefined: A novel pre-descemet's layer (Dua's Layer). *Ophthalmology* 120, 1778–1785.

doi:10.1016/j.ophttha.2013.01.018

- Dursun, D., Wang, M., Monroy, D., Li, D.Q., Lokeshwar, B.L., Stern, M.E., Pflugfelder, S.C., 2002. A mouse model of keratoconjunctivitis sicca. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 632–638.
- Eperjesi, F., Aujla, M., Bartlett, H., 2012. Reproducibility and repeatability of the OcuSense TearLab™ osmometer. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 250, 1201–1205. doi:10.1007/s00417-012-1961-4
- Erices, A., Conget, P., Minguell, J.J., 2000. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br. J. Haematol.* 109, 235–242. doi:10.1046/j.1365-2141.2000.01986.x
- Evans, M.J., Kaufman, M.H., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156. doi:10.1038/292154a0
- Farjo, A., McDermott, M., Soong, H., 2008. Corneal anatomy, physiology, and wound healing., in: Yanoff, M., Duker, J. (Eds.), *Ophthalmology*, 3rd Ed. pp. 203–208. doi:10.1016/B978-0-323-04332-8.00025-1
- Farris, R., Stuchell, R., Mandel, I., 1986. Tear osmolarity variation in the Dry Eye. *Trans Am Ophthalmol Soc* 84, 250–268.
- Ferrara, J.L., Levine, J.E., Reddy, P., Holler, E., 2009. Graft-versus-host disease. *Lancet* 373, 1550–1561. doi:10.1016/S0140-6736(09)60237-3
- Fukumoto, T., Sperling, J.W., Sanyal, A., Fitzsimmons, J.S., Reinholz, G.G., Conover, C.A., O'Driscoll, S.W., 2003. Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor- $\beta$ 1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthr. Cartil.* 11, 55–64. doi:10.1053/joca.2002.0869
- Garg, S., Boerma, M., Wang, J., Fu, Q., Loose, D.S., Kumar, K.S., Hauer-Jensen, M., 2010. Influence of sublethal total-body irradiation on immune cell populations in the intestinal mucosa. *Radiat. Res.* 173, 469–78. doi:10.1667/RR1742.1
- Gehring, W.J., Ikeo, K., 1999. Pax 6: Mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet.* 15, 371–377. doi:10.1016/S0168-9525(99)01776-X
- Gilbard, J.P., 1994. Human tear film & electrolyte concentrations in health and dry-eye disease. *Int Ophthalmol Clin* 34, 27–36.
- Gilbard, J.P., Carter, J.B., Sang, D.N., Refojo, M.F., Hanninen, L.A., Kenyon, K.R., 1984. Morphologic Effect of Hyperosmolarity on Rabbit Corneal Epithelium. *Ophthalmology* 91, 1205–1212.
- Gilbard, J.P., Hanninen, L.A., Rothman, R.C., Kenyon, K.R., 1987. Lacrimal Gland, Cornea, and Tear Film in the Nzb/nzw-F1 Hybrid Mouse. *Curr. Eye Res.* 6, 1237–1248. doi:10.3109/02713688709025234
- Gipson, I.K., 2007. The Ocular Surface: The Challenge to Enable and Protect Vision. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 4383–4389. doi:10.1167/iops.07
- Goldman, J.N., Benedek, G.B., 1967. The relationship between morphology and transparency in the nonswelling cornea! stroma of the shark. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 6, 574–600.
- Gonzalez-Andrades, M., 2011. Generación de córneas humanas artificiales por Ingeniería Tisular para su utilización como medicamentos de Terapias Avanzadas. Universidad de Granada.
- González-Andrades, M., Garzón, I., Gascón, M.I., Muñoz-Ávila, J.I., Sánchez-Quevedo, M.C., Campos, A., Alaminos, M., 2009. Sequential development of intercellular junctions in bioengineered human corneas. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 3, 442–449. doi:10.1002/term.178
- Goto, E., Yagi, Y., Matsumoto, Y., Tsubota, K., 2002. Impaired functional visual acuity of dry eye patients. *Am. J. Ophthalmol.* 133, 181–186. doi:10.1016/S0002-9394(01)01365-4

- Gyurkocza, B., Sandmaier, B.M., 2014. Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation : one size does not fit all. *Blood* 124, 344–353. doi:10.1182/blood-2014-02-514778.
- Haeckel, E., 1877. *Anthropogenie oder Entwicklungsgeschichte des Menschen*, 3rd ed. Wilhelm Engelmann; Leipzig.
- Hashmani, K., Branch, M., Sidney, L., Dhillon, P., Verma, M., McIntosh, O., Hopkinson, A., Dua, H., 2013. Characterization of corneal stromal stem cells with the potential for epithelial transdifferentiation. *Stem Cell Res. Ther.* 4, 75. doi:10.1186/scrt226
- Hassan, A.S., Clouthier, S.G., Ferrara, J.L.M., Stepan, A., Mian, S.I., Ahmad, A.Z., Elner, V.M., 2005. Lacrimal gland involvement in graft-versus-host disease: a murine model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 2692–7. doi:10.1167/iovs.05-0040
- Hayashi, S., Osawa, T., Tohyama, K., 2002. Comparative observations on corneas, with special reference to Bowman's layer and Descemet's membrane in mammals and amphibians. *J. Morphol.* 254, 247–258. doi:10.1002/jmor.10030
- He, Z., Hua, J., Song, Z., 2014. Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Tissue Injury via Secretion of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Stimulated Protein/Gene 6. *Stem Cells Int.* 2014, 761091. doi:10.1155/2014/761091
- Henriksson, J.T., McDermott, A.M., Bergmanson, J.P.G., 2009. Dimensions and Morphology of the Cornea in Three Strains of Mice. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 3648–3654. doi:10.1167/iovs.08-2941
- Herretes, S., Ross, D.B., Duffort, S., Barreras, H., Yaohong, T., Saeed, A.M., Murillo, J.C., Komanduri, K. V., Levy, R.B., Perez, V.L., 2015. Recruitment of donor T cells to the eyes during ocular GVHD in recipients of MHC-matched allogeneic hematopoietic stem cell transplants. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56, 2348–2357. doi:10.1167/iovs.14-15630
- Hill, G.R., Crawford, J.M., Cooke, K.R., Brinson, Y.S., Pan, L., Ferrara, J.L., 1997. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood* 90, 3204–3213.
- Holt, W. s., Kinoshita, J.H., 1973. The Soluble Proteins of the Cornea. *Investig. Ophthalmol.* 12, 114–126.
- Hoole, S., 1807. *The select works of Antony van Leeuwenhoek, containing his microscopical discoveries in many of the works of nature.* Londres.
- Hori, J., Vega, J.L., Masli, S., 2010. Review of ocular immune privilege in the year 2010: modifying the immune privilege of the eye. *Ocul. Immunol. Inflamm.* 18, 325–33. doi:10.3109/09273948.2010.512696
- Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krause, D.S., Keating, A., 2005. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7, 393–395. doi:10.1080/14653240500319234
- Huet, E., Vallée, B., Delbé, J., Mourah, S., Prulière-Escabasse, V., Tremouilleres, M., Kadomatsu, K., Doan, S., Baudouin, C., Menashi, S., Gabison, E.E., 2011. EMMPRIN modulates epithelial barrier function through a MMP-mediated occludin cleavage: implications in dry eye disease. *Am. J. Pathol.* 179, 1278–86. doi:10.1016/j.ajpath.2011.05.036
- Inatomi, T., Spurr-Michaud, S., Tisdale, A.S., Gipson, I.K., 1995. Human corneal and conjunctival epithelia express MUC1 mucin. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36, 1818–1827.
- Jacobs, R., Tran, U., Chen, H., Kassim, A., Engelhardt, B.G., Greer, J.P., Goodman, S.G., Clifton, C., Lucid, C., Vaughan, L.A., Savani, B.N., Jagasia, M., 2012. Prevalence and risk factors associated with development of ocular GVHD defined by NIH consensus criteria. *Bone Marrow Transplant.* 47, 1470–1473. doi:10.1038/bmt.2012.56

- Jankowski, R.J., Deasy, B.M., Huard, J., 2002. Muscle-derived stem cells 1. *Gene Ther.* 9, 642–647. doi:10.1038/sj/gt/3301719
- Jester, J. V., Moller-Pedersen, T., Huang, J., Sax, C.M., Kays, W.T., Cavangh, H.D., Petroll, W.M., Piatigorsky, J., 1999. The cellular basis of corneal transparency: evidence for “corneal crystallins.” *J. Cell Sci.* 112 ( Pt 5, 613–622.
- Jester, J. V., 2008. Corneal crystallins and the development of cellular transparency. *Semin. Cell Dev. Biol.* 19, 82–93. doi:10.1016/j.semdb.2007.09.015
- Jiang, X., Norman, M., Li, X., 2003. Use of an array technology for profiling and comparing transcription factors activated by TNF $\alpha$  and PMA in HeLa cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1642, 1–8. doi:10.1016/S0167-4889(03)00080-6
- Jones, L., Downie, L.E., Korb, D., Benitez-del-Castillo, J.M., Dana, R., Deng, S.X., Dong, P.N., Geerling, G., Hida, R.Y., Liu, Y., Seo, K.Y., Tauber, J., Wakamatsu, T.H., Xu, J., Wolffsohn, J.S., Craig, J.P., 2017. TFOS DEWS II Management and Therapy Report. *Ocul. Surf.* doi:10.1016/j.jtos.2017.05.006
- Katikireddy, K.R., Dana, R., Jurkunas, U. V, 2014. Differentiation potential of limbal fibroblasts and bone marrow mesenchymal stem cells to corneal epithelial cells. *Stem Cells* 32, 717–729. doi:10.1002/stem.633
- Khanal, S., Tomlinson, A., 2012. Tear physiology in dry eye associated with chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 47, 115–119. doi:10.1038/bmt.2011.36
- Knickelbein, J.E., Buela, K.A., Hendricks, R.L., 2014. Antigen-presenting cells are stratified within normal human corneas and are rapidly mobilized during ex vivo viral infection. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 1118–1123. doi:10.1167/iovs.13-13523
- Ko, J.H., Lee, H.J., Jeong, H.J., Kim, M.K., Wee, W.R., Yoon, S., Choi, H., Prockop, D.J., Oh, J.Y., 2016. Mesenchymal stem/stromal cells precondition lung monocytes/macrophages to produce tolerance against allo- and autoimmunity in the eye. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 158–163. doi:10.1073/pnas.1522905113
- Lee, J.Y., Jeong, H.J., Kim, M.K., Wee, W.R., 2014. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells affect immunologic profiling of interleukin-17-secreting cells in a chemical burn mouse model. *Korean J.Ophthalmol.* 28, 246–256. doi:10.3341/kjo.2014.28.3.246
- Lee, M.J., Kim, D.H., Ryu, J.S., Ko, A.Y., Ko, J.H., Kim, M.K., Wee, W.R., Khwarg, S.I., Oh, J.Y., 2015a. Topical TSG-6 administration protects the ocular surface in two mouse models of inflammation-related dry eye. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56, 5175–5181. doi:10.1167/iovs.14-16307
- Lee, M.J., Ko, A.Y., Ko, J.H., Lee, H.J., Kim, M.K., Wee, W.R., Khwarg, S.I., Oh, J.Y., 2015b. Mesenchymal stem/stromal cells protect the ocular surface by suppressing inflammation in an experimental dry eye. *Mol. Ther.* 23, 139–46. doi:10.1038/mt.2014.159
- Lee, R.H., Yu, J.M., Foskett, A.M., Peltier, G., Reneau, J.C., Bazhanov, N., Oh, J.Y., Prockop, D.J., 2014. TSG-6 as a biomarker to predict efficacy of human mesenchymal stem/progenitor cells (hMSCs) in modulating sterile inflammation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 16766–16771. doi:10.1073/pnas.1416121111
- Lemp, M.A., Baudouin, C., Baum, J., Dogru, M., Foulks, G.N., Kinoshita, S., Laibson, P., McCulley, J., Murube, J., Pflugfelder, S.C., Rolando, M., Toda, I., 2007a. Definición y clasificación de la enfermedad del ojo seco: Informe del Subcomité de definición y clasificación del Taller internacional sobre ojo seco (2007). *Ocul. Surf.* 5, 75–92.
- Lemp, M.A., Baudouin, C., Baum, J., Dogru, M., Foulks, G.N., Kinoshita, S., Laibson, P., McCulley, J., Murube, J., Pflugfelder, S.C., Rolando, M., Toda, I., 2007b. The definition and classification of dry eye disease: Report of the Definition and Classification Subcommittee of the international Dry Eye WorkShop (2007). *Ocul. Surf.* 5, 75–92. doi:10.1016/S1542-0124(12)70081-2

- Lemp, M.A., Bron, A.J., Baudouin, C., Bentez Del Castillo, J.M., Geffen, D., Tauber, J., Foulks, G.N., Pepose, J.S., Sullivan, B.D., 2011. Tear osmolarity in the diagnosis and management of dry eye disease. *Am. J. Ophthalmol.* 151, 792–798. doi:10.1016/j.ajo.2010.10.032
- Li, D.-Q., Chen, Z., Song, X.J., Luo, L., Pflugfelder, S.C., 2004. Stimulation of Matrix Metalloproteinases by Hyperosmolarity via a JNK Pathway in Human Corneal Epithelial Cells. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 45, 4302. doi:10.1167/iovs.04-0299
- Li, D.Q., Luo, L., Chen, Z., Kim, H.S., Song, X.J., Pflugfelder, S.C., 2006. JNK and ERK MAP kinases mediate induction of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-8 following hyperosmolar stress in human limbal epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 82, 588–596. doi:10.1016/j.exer.2005.08.019
- Li, Q., Weng, J., Mohan, R.R., Bennett, G.L., Schwall, R., Wang, Z.F., Tabor, K., Kim, J., Hargrave, S., Cuevas, K.H., Wilson, S.E., 1996. Hepatocyte growth factor and hepatocyte growth factor receptor in the lacrimal gland, tears, and cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37, 727–739.
- Li, S., Gallup, M., Chen, Y.T., McNamara, N.A., 2010. Molecular mechanism of proinflammatory Cytokine-mediated squamous metaplasia in human corneal epithelial cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 2466–2475. doi:10.1167/iovs.09-4677
- Li, S., Nikulina, K., DeVoss, J., Wu, A.J., Strauss, E.C., Anderson, M.S., McNamara, N.A., 2008. Small proline-rich protein 1B (SPRR1B) is a biomarker for squamous metaplasia in dry eye disease. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 34–41. doi:10.1167/iovs.07-0685
- Li, X., Taylor, S., Zegarelli, B., Shen, S., O'Rourke, J., Cone, R.E., 2004. The induction of splenic suppressor T cells through an immune-privileged site requires an intact sympathetic nervous system. *J. Neuroimmunol.* 153, 40–49. doi:10.1016/j.jneuroim.2004.04.008
- Lin, H., Qu, Y., Geng, Z., Li, C., Wu, H., Dong, N., Liu, Z., Li, W., 2014. Air exposure induced characteristics of dry eye in conjunctival tissue culture. *PLoS One* 9, e87368. doi:10.1371/journal.pone.0087368
- Lin, K.-J., Loi, M.-X., Lien, G.-S., Cheng, C.-F., Pao, H.-Y., Chang, Y.-C., Ji, A.T.-Q., Ho, J.H.-C., 2013. Topical administration of orbital fat-derived stem cells promotes corneal tissue regeneration. *Stem Cell Res. Ther.* 4, 72. doi:10.1186/scrt223
- Lin, Z., Liu, X., Zhou, T., Wang, Y., Bai, L., He, H., Liu, Z., 2011. A mouse dry eye model induced by topical administration of benzalkonium chloride. *Mol. Vis.* 17, 257–264.
- Lindner, U., Kramer, J., Rohwedel, J., Schlenke, P., 2010. Mesenchymal stem or stromal cells: Toward a better understanding of their biology? *Transfus. Med. Hemotherapy* 37, 75–83. doi:10.1159/000290897
- Liu, H., Zhang, J., Liu, C.Y., Wang, I.J., Sieber, M., Chang, J., Jester, J. V., Kao, W.W.Y., 2010. Cell therapy of congenital corneal diseases with umbilical mesenchymal stem cells: Lumican null mice. *PLoS One* 5. doi:10.1371/journal.pone.0010707
- Lorenz, E., Uphoff, D., Reid, T.R., Shelton, E., 1951. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J. Natl. Cancer Inst.* 12, 197–201. doi:10.1093/jnci/12.1.197
- Lorenzo, R., 2012. Estudio del efecto de las células madre mesenquimales sobre el segmento anterior del ojo en un modelo experimental de enfermedad de injerto contra huésped ocular. Universidad de Salamanca.
- Lorenzo, R., Perez-Simon, J.A., Caballero-Velazquez, T., Flores, T., Carrancio, S., Herrero, C., Blanco, B.B., Gutierrez-Cosio, S., Canete-Campos, C., Cruz Gonzalez, F., San-Miguel, J.F., Hernandez-Galilea, E., Sanchez-Abarca, L.I., 2011. Limbus Damage in Ocular Graft-versus-Host Disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 17, 270–273. doi:10.1016/j.bbmt.2010.08.008
- Luo, L., Li, D.-Q., Corrales, R.M., Pflugfelder, S.C., 2005. Hyperosmolar saline is a proinflammatory stress on the mouse ocular surface. *Eye Contact Lens* 31, 186–193. doi:10.1097/01.ICL.0000162759.79740.46

- Luo, L., Li, D.Q., Doshi, A., Farley, W., Corrales, R.M., Pflugfelder, S.C., 2004. Experimental dry eye stimulates production of inflammatory cytokines and MMP-9 and activates MAPK signaling pathways on the ocular surface. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 4293–4301. doi:10.1167/iovs.03-1145
- Luo, L., Li, D.-Q., Pflugfelder, S.C., 2007. Hyperosmolarity-induced apoptosis in human corneal epithelial cells is mediated by cytochrome c and MAPK pathways. *Cornea* 26, 452–460. doi:10.1097/ICO.0b013e318030d259
- Maehle, A.-H., 2011. Ambiguous cells: the emergence of the stem cell concept in the nineteenth and twentieth centuries. *Notes Rec. R. Soc.* 65, 359–378. doi:10.1098/rsnr.2011.0023
- Mannick, J.A., Lochte, H.L., Ashley, C.A., Thomas, E.D., Ferrebee, J.W., 1960. Autografts of bone marrow in dogs after lethal total-body radiation. *Blood* 15, 255–66.
- Martín, E., 2017. Estudio de la capacidad terapéutica de las células mesenquimales administradas por vía subconjuntival en el tratamiento de la enfermedad injerto contra receptor ocular en un modelo murino optimizado. Universidad de Salamanca.
- Martínez-Carrasco, R., Sánchez-Abarca, L.I., Nieto-Gómez, C., Martín García, E., Ramos, T.L., Velasco, A., Sánchez-Guijo, F., Aijón, J., Hernández-Galilea, E., 2017. Assessment of dry eye in a GVHD murine model: Approximation through tear osmolarity measurement. *Exp. Eye Res.* 154, 64–69. doi:10.1016/j.exer.2016.11.004
- Massingale, M.L., Li, X., Vallabhajosyula, M., Chen, D., Wei, Y., Asbell, P.A., 2009. Analysis of inflammatory cytokines in the tears of dry eye patients. *Cornea* 28, 1023–1027. doi:10.1097/ICO.0b013e3181a16578
- Maurice, D.M., 1957. The structure and transparency of the cornea. *J. Physiol.* 136, 263–286.
- Mauris, J., Dieckow, J., Schob, S., Pulli, B., Hatton, M.P., Jeong, S., Bauskar, a, Gabison, E., Nowak, R., Argüeso, P., 2015. Loss of CD147 results in impaired epithelial cell differentiation and malformation of the meibomian gland. *Cell Death Dis.* 6, e1726. doi:10.1038/cddis.2015.98
- Mauris, J., Woodward, A.M., Cao, Z., Panjwani, N., Argüeso, P., 2014. Molecular basis for MMP9 induction and disruption of epithelial cell-cell contacts by galectin-3. *J. Cell Sci.* 127, 3141–8. doi:10.1242/jcs.148510
- McNamara, N.A., Gallup, M., Porco, T.C., 2014. Establishing PAX6 as a biomarker to detect early loss of ocular phenotype in human patients with Sjögren’s syndrome. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 7079–84. doi:10.1167/iovs.14-14828
- Medawar, P.B., 1948. Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br. J. Exp. Pathol.* 129, 58–69.
- Medawar, P.B., 1944. The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits: A report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council. *J. Anat.* 78, 176–99.
- Meek, K.M., Knupp, C., 2015. Corneal structure and transparency. *Prog. Retin. Eye Res.* 49, 1–16. doi:10.1016/j.preteyeres.2015.07.001
- Mestas, J., Hughes, C.C.W., 2004. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J. Immunol.* 172, 2731–2738. doi:10.4049/jimmunol.172.5.2731
- Milner, C.M., Day, A.J., 2003. TSG-6: a multifunctional protein associated with inflammation. *J. Cell Sci.* 116, 1863–73. doi:10.1242/jcs.00407
- Minguell, J.J., Erices, A., 2006. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 231, 39–49.
- Mishima, S., 1965. Some Physiological Aspects of the Precorneal Tear Film. *Arch. Ophthalmol.* 73, 233–241.

- Mittal, S.K., Omoto, M., Amouzegar, A., Sahu, A., Rezazadeh, A., Katikireddy, K.R., Shah, D.I., Sahu, S.K., Chauhan, S.K., 2016. Restoration of Corneal Transparency by Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Reports* 7, 583–590. doi:10.1016/j.stemcr.2016.09.001
- Mohty, M., Blaise, D., Faucher, C., Vey, N., Bouabdallah, R., Stoppa, A., Viret, F., Gravis, G., Olive, D., 2005. Brief report Inflammatory cytokines and acute graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 106, 4407–4411. doi:10.1182/blood-2005-07-2919.Supported
- Munir, S.Z., Aylward, J., 2017. A Review of Ocular Graft-Versus-Host Disease. *Optom. Vis. Sci.* 94, 545–555. doi:10.1097/OPX.0000000000001071
- Murube, J., 2009. Basal, Reflex, and Psycho-emotional Tears. *Ocul. Surf.* 7. doi:10.1016/S1542-0124(12)70296-3
- Muzio, G., Maggiora, M., Paiuzzi, E., Oraldi, M., Canuto, R.A., 2012. Aldehyde dehydrogenases and cell proliferation. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 735–746. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.033
- Na, K.S., Yoo, Y.S., Hwang, K.Y., Mok, J.W., Joo, C.K., 2015. Tear osmolarity and ocular surface parameters as diagnostic markers of ocular graft-versus-host disease. *Am. J. Ophthalmol.* 160, 143–149.e1. doi:10.1016/j.ajo.2015.04.002
- Nelson, J.D., Craig, J.P., Akpek, E., Azar, D.T., Belmonte, C., Bron, A.J., Clayton, J.A., Dogru, M., Dua, H.S., Foulks, G.N., Gomes, J.A.P., Hammitt, K.M., Holopainen, J., Jones, L., Joo, C.K., Liu, Z., Nichols, J.J., Nichols, K.K., Novack, G.D., Sangwan, V., Stapleton, F.J., Tomlinson, A., Tsubota, K., Willcox, M.D.P., Wolffsohn, J.S., Sullivan, D.A., 2017. TFOS DEWS II Introduction. *Ocul. Surf.* 15, 269–275. doi:10.1016/j.jtos.2017.05.005
- Niederhorn, J.Y., 2006. See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege. *Nat. Immunol.* 7, 354–359. doi:10.1038/ni1328
- Ogawa, Y., Kuwana, M., 2003. Dry Eye as a Major Complication Associated with Chronic Graft-Versus-Host Disease after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Cornea* 22, S19–S27. doi:10.1097/00003226-200310001-00004
- Ogawa, Y., Shimmura, S., Dogru, M., Tsubota, K., 2010. Immune processes and pathogenic fibrosis in ocular chronic graft-versus-host disease and clinical manifestations after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cornea* 29 Suppl 1, S68–77. doi:10.1097/ICO.0b013e3181ea9a6b
- Ogawa, Y., Yamazaki, K., Kuwana, M., Mashima, Y., Nakamura, Y., Ishida, S., Toda, I., Oguchi, Y., Tsubota, K., Okamoto, S., Kawakami, Y., 2001. A significant role of stromal fibroblasts in rapidly progressive dry eye in patients with chronic GVHD. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 111–9.
- Oh, J.Y., Kim, M.K., Ko, J.H., Lee, H.J., Lee, J.H., Wee, W.R., 2009. Rat allogeneic mesenchymal stem cells did not prolong the survival of corneal xenograft in a pig-to-rat model. *Vet. Ophthalmol.* 12, 35–40. doi:10.1111/j.1463-5224.2009.00724.x
- Oh, J.Y., Ko, J.H., Kim, M.K., Wee, W.R., 2014. Effects of mesenchymal stem/stromal cells on cultures of corneal epithelial progenitor cells with ethanol injury. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 7628–7635. doi:10.1167/iovs.14-15424
- Oh, J.Y., Lee, R.H., Yu, J.M., Ko, J.H., Lee, H.J., Ko, A.Y., Roddy, G.W., Prockop, D.J., 2012. Intravenous Mesenchymal Stem Cells Prevented Rejection of Allogeneic Corneal Transplants by Aborting the Early Inflammatory Response. *Mol. Ther.* 20, 2143–2152. doi:10.1038/mt.2012.165
- Ortiz, L. a, Dutreil, M., Fattman, C., Pandey, A.C., Torres, G., Go, K., Phinney, D.G., 2007. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 11002–11007. doi:10.1073/pnas.0704421104
- Ouyang, H., Xue, Y., Lin, Y., Zhang, X., Xi, L., Patel, S., Cai, H., Luo, J., Zhang, M., Zhang, M., Yang, Y., Li, G., Li, H., Jiang, W., Yeh, E., Lin, J., Pei, M., Zhu, J., Cao, G., Zhang, L., Yu, B., Chen, S.,

- Fu, X.-D., Liu, Y., Zhang, K., 2014. WNT7A and PAX6 define corneal epithelium homeostasis and pathogenesis. *Nature* 511, 358–61. doi:10.1038/nature13465
- Ouyang, J., Shen, Y.C., Yeh, L.K., Li, W., Coyle, B.M., Liu, C.Y., Fini, M.E., 2006. Pax6 overexpression suppresses cell proliferation and retards the cell cycle in corneal epithelial cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 2397–2407. doi:10.1167/iovs.05-1083
- Owen, M., Friedenstein, A.J., 1988. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found. Symp.* 136, 42–60.
- Parra, A., Gonzalez-Gonzalez, O., Gallar, J., Belmonte, C., 2014. Tear fluid hyperosmolality increases nerve impulse activity of cold thermoreceptor endings of the cornea. *Pain* 155, 1481–1491. doi:10.1016/j.pain.2014.04.025
- Pelegriño, F.S.A., Pflugfelder, S.C., De Paiva, C.S., 2012. Low humidity environmental challenge causes barrier disruption and cornification of the mouse corneal epithelium via a c-jun N-terminal kinase 2 (JNK2) pathway. *Exp. Eye Res.* 94, 150–156. doi:10.1016/j.exer.2011.11.022
- Peng, L., Jia, Z., Yin, X., Zhang, X., Liu, Y., Chen, P., Ma, K., Zhou, C., 2008. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Cartilage, and Adipose Tissue. *Stem Cells Dev.* 17, 761–774. doi:10.1089/scd.2007.0217
- Pflugfelder, S., Liu, Z., Munroy, D., Li, D., Carvajal, M., Price-Schiavi, S., Idris, N., Solomon, A., Perez, A., Carraway, K., 2000. Detection of sialomucin complex (MUC4) in human ocular surface epithelium and tear fluid. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 1316–1326.
- Pflugfelder, S.C., 2011. Tear dysfunction and the cornea: LXVIII Edward Jackson memorial lecture. *Am. J. Ophthalmol.* 152, 900–909.e1. doi:10.1016/j.ajo.2011.08.023
- Pflugfelder, S.C., Farley, W., Luo, L., Chen, L.Z., de Paiva, C.S., Olmos, L.C., Li, D.-Q., Fini, M.E., 2005. Matrix Metalloproteinase-9 Knockout Confers Resistance to Corneal Epithelial Barrier Disruption in Experimental Dry Eye. *Am. J. Pathol.* 166, 61–71. doi:10.1016/S0002-9440(10)62232-8
- Piatigorsky, J., 1998. Gene sharing in lens and cornea: Facts and implications. *Prog. Retin. Eye Res.* 17, 145–174. doi:10.1016/S1350-9462(97)00004-9
- Pınarlı, F.A., Okten, G., Beden, U., Fışgın, T., Kefeli, M., Kara, N., Duru, F., Tomak, L., 2014. Keratinocyte growth factor-2 and autologous serum potentiate the regenerative effect of mesenchymal stem cells in cornea damage in rats. *Int. J. Ophthalmol.* 7, 211–9. doi:10.3980/j.issn.2222-3959.2014.02.05
- Polisetty, N., Fatima, A., Madhira, S.L., Sangwan, V.S., Vemuganti, G.K., 2008. Mesenchymal cells from limbal stroma of human eye. *Mol. Vis.* 14, 431–42. doi:v14/a53 [pii]
- Quine, W.E., 1896. The remedial application of bone marrow. *J. Am. Med. Assoc.* 26, 1012–1013.
- Rasmusson, I., 2006. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res.* 312, 2169–2179. doi:10.1016/j.yexcr.2006.03.019
- Rasmusson, I., Ringdén, O., Sundberg, B., Le Blanc, K., 2005. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp. Cell Res.* 305, 33–41. doi:10.1016/j.yexcr.2004.12.013
- Roddy, G.W., Oh, J.Y., Lee, R.H., Bartosh, T.J., Ylostalo, J., Coble, K., Rosa, R.H., Prockop, D.J., 2011. Action at a distance: Systemically administered adult stem/progenitor cells (MSCs) reduce inflammatory damage to the cornea without engraftment and primarily by secretion of TNF- $\alpha$  stimulated gene/protein 6. *Stem Cells* 29, 1572–1579. doi:10.1002/stem.708
- Rohaina, C.M., Then, K.Y., Ng, A.M.H., Wan Abdul Halim, W.H., Zahidin, A.Z.M., Saim, A., Idrus, R.B.H., 2014. Reconstruction of limbal stem cell deficient corneal surface with induced human bone marrow mesenchymal stem cells on amniotic membrane. *Transl. Res.* 163, 200–210.

doi:10.1016/j.trsl.2013.11.004

- Rojas, B., Cuhna, R., Zafirakis, P., Ramirez, J.M., Lizan-García, M., Zhao, T., Foster, C.S., 2005. Cell populations and adhesion molecules expression in conjunctiva before and after bone marrow transplantation. *Exp. Eye Res.* 81, 313–325. doi:10.1016/j.exer.2005.02.004
- Rolando, M., Zierhut, M., 2001. The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease. *Surv. Ophthalmol.* 45 Suppl 2, S203–S210. doi:10.1016/S0039-6257(00)00203-4
- Ross, M.H., Pawlina, W., 2015. *Histología: Texto y Atlas.*, 7<sup>a</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins. Wolters Kluwer Health.
- Sakai, T., 1989. Major ocular glands (Harderian gland and lacrimal gland) of the musk shrew (*Suncus murinus*) with a review on the comparative anatomy and histology of the mammalian lacrimal glands. *J. Morphol.* 201, 39–57. doi:10.1002/jmor.1052010105
- Sáles, C.S., Johnston, L.J., Ta, C.N., 2011. Long-term clinical course of dry eye in patients with chronic graft-versus-host disease referred for eye examination. *Cornea* 30, 143–149. doi:10.1097/ICO.0b013e3181e9b3bf
- Sanchez-Abarca, L.I., Hernandez-Galilea, E., Lorenzo, R., Herrero, C., Velasco, A., Carrancio, S., Caballero-Velazquez, T., Rodriguez-Barbosa, J.I., Parrilla, M., Canizo, C. Del, Miguel, J.S., Aijon, J., Perez-Simon, J.A., 2015. Human bone marrow stromal cells differentiate into corneal tissue and prevent ocular graft-versus-host disease in mice. - *Cell Transplant.* 2015 Feb 18. 1–50. doi:10.3727/096368911X637399
- Sart, S., Ma, T., Li, Y., 2014. Preconditioning Stem Cells for *In Vivo* Delivery. *Biores. Open Access* 3, 137–149. doi:10.1089/biores.2014.0012
- Schaeffer, A.J., Murray, J.D., 1950. Amino acid composition of the lens proteins of the bovine eye. *Arch. Ophthalmol.* 43, 1056–64.
- Schargus, M., Meyer-ter-Vehn, T., Menrath, J., Grigoleit, G.U., Geerling, G., 2015. 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* 34, 911–6. doi:10.1097/ICO.0000000000000494
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108. doi:10.1038/nprot.2008.73
- Schroeder, M. a, DiPersio, J.F., 2011. Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations. *Dis. Model. Mech.* 4, 318–33. doi:10.1242/dmm.006668
- Schwarte, S., Bremer, M., Fruehauf, J., Sorge, Y., Skubich, S., Hoffmann, M.W., 2007. Radiation protocols determine acute graft-versus-host disease incidence after allogeneic bone marrow transplantation in murine models. *Int. J. Radiat. Biol.* 83, 625–636. doi:10.1080/09553000701534572
- Schwarte, S., Hoffmann, M.W., 2005. Influence of radiation protocols on graft-vs-host disease incidence after bone-marrow transplantation in experimental models. *Methods Mol. Med.* 109, 445–58.
- Shalom-Feuerstein, R., Serror, L., De La Forest Divonne, S., Petit, I., Aberdam, E., Camargo, L., Damour, O., Vigouroux, C., Solomon, A., Gaggioli, C., Itskovitz-Eldor, J., Ahmad, S., Aberdam, D., 2012. Pluripotent stem cell model reveals essential roles for miR-450b-5p and miR-184 in embryonic corneal lineage specification. *Stem Cells* 30, 898–909. doi:10.1002/stem.1068
- Shi, Y., Hu, G., Su, J., Li, W., Chen, Q., Shou, P., Xu, C., Chen, X., Huang, Y., Zhu, Z., Huang, X., Han, X., Xie, N., Ren, G., 2010. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res.* 20, 510–518. doi:10.1038/cr.2010.44
- Shikari, H., Antin, J.H., Dana, R., 2013. Ocular graft-versus-host disease: A review. *Surv. Ophthalmol.* 58, 233–251. doi:10.1016/j.survophthal.2012.08.004

- Shlomchik, W.D., 2007. Graft-versus-host disease. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 340–352. doi:10.1038/nri2000
- Sivak, J.M., Fini, M.E., 2002. MMPs in the eye: Emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. *Prog. Retin. Eye Res.* 21, 1–14. doi:10.1016/S1350-9462(01)00015-5
- Solomon, A., Dursun, D., Liu, Z., Xie, Y., Macri, A., Pflugfelder, S.C., 2001. Pro- and anti-inflammatory forms of interleukin-1 in the tear fluid and conjunctiva of patients with dry-eye disease. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 2283–2292.
- Spierings, E., 2014. Minor histocompatibility antigens: Past, present, and future. *Tissue Antigens* 84, 374–360. doi:10.1111/tan.12445
- Squillaro, T., Peluso, G., Galderisi, U., 2016. Review Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells : An Update. *Cell Transplant.* 25, 829–48. doi:10.3727/096368915X689622
- Stagos, D., Chen, Y., Cantore, M., Jester, J. V., Vasiliou, V., 2010. Corneal aldehyde dehydrogenases: multiple functions and novel nuclear localization. *Brain Res. Bull.* 81, 211–8. doi:10.1016/j.brainresbull.2009.08.017
- Stevenson, W., Chen, Y., Lee, S., Lee, H.S., Hua, J., Dohlman, T., Shiang, T., Dana, R., 2014. Extraorbital lacrimal gland excision: A reproducible model of severe aqueous tear-deficient dry eye disease. *Cornea* 33, 1336–1341. doi:10.1097/ICO.0000000000000264
- Stewart, P., Chen, Z., Farley, W., Olmos, L., Pflugfelder, S.C., 2005. Effect of experimental dry eye on tear sodium concentration in the mouse. *Eye Contact Lens* 31, 175–178. doi:10.1097/01.ICL.0000161705.19602.C9
- Sugrue, S.P., Zieske, J.D., 1997. ZO1 in corneal epithelium: association to the zonula occludens and adherens junctions. *Exp. Eye Res.* 64, 11–20. doi:10.1006/exer.1996.0175
- Sun, Y.-C., Chai, X., Inamoto, Y., Pidala, J., Martin, P.J., Flowers, M.E.D., Shen, T.T., Lee, S.J., Jagasia, M., 2015. Impact of Ocular Chronic Graft-versus-Host Disease on Quality of Life. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 21, 1687–1691. doi:10.1016/j.bbmt.2015.05.020
- Suzuki, M., Massingale, M.L., Ye, F., Godbold, J., Elfassy, T., Vallabhajosyula, M., Asbell, P.A., 2010. Tear Osmolarity as a Biomarker for Dry Eye Disease Severity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 4557–4561. doi:10.1167/iovs.09-4596
- Tavassoli, M., Crosby, W.H., 1968. Transplantation of marrow to extramedullary sites. *Science* (80- ). 161, 54–6. doi:10.1126/science.161.3836.54
- Taylor, A.W., 2005. The immunomodulating neuropeptide alpha-melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) suppresses LPS-stimulated TLR4 with IRAK-M in macrophages. *J. Neuroimmunol.* 162, 43–50. doi:10.1016/j.jneuroim.2005.01.008
- Taylor, A.W., Yee, D.G., 2003. Somatostatin is an immunosuppressive factor in aqueous humor. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 2644–2649. doi:10.1167/iovs.02-1216
- Thomas, E.D., Lochte, H.L., Cannon, J.H., Sahler, O.D., Ferrebee, J.W., 1959. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J. Clin. Invest.* 38, 1709–1716. doi:10.1172/JCI103949
- Tomlinson, A., Khanal, S., Ramaesh, K., Diaper, C., McFadyen, A., 2006. Tear film osmolarity: Determination of a referent for dry eye diagnosis. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 4309–4315. doi:10.1167/iovs.05-1504
- Tomlinson, A., McCann, L.C., Pearce, E.I., 2010. Comparison of Human Tear Film Osmolarity Measured by Electrical Impedance and Freezing Point Depression Techniques. *Cornea* 29, 1036–1041. doi:10.1097/ICO.0b013e3181cd9a1d
- Treacy, O., O'Flynn, L., Ryan, A.E., Morcos, M., Lohan, P., Schu, S., Wilk, M., Fahy, G., Griffin, M.D., Nosov, M., Ritter, T., 2014. Mesenchymal stem cell therapy promotes corneal allograft survival in rats by local and systemic immunomodulation. *Am. J. Transplant.* 14, 2023–2036.

doi:10.1111/ajt.12828

- van Setten, G.B., Macauley, S., Humphreys-Beher, M., Chegini, N., Schultz, G., 1996. Detection of transforming growth factor-alpha mRNA and protein in rat lacrimal glands and characterization of transforming growth factor-alpha in human tears. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37, 166–173.
- Versura, P., Campos, E.C., 2013. TearLab (R) Osmolarity System for diagnosing dry eye. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 13, 119–129. doi:10.1586/ERM.12.142
- Wang, J., Liao, L., Tan, J., 2011. Mesenchymal-stem-cell-based experimental and clinical trials: current status and open questions. *Expert Opin. Biol. Ther.* 11, 893–909. doi:10.1517/14712598.2011.574119
- Weng, J., He, C., Lai, P., Luo, C., Guo, R., Wu, S., Geng, S., Xiangpeng, A., Liu, X., Du, X., 2012. Mesenchymal Stromal Cells Treatment Attenuates Dry Eye in Patients With Chronic Graft-versus-host Disease. *Mol. Ther.* 20, 2347–2354. doi:10.1038/mt.2012.208
- Wilbanks, G.A., Streilein, J.W., 1991. Studies on the induction of anterior chamber-associated immune deviation (ACAID). 1. Evidence that an antigen-specific, ACAID-inducing, cell-associated signal exists in the peripheral blood. *J. Immunol.* 146, 2610–7.
- Wilson, G., O'leary, D.J., Holden, B.A., 1989. Cell content of tears following overnight wear of a contact lens. *Curr. Eye Res.* 8, 329–335. doi:10.3109/02713688908996380
- Wilson, S.E., Hong, J.W., 2000. Bowman's layer structure and function: critical or dispensable to corneal function? A hypothesis. *Cornea* 19, 417–420. doi:10.1097/00003226-200007000-00001
- Willcox, M.D.P., Argüeso, P., Georgiev, G.A., Holopainen, J.M., Laurie, G.W., Millar, T.J., Papas, E.B., Rolland, J.P., Schmidt, T.A., Stahl, U., Suarez, T., Subbaraman, L.N., Uçakhan, O., Jones, L.W., 2017. TFOS DEWS II Tear Film Report. *Ocul. Surf.* doi:10.1016/j.jtos.2017.03.006
- Wisniewski, H.G., Vilček, J., 1997. TSG-6: An IL-1/TNF-inducible protein with anti-inflammatory activity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8, 143–156. doi:10.1016/S1359-6101(97)00008-7
- Wu, K.-H., Wu, H.-P., Chan, C.-K., Hwang, S.-M., Peng, C.-T., Chao, Y.-H., 2013. The role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation: from bench to bedside. *Cell Transplant.* 22, 723–729. doi:10.3727/096368912X655217
- Xinaris, C., Morigi, M., Benedetti, V., Imberti, B., Fabricio, A.S., Squarcina, E., Benigni, A., Gagliardini, E., Remuzzi, G., 2013. A novel strategy to enhance mesenchymal stem cell migration capacity and promote tissue repair in an injury specific fashion. *Cell Transplant.* 22, 423–436. doi:10.3727/096368912X653246
- Yamaguchi, T., Hamrah, P., Shimazaki, J., MD, P., 2016. Bilateral Alterations in Corneal Nerves, Dendritic Cells, and Tear Cytokine Levels in Ocular Surface Disease. *Cornea* 35, S65–S70. doi:10.1097/ICO.0000000000000989
- Yao, L., Bai, H., 2013. Review: mesenchymal stem cells and corneal reconstruction. *Mol. Vis.* 19, 2237–43.
- Yao, L., Li, Z. rong, Su, W. ru, Li, Y. ping, Lin, M. li, Zhang, W. xin, Liu, Y., Wan, Q., Liang, D., 2012. Role of mesenchymal stem cells on cornea wound healing induced by acute alkali burn. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0030842
- Yoon, D., Gadaria-Rathod, N., Oh, C., Asbell, P.A., 2014. Precision and Accuracy of TearLab Osmometer in Measuring Osmolarity of Salt Solutions. *Curr. Eye Res.* 39, 1247–1250. doi:10.3109/02713683.2014.906623
- Zhao, X.C., Yee, R.W., Norcom, E., Burgess, H., Avanesov, A.S., Barrish, J.P., Malicki, J., 2006. The zebrafish cornea: Structure and development. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 4341–4348. doi:10.1167/iov.05-1611