

Terapia regenerativa con células madre en oftalmología

La facilidad de acceso para el procedimiento terapéutico y su seguimiento, junto con su estado inmunoprivilegiado, hacen del ojo un órgano ideal en el campo de la medicina regenerativa en veterinaria.

Antonio J. Villatoro Jiménez y Fernando Fariñas Guerrero
ImmuneStem: Instituto de Inmunología
Clínica y Terapia Celular, Málaga
immunestem@immunestem.com
www.immunestem.com
Imágenes cedidas por los autores

La medicina regenerativa con terapias basadas en células madre es una alternativa terapéutica para tejidos oculares afectados por enfermedad o trauma con el objetivo de ser reparados y/o regenerados.

De todos los tipos celulares empleados en terapia celular en oftalmología, son las células madre mesenquimales (MSC) las que mayor interés han despertado: en la actualidad hay 10 estudios clínicos en oftalmología humana para el tratamiento de diversas patologías con este tipo celular.

Recordemos que las MSC son células multipotentes con capacidad de diferenciación hacia diferentes linajes celulares y con una importante facultad secretora de diferentes moléculas con efectos tróficos, paracrinos e inmunomoduladores. Son además inmunoprivilegiadas al no expresar el antígeno mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II), lo cual permite su empleo alogénico.

Terapias inmunomoduladoras con MSC en oftalmología

Uno de los aspectos más interesantes de la terapia celular con MSC en oftalmología veterinaria es su potencial inmunomodulador en diversas patologías de origen inmunomediado en nuestras mascotas.

Actualmente son empleadas con éxito como elemento terapéutico en diferentes patologías, tanto en humanos como en animales, por su capacidad secretora de diferentes moléculas bioactivas que han demostrado una potente capacidad antiinflamatoria e inmunomoduladora, interviniendo tanto sobre la respuesta inmune innata como adaptativa.

Han demostrado una gran eficacia en tratamientos de diversas patologías autoinmunes refractarias a los tratamientos convencionales (corticoesteroides e inmunomoduladores), eliminando la necesidad de una aplicación tópica prolongada de estos fármacos, así como de sus efectos secundarios.

Los corticoides tópicos tienen una serie de efectos en el tejido ocular, entre los que cabe destacar:

- Producen retraso en la regeneración y reparación epitelial y endotelial.
- Disminuyen la producción y el depósito de colágeno sobre la lesión, potenciando además la actividad de las colagenasas corneales, lo que provoca la disolución rápida del estroma en las zonas afectadas.
- Disminuyen la capacidad fagocitaria de monocitos y macrófagos, favoreciendo así las infecciones.

En relación al uso de ciclosporina A, su efecto inmunosupresor es dosis dependiente y reversible tras la retirada del fármaco, siendo más efectivo cuando se administra antes de la estimulación antigénica. Se han descrito efectos colaterales oculares como irritación periocular, hipermia conjuntival y signos de molestia ocular como blefarospasmo, prurito, etc. En perros tras la administración tópica se demostró supresión en la proliferación de linfocitos.

Por ende, el uso de la terapia celular con MSC ha demostrado ser una alternativa terapéutica efectiva, fácil, segura y poco invasiva en el tratamiento de aquellos casos refractarios, o como complemento a las terapias convencionales, siendo aplicadas

Nuestro protocolo de tratamiento de la QEF con terapia celular de MSC muestra una mejoría clínica con resolución total de los signos oculares sin evidencia de empeoramiento o regresión durante al menos 11 meses y sin complicaciones.

por diferentes vías según la patología y el grado de compromiso ocular: subconjuntival, tópica, sistémica, intravítrea, etc.

A continuación, describimos algunas de las patologías que más se benefician de estas terapias avanzadas en nuestra profesión.

Queratoconjuntivitis seca (QCS)

La QCS o síndrome de ojo seco es una de las enfermedades más comunes en oftalmología humana y canina, con una alta prevalencia e importante impacto sanitario y económico, de origen multifactorial, con evidencias que sugieren su carácter inmunomediado.

Fisiopatológicamente existe pérdida en el mecanismo homeostático de la llamada unidad funcional lagrimal (UFL), que origina una película lagrimal inestable con



Figura 2. Resultado de la terapia celular con MSC en un caso de QEF. Superior: inicio. Inferior: a los 11 meses. (Veterinario colaborador Antonio Moreno Boisso).

un aumento de la osmolaridad lagrimal e inflamación de la superficie ocular, lo que provoca un círculo vicioso responsable de los síntomas y signos característicos de esta enfermedad. La UFL está formada por todos los componentes de la superficie ocular, la estática y dinámica de los párpados, las glándulas lagrimales y la red neural, y tiene como misión mantener la córnea transparente y la visión nítida.

En modelos animales de enfermedad lagrimal inmunomediada el balance entre células T supresoras y células T colaboradoras desempeña un importante papel en la regulación de la glándula lagrimal. Las células T supresoras generalmente predominan, pero en la QCS inmunomediada las células T colaboradoras se vuelven predominantes; el resultado es una respuesta tipo Th1 y Th17 con importante incremento de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1, interferón- γ y aumento concomitante de la producción de metaloproteasa 9 en la lágrima.

El tratamiento actual, mediante agentes antiinflamatorios e inmunosupresores, tiene que ser administrado de por vida, es ineficaz en algunos pacientes y tiene efectos secundarios por su empleo a largo plazo. Además, el perro al padecerla de manera natural y con gran similitud clínica a la especie humana, representa un modelo preclínico mayor ideal para su estudio.

Nuestro equipo demostró por primera vez el efecto terapéutico de la terapia celular con MSC alogénicas procedentes de tejido adi-

poso, previamente caracterizadas *in vitro* e implantadas alrededor de las glándulas lagrimales en perros con QCS primaria refractaria al tratamiento convencional (figura 1).

Los resultados demostraron que el 75 % de los animales tratados manifestaron una mejoría significativa de la producción lagrimal y de los signos oculares (secreción ocular, hiperemia y daños de la superficie corneal) al menos durante nueve meses, sin manifestarse signos de regresión o empeoramiento, ni ningún tipo de complicación o efecto secundario sistémico o local.

La actividad terapéutica de las MSC en esta patología es atribuida a su actividad inmunorreguladora de modo que los linfocitos T CD4+ conducen hacia una respuesta Th2, lo que estimula la producción de células T reguladoras y disminuye la respuesta inflamatoria Th17, a través de múltiples mecanismos.

En aquellos casos refractarios a las terapias convencionales, las MSC parecen equilibrar la respuesta Th1-Th2 estimulando la proliferación de células T reguladoras.

Queratitis proliferativa felina (QPF)
La QPF es una queratopatía crónica de difícil curación, causada por una respuesta inmune local secundaria a un posible estímulo antigénico, con importante proliferación celular sobre la superficie corneal. Desde un punto de vista inmunopatológico, la queratitis proliferativa felina está soportada por una respuesta de tipo Th2 que media una reacción de hipersensibilidad mixta, con participación de un componente de hipersensibilidad de tipo I (alérgico) y otro de tipo IV (subtipo IVb) o de hipersensibilidad retardada eosinofílica. En este tipo de respuesta inflamatoria predomina la producción de citoquinas como la IL-4 e IL-5, entre otras.

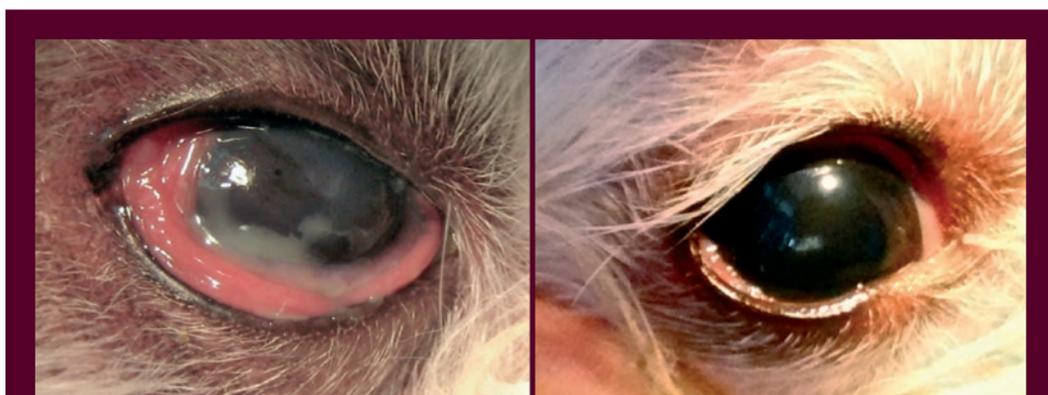


Figura 1. Resultado de la terapia celular con MSC en caso refractario de QCS en perro. Izquierda: inicio. Derecha: a los nueve meses.

► Dicha respuesta de hipersensibilidad mediada por Th2 queda reflejada a nivel histopatológico por la existencia de un infiltrado inflamatorio compuesto fundamentalmente por eosinófilos, con presencia concomitante de algunos mastocitos y células plasmáticas a nivel corneal.

El alto porcentaje de positividad al herpesvirus felino (76 %) en esta patología, sugiere una posible patogénesis vírica.

El tratamiento actual consiste en la aplicación tópica de corticosteroides e inmunomoduladores de forma continua y prolongada, con importantes efectos adversos descritos en esta especie, contraindicada en aquellos individuos con una base vírica.

Los resultados de nuestro protocolo de tratamiento con terapia celular de MSC demuestran una mejoría clínica con resolución total de los signos oculares sin evidencia de empeoramiento o regresión durante al menos 11 meses y sin complicaciones a nivel local o sistémico en ninguno de los animales tratados (figura 2).

Queratitis crónica superficial (QCS)

La QCS es un proceso inflamatorio crónico, progresivo y bilateral. Está inducida por la acción de los rayos ultravioleta, produciéndose un depósito difuso perilimbar de inmunoglobulinas observado en el estroma conjuntival y el tejido linfoide asociado a la conjuntiva (CALT), incluidas las células de Langerhans. Esto desencadena inflamación crónica y en caso de no ser tratada y controlada con inmunosupreso-

res y/o inmunomoduladores suele provocar déficit visual y como consecuencia una pérdida de la transparencia corneal.

Las células predominantes en el área de la córnea afectada son los linfocitos T CD4+, con una elevada proporción de secreción de interferón- γ . Se han descrito aberraciones del complejo principal de histocompatibilidad tipo III y IV en células epiteliales de las áreas afectadas, y anticuerpos circulantes frente a las proteínas epiteliales corneales. La consecuencia es un proceso inflamatorio crónico de la córnea caracterizado por la infiltración de células plasmáticas y linfocitos, formación de neovasos, tejido de granulación y depósito de pigmento en el epitelio y estroma corneal que pueden provocar ceguera.

El empleo de MSC ha permitido eliminar la neovascularización, el tejido de granulación y los signos clínicos asociados a ella, lo que elimina a su vez la necesidad de medicación y permite en casos graves la desaparición de los depósitos de pigmento en córnea; de este modo se evita la utilización de técnicas quirúrgicas más agresivas (figura 3).

Otras queratitis pigmentarias inmunomediadas

En determinadas razas exoftálmicas (principalmente los carlinos) la queratitis pigmentaria puede ser un problema primario o una consecuencia de una reacción inespecífica a un estímulo irritante crónico de distinto origen y es una causa irreversible de ceguera en los perros afectados.

La terapia con MSC por su capacidad antiinflamatoria e inmunomoduladora permite la eliminación de los depósitos de melanina y recuperar la transparencia corneal.

Uveítis inmunomediadas

La uveítis recurrente es la causa más frecuente de ceguera en équidos y de difícil manejo terapéutico. Está caracterizada por brotes inflamatorios recurrentes, causados por la activación de leucocitos en el ojo, la mayoría linfocitos T CD4+. En su inicio es una respuesta tipo Th1 con aumento en la producción de la IL-2 e interferón- γ , y predominio de la respuesta Th-17 en las fases crónicas.

La terapia con MSC determina una inhibición de la inflamación mediada por Th1/Th17, regulación del balance entre Th17 y células T reguladoras, y suprime la función de las células presentadoras de antígeno. Actualmente ha demostrado ser una importante alternativa efectiva y sin efectos adversos que controla la inflamación, disminuye las recurrencias y protege los tejidos oculares (figura 4).

Las MSC implantadas subconjuntivalmente para reconstruir la córnea persisten localmente 3-4 semanas actuando como "medicamento inteligente" con efecto regenerador, antiinflamatorio y angiogénico.

Reconstrucción corneal

Otro aspecto muy interesante de la terapia celular con MSC es la reconstrucción corneal en patologías como las quemaduras químicas, úlceras, heridas, etc., donde las MSC actuarían en la zona afectada, más por un mecanismo paracrino de liberación de multitud de sustancias bioactivas, que por su transformación en otro tipo celular.

Entre las moléculas que intervienen en la regeneración de la superficie corneal destacan:

- Factores de crecimiento (TGF- β , VEGF, EGF, NGF, etc.) encargados de estimular la regeneración epitelial y la neurogénesis e inducir un microambiente corneal más favorable a la regeneración.
- Citoquinas antiinflamatorias IL-10, IL-13 y antagonista de la IL-1.

• Moléculas bioactivas inmunomoduladoras que se encargan de evitar la formación de escaras y de bloquear la proliferación de células inflamatorias.

• Péptidos con una potente capacidad antimicrobiana y de estimular la fagocitosis.

En las úlceras corneales del perro la IL-1 β y el NO (óxido nítrico) se incrementan notablemente y existe una correlación positiva entre su concentración y la gravedad clínica de dichas úlceras, como son la neovascularización, conjuntivitis y formación de escaras.

Las MSC implantadas subconjuntivalmente en el perro persisten localmente entre 3 y 4 semanas, tiempo en el que actúan como "medicamento inteligente": liberan y estimulan los mecanismos necesarios para la regeneración, inhiben la pro-

ducción de citoquinas pro-inflamatorias y regulan el factor angiogénico y de proliferación celular (figura 5).

Retina

El empleo de las MSC en patología retiniana ha demostrado que son capaces de diferenciarse a células similares a neuronas retinianas, células del epitelio pigmentario retiniano y a fotorreceptores, preservando la integridad de la retina.

Además de la capacidad de diferenciación, las MSC también son neuroprotectoras debido a sus efectos paracrinos, por lo que modulan la plasticidad de los tejidos dañados, y secretan factores neurotróficos. Además, tienen la capacidad de restablecer la liberación de neurotransmisores, integrando la red neural y sináptica existentes.

Actualmente existen cinco ensayos clínicos con la utilización de MSC en patología retiniana humana que abren nuevas perspectivas para el tratamiento en oftalmología veterinaria de procesos degenerativos; como la atrofia progresiva de la

retina, la degeneración retiniana adquirida súbita y otros como la retinitis inmunomediada. Se están obteniendo esperanzadores resultados también en el tratamiento de la retinopatía diabética gracias al efecto pleiotrópico de las mismas.

Glaucoma

En la actualidad se ha demostrado que las MSC constituyen una alternativa prometedora para el tratamiento del glaucoma. Existen actualmente tres ensayos clínicos en medicina humana. Las MSC disminuyen la pérdida de células ganglionares retinianas, aumentan su supervivencia en casos de isquemia e inducen la regeneración axonal.

Conclusión

La utilización de MSC en oftalmología veterinaria es una realidad terapéutica segura, eficaz y de fácil aplicación, que aporta nuevas perspectivas en enfermedades de difícil solución, disminuyendo o eliminando la necesidad de medicación convencional.

El alcance y el éxito de esta terapia no se basa exclusivamente en la administración de las MSC, sino que se soporta en el establecimiento de un protocolo personalizado para cada paciente, donde se establece el tipo celular que hay que emplear, dosis, pauta y vía de administración, así como la medicación complementaria para asegurar el éxito terapéutico.

En un próximo artículo comentaremos las indicaciones y resultados de la terapia celular en ortopedia veterinaria. □

Bibliografía

1. Carrade DD, Borjesson DL. Immunomodulation by mesenchymal stem cells in veterinary species. *Comparative Medicine*. 2013; 63(3):207-217.
2. Dharmodaran, K, Murali Subramani, M, Ponnalagu, M, Shetty, R, Das, D. Ocular stem cells: a status update!. *Stem Cell Research & Therapy* 2014; 5:56.
3. Malalana F, Stylianides A, McGowan C. Equine recurrent uveitis: Human and equine perspectives. *Vet J*. 2015 Oct;206(1):22-9.
4. Marfe G, Massaro-Giordano M, Ranalli M, Cozzoli E, Di Stefano C, Malafoglia V, Poletini M, Gambacurta A. Blood derived stem cells: An ameliorative therapy in veterinary ophthalmology. *Journal of Cellular Physiology* 2012;227(3):1250-1256.
5. Tsz Kin Ng and Jasmine Sum-Yee Yung. Research Progress and Human Clinical Trials of Mesenchymal

Stem Cells in Ophthalmology: A Mini Review. *SM Ophthalmol J*. 2015;1(1):1003.

6. Villatoro AJ, Fernandez V, Claros S et al. Use of adipose-derived mesenchymal stem cells in keratoconjunctivitis sicca in a canine model. *BioMed Research International*. 2015; 527926.

7. Wichayacoop T, Briksawan P, Tuntivanich P, Yibchok-Anun S. Anti-inflammatory effects of topical supernatant from human amniotic membrane cell culture on canine deep corneal ulcer after human amniotic membrane transplantation. *Vet Ophthalmol* 2009;12(1):28-35.

8. Wood JA, Chung DJ, Park SA, et al. Periocular and Intra-Articular Injection of Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: An In Vivo Imaging and Migration Study. *J Ocul Pharmacol Ther* 2012;28(3):307-17.

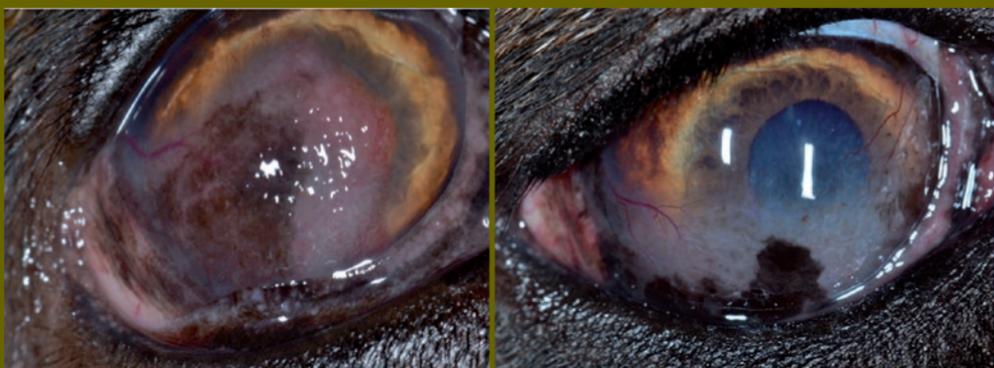


Figura 3. Resultado de la terapia celular con MSC en un caso de QCS en Pastor Alemán. Izquierda: inicio. Derecha: a los tres meses. (Veterinario colaborador: Fidel Cassue del Río).



Figura 4. Resultado de la terapia celular con MSC en un caso grave refractario de uveítis recurrente equina. Izquierda: inicio. Derecha: a los tres meses. (Veterinario colaborador: Francisco Simó).



Figura 5. Resultado de la terapia celular con MSC en una úlcera corneal en perro. Izquierda: inicio. Derecha: a los tres días. (Veterinario colaborador: Antonio Moreno Boisso).