

EFICACIA DEL TRASPLANTE DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA Y DE TEJIDO ADIPOSEO EN UN MODELO DE DEFICIENCIA DE CÉLULAS MADRE LIMBARES DESARROLLADO EN CONEJO: ESTUDIO COMPARATIVO.

Carmen García-Vázquez,¹ Sara Galindo,^{1,2} Marina López-Paniagua,^{1,2} José M. Herreras,^{1,2} Esther Rey,^{2,1} Margarita Calonge,^{1,2} Teresa Nieto-Miguel.^{2,1}

¹IOBA (Instituto de Oftalmobiología Aplicada), Universidad de Valladolid, Valladolid.

²CIBER en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN).

INTRODUCCIÓN

La deficiencia de células madre limbares (LSCD, por sus siglas en inglés) se produce como resultado de la destrucción y/o disfunción de las células madre del epitelio limbar, y tiene entre sus consecuencias la pérdida de visión y la inflamación crónica de la superficie ocular.¹ Nuestro grupo de investigación ha demostrado recientemente que el trasplante de células madre mesenquimales (MSC) derivadas de la médula ósea (BM-MSC) en la superficie ocular de pacientes que padecen LSCD, es seguro y facilita de manera eficaz la reparación del epitelio corneal.² Sin embargo, las MSC derivadas del tejido adiposo (AT-MSC) se ha demostrado que son más accesibles, más económicas y una fuente de células madre más segura que las BM-MSC.³

OBJETIVO

Comparar la eficacia del trasplante de BM-MSC *versus* AT-MSC en un modelo de LSCD desarrollado en conejo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Desarrollo del LSCD en conejos

Dieciocho conejos fueron tratados con 250.000 MSC cultivadas sobre una membrana amniótica (9 con BM-MSC y 9 con AT-MSC), y trasplantadas tres semanas después de inducirles un LSCD. Mediante desepitelización completa de la córnea con n-heptanol, seguida de una peritomía limbar quirúrgica de 360°, se indujo un modelo de LSCD en 27 conejos.

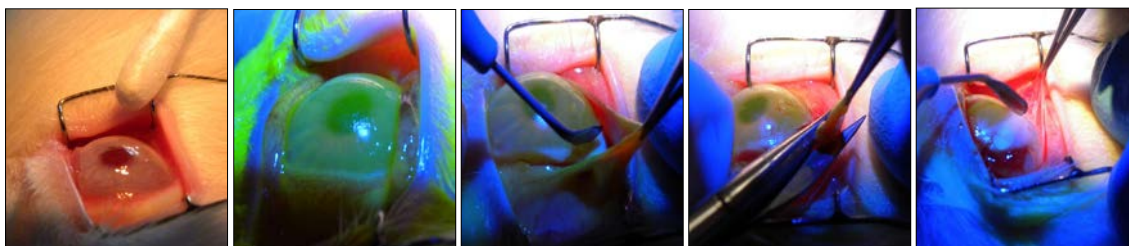


Figura1. Desepitelización corneal y peritomía limbar quirúrgica

Transcurridas 3 semanas de evolución, 18 conejos fueron trasplantados con 250.000 MSC cultivadas sobre una membrana amniótica (9 con BM-MSC y 9 con AT-MSC). Nueve conejos no trasplantados formaron el grupo de control.



Figura 2 . Trasplante de membrana amniótica con MSCs.

2. Evaluación de la superficie ocular

Semanalmente, se evaluó clínicamente la invasión conjuntival, la neovascularización, la opacidad y el defecto epitelial corneal con una lámpara de hendidura. Mediante un análisis histopatológico realizado al final del periodo del seguimiento (11 semanas), se evaluó el nivel de daño tisular y la presencia de linfocitos (como signo de inflamación) y de células calciformes (como signo de conjuntivalización) en el limbo y en la córnea.^{3,4}

Escala	Invasión conjuntival	Neovascularización	Opacidad corneal	Defecto epitelial
0	Nada	Nada	Nada	Nada
1	Area $\leq 1/4$	Area $\leq 1/4$	Un poco	Area $\leq 1/4$
2	$1/4 < \text{area} \leq 1/2$	$1/4 < \text{area} \leq 1/2$	Moderado	$1/4 < \text{area} \leq 1/2$
3	$1/2 < \text{area} \leq 3/4$	$1/2 < \text{area} \leq 3/4$	Severo, se ve un poco la pupila	$1/2 < \text{area} \leq 3/4$
4	Area $> 3/4$	Area $> 3/4$	Severo, no se ve la pupila	Area $> 3/4$

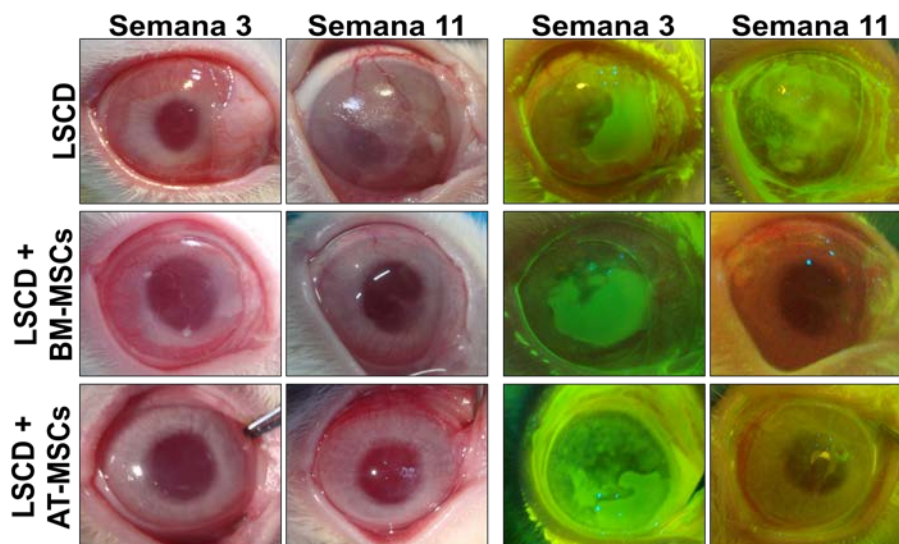
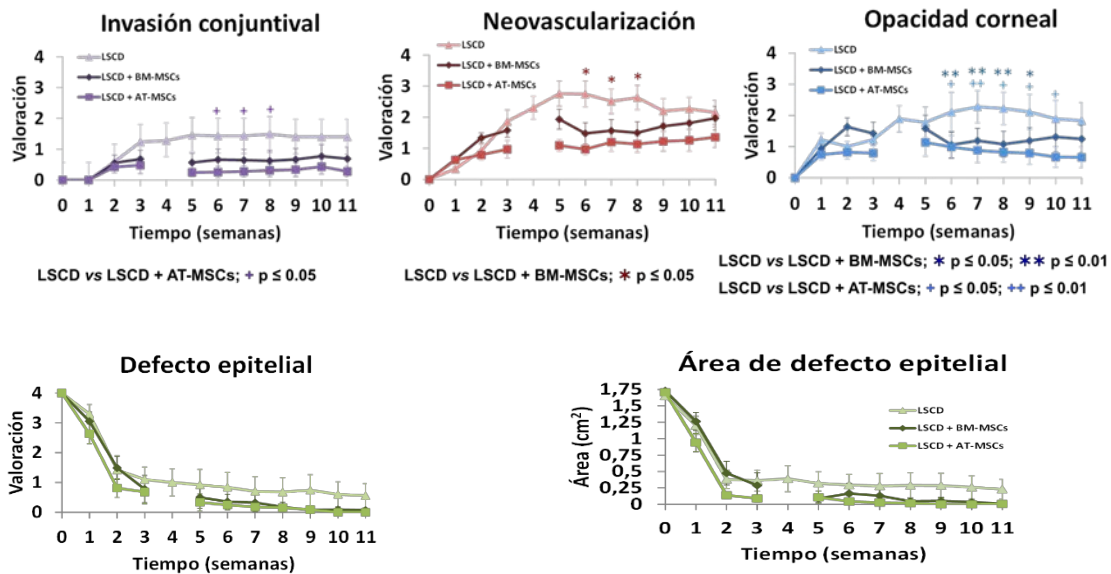
3. Estudio histopatológico

Una vez finalizado el periodo de seguimiento, se extrajeron los botones córneo-limbo-esclerales tanto de los conejos experimentales, como de los controles, y se fijaron con paraformaldehído al 4%. Una vez procesados, se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 4 μm al microtómo. Utilizamos la tinción de PAS para observar la morfología tisular y analizar la presencia de células inflamatorias y de células calciformes (específicas de la conjuntiva).

RESULTADOS

Evaluación de la superficie ocular

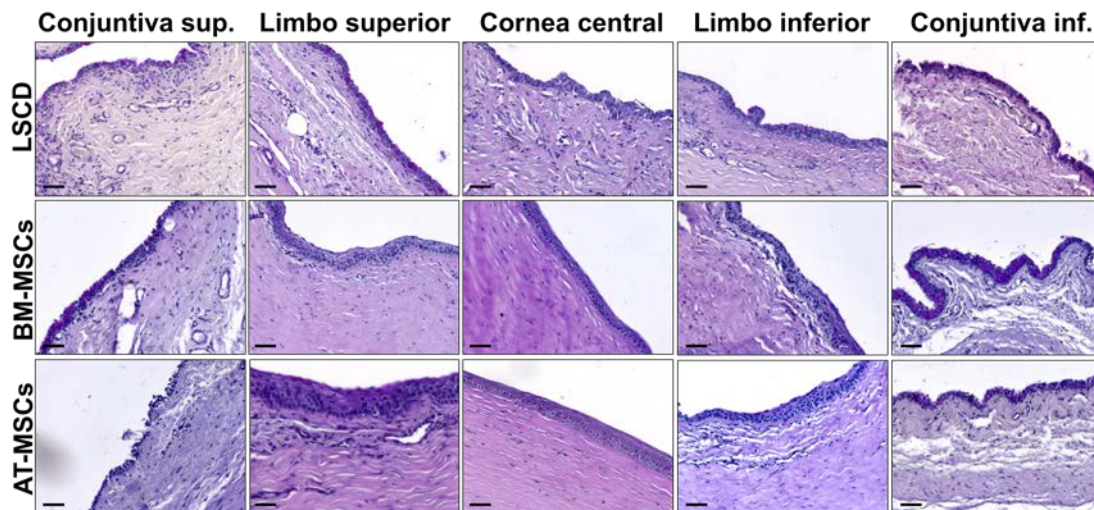
El grupo trasplantado con BM-MSC mostró menos neovascularización y menos opacidad corneal en las semanas 6-8 y 6-9, respectivamente, que el grupo no tratado. El grupo tratado con AT-MSC tuvo menos invasión conjuntival y opacidad corneal en las semanas 6-8 y 6-10, respectivamente, que el grupo control. No hubo diferencias en los defectos epiteliales entre los tres grupos



Evaluación del estudio histopatológico

Los grupos trasplantados con BM-MSC y AT-MSC mostraron un mayor número de capas epiteliales en la córnea y en el limbo, menos desorganización del estroma, menor cantidad de células inflamatorias en el estroma de la córnea y menos células calciformes en el epitelio del limbo y/o de la córnea que el grupo no tratado.

Grupo	Conjuntiva superior	Limbo superior	Córnea central	Limbo inferior	Conjuntiva inferior
LSCD	++	++-	+-	++	++
BM-MSCs	++	++	+	++	++
AT-MSCs	+-	++	+	+-	++



CONCLUSIONES

El trasplante de BM-MSC y AT-MSC en un modelo de LSCD desarrollado en conejo redujo el desarrollo de la opacidad corneal y restauró parcialmente la estructura dañada del tejido limbar y corneal. Las BM-MSC fueron mejores en la reducción del desarrollo de la neovascularización corneal, mientras que las AT-MSC evitaron mejor la invasión conjuntival.

Ambos tipos de MSC parecen alternativas válidas para el tratamiento de la LSCD.

FINANCIACIÓN

Ministerios de Economía y Competitividad (SAF2015-63594-R MINECO/FEDER, UE) y de Ciencia e Innovación, España (SAF2010-14900); Instituto de Salud Carlos III, España (CIBER-BBN, CB06/01/003 MINECO/FEDER). Centro en Red de Medicina Regenerativa y Terapia Celular de Castilla y León, España.

REFERENCIAS

1. Sejjal K, Bakhtiari P, Deng SX. Presentation, diagnosis and management of limbal stem cell deficiency. *Middle East.Afr.J.Ophthalmol.* 2013;20:5-10.
2. Calonge M, Pérez I, Galindo S, et al. A proof-of-concept clinical trial using mesenchymal stem cells for the treatment of corneal epithelial stem cell deficiency. *Transl Res.* 2019;206:18-40.
3. Galindo S, Herreras JM, López-Paniagua M, et al. Therapeutic effect of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in experimental corneal failure due to limbal stem cell niche damage. *Stem Cells.* 2017;35(10):2160–74.
4. Wan P, Wang X, Ma P, et al. Cell delivery with fixed amniotic membrane reconstruct corneal epithelium in rabbits with limbal stem cell deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(2):724-30.