

Terapia celular en medicina felina

Esta técnica, basada en la utilización de células madre mesenquimales, es una novedosa estrategia terapéutica que ha supuesto un importante avance en aquellas enfermedades que actualmente presentan escasas opciones de tratamiento.

Antonio J. Villatoro

DVM, PhD, MBA

ImmuneStem. Instituto de Inmunología Clínica y Terapia Celular. Málaga
Labret. Laboratorio de Bioingeniería y Regeneración Tisular. Departamento de Biología Celular. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga

Instituto de Biomedicina de Málaga (IBIMA)

Red de Terapia Celular del Instituto de Salud Carlos III (TerCel)

Académico numerario de la RACVAO

ajvillatoro@immunestem.com

Imágenes cedidas por el autor

La terapia celular está basada en el uso de diferentes tipos celulares como agentes terapéuticos. Esta novedosa estrategia plantea una alternativa en enfermedades cuyo tratamiento actual no es efectivo o simplemente no existe, ya que aporta los mecanismos necesarios para estimular la regeneración/repación de los órganos y tejidos dañados. Entre todo el colectivo de células candidatas a ser empleadas en estas terapias avanzadas, son las células madre o troncales las que han demostrado mejores resultados. El prometedor futuro de esta terapia se refleja en la existencia de casi 7.500 estudios clínicos en la especie humana para el tratamiento de diferentes enfermedades empleando diversos tipos de células madre.

La medicina veterinaria no queda al margen de estos avances y en el año 2003 fue pionera en el empleo clínico de células madre, cuando se publicaron los primeros resultados en el tratamiento de lesiones tendinosas en el caballo de deporte (Smith *et al.*, 2003).

Por otro lado, gracias a los resultados obtenidos con estas terapias en animales y a que estos padecen determinadas enfermedades similares a las del ser humano, las mascotas conforman un modelo preclínico ideal en investigación biomédica traslacional para su posible empleo en medicina humana (Hoffman *et al.*, 2016).

A continuación se repasan, de manera resumida, los principales avances, indicaciones y resultados de la terapia celular

con células madre mesenquimales (MSC) en la especie felina, que son hoy una realidad y representan un importante avance en el tratamiento de enfermedades complejas.

Enfermedades musculoesqueléticas

Las MSC felinas han demostrado, al igual que en otras especies (perro, caballo o ser humano), ser un tipo celular ideal en diferentes enfermedades osteoarticulares.

El empleo de las MSC lleva demostrando durante años unos altos niveles de seguridad y eficacia en multitud de procesos articulares, tanto degenerativos como inmunomediados (Bogers *et al.*, 2018).

Destacan diversos efectos beneficiosos de acción específicos a nivel articular:

- Activación de diversas vías de señalización intracelulares y factores de transcripción que estimulan un ambiente favorable para la regeneración articular. El resultado final es un incremento de la capacidad de producción de proteínas específicas y matriz extracelular del cartilago.

En terapia celular en la especie felina los tipos más empleados de MSC son los procedentes del tejido adiposo, médula ósea y sangre periférica.

- Secreción de factores bioactivos con capacidad antiinflamatoria, así como factores de crecimiento como favorecedores de la reparación del cartilago articular y tejido óseo (TGF- β , BMP, IL-6 e IL-1).

La osteoartritis felina tiene una alta prevalencia en animales mayores, muchas veces está infravalorada y se trata de forma paliativa con fármacos cuyo uso continuado no está libre de efectos indeseados en esta especie. La terapia celular con MSC ha demostrado ser una excelente estrategia terapéutica, ya que detiene y disminuye el deterioro articular, reduce del dolor y, con ello, aumenta la actividad física del paciente

Células madre mesenquimales

Las MSC (del inglés *mesenchymal stem cells* o *mesenchymal stromal cells*) son células indiferenciadas no hematopoyéticas, procedentes de la capa embrionaria del mesodermo. Tienen capacidad de autorrenovación y multipotencialidad y están localizadas en diversos tejidos adultos o extraembrionarios (Dominici *et al.*, 2006). En terapia celular en la especie felina los tipos más empleados de MSC son los procedentes del tejido adiposo, médula ósea y sangre periférica, fundamentalmente por la facilidad de obtención y abundancia del tejido donde se ubican (Villatoro *et al.*, 2018) (figura 1).

Además de su función como reservorio de células indiferenciadas para la regeneración de los tejidos en los que se ubican, cada vez existen más evidencias de que su mecanismo de acción se desarrolla mediante una acción paracrina, a través de la secreción de multitud de sustancias bioactivas (secretoma), más que por la propia diferenciación en el tipo celular afectado. Bajo el concepto de secretoma se incluyen diferentes moléculas solubles (principalmente factores de crecimiento, citoquinas y quimiocinas), así como la secreción de una gran variedad de vesículas extracelulares (exosomas y microvesículas) (figura 2).

Además, poseen la habilidad de migración y anidamiento hacia el lugar de la lesión en respuesta a las sustancias allí liberadas.

Sin duda alguna, entre todos los mecanismos de actuación de las MSC, su habilidad para modular el sistema inmunitario, tanto innato como adaptativo, desempeña un papel fundamental en casi todos los efectos terapéuticos atribuidos a estas células (Carrade *et al.*, 2013) (figura 3).

Cabe recordar que cada vez existe una mayor cantidad de evidencias de que la calidad de las MSC se ve alterada por factores como la edad, la medicación, el estado sanitario del donante o el padecimiento de otras enfermedades concomitantes, lo cual obliga a una buena evaluación del caso clínico y a la personalización de la terapia para asegurar la mayor posibilidad de éxito (Konala *et al.*, 2016; Villatoro *et al.*, 2019).

y es posible dejar de administrar fármacos con alto potencial de efectos adversos (Freitag *et al.*, 2016; Harman *et al.*, 2016).

Los autores, en función de su experiencia, señalan una mejoría en más del 88 % de los pacientes tratados y una reducción prácticamente total de la medicación.

La estimulación osteogénica de las MSC ha demostrado ser otra utilidad clínica muy interesante en casos de fracturas complicadas, no uniones o retardos de la formación del callo óseo. Las MSC demuestran un enorme potencial para inducir la neoformación de vasos y estimular la posterior diferenciación osteogénica en los nichos de fractura, aspectos fundamentales en las fases de reparación ósea (Kang *et al.*, 2012).

En todos estos casos, la vía de administración intralesional (articular, en el núcleo de fractura, etc.) facilita enormemente su

empleo y potencia los efectos de estas terapias (figura 4).

Gingivostomatitis crónica

La gingivostomatitis crónica felina (GECF) es una enfermedad dolorosa y debilitante, cuyo manejo es complejo y que genera un alto índice de frustración tanto en el clínico en el propietario. Existe consenso acerca de un importante componente inmunopatológico, responsable de una respuesta inmunitaria inapropiada en la mucosa oral, secundario a una estimulación antigénica crónica frente a diferentes factores. Puede alcanzar niveles de prevalencia de hasta el 12 % de la población (Jennings *et al.*, 2015; Winer *et al.*, 2016).

Por su complejidad y muchas veces difícil manejo, se han establecido diferentes

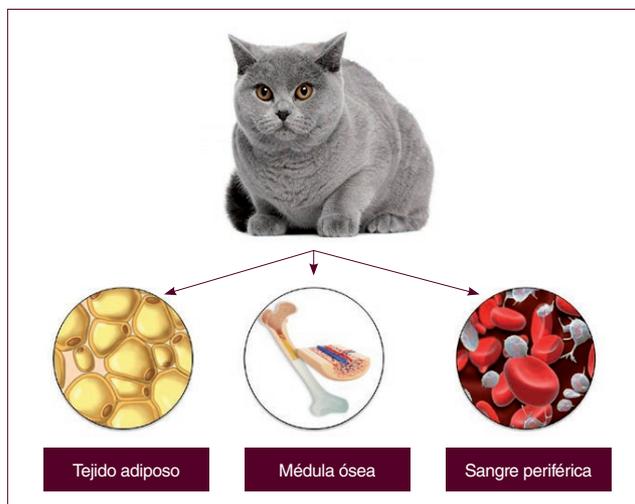


Figura 1. Principales fuentes de células madre mesenquimales en la especie felina.

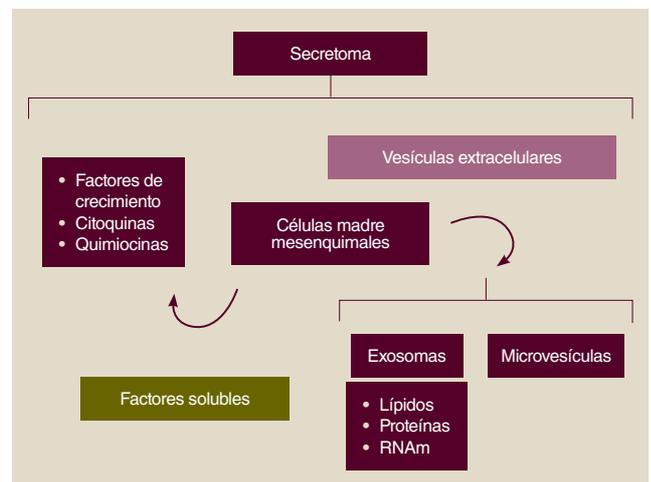


Figura 2. Secretoma de las células adremesenquimales: factores solubles y vesículas extracelulares (microvesículas y exosomas).

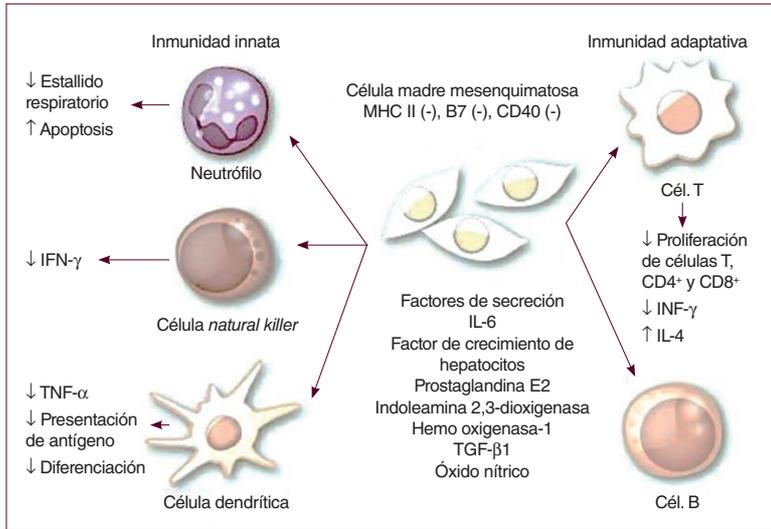


Figura 3. Interacciones entre células madre mesenquimales (MSC) y células inmunitarias. Las MSC, mediante un efecto paracrino, regulan la proliferación y la función de una variedad de células inmunitarias, así como la inducción de células reguladoras T.

► estrategias terapéuticas cuyos objetivos principales son eliminar el dolor y las fuentes de infección o inflamación crónica en la boca. Estas terapias producen mejoría parcial o temporal, pero no su curación total. En general, engloban desde la eliminación de piezas dentarias hasta la administración de analgésicos, antibióticos, corticosteroides e inmunomoduladores de forma continua y prolongada, con efectos adversos descritos (Arzi *et al.*, 2016; Stathopoulou *et al.*, 2017).

Por otro lado, alrededor de un 30 % de los casos son refractarios a los tratamientos convencionales, cuya progresión clínica lleva a un importante deterioro y debilitamiento del animal, con pronóstico muy pobre ante la falta de otras opciones terapéuticas.

La terapia inmunomoduladora con MSC en el tratamiento de esta enfermedad está creando muy buenas expectativas derivadas de sus resultados. Se abre así una prometedora alternativa para aquellos animales con GECF refractarios a los tratamientos convencionales y que no tienen ninguna otra opción, ya que con MSC se obtiene una mejoría completa o parcial de hasta el 90 % de los animales tratados (Villatoro *et al.*, 2016; Arzi *et al.*, 2017).

El cuadro de inflamación sistémica que manifiestan los pacientes con GECF grave y/o refractaria se ve disminuido al normalizarse parámetros como la neutrofilia, las globulinas, las citoquinas proinflamatorias y otros biomarcadores de inflamación. Esto también se refleja en las enfermedades concomitantes que suelen acompañar a este proceso, lo que finalmente permite una mejoría clínica general significativa, que se manifiesta con un aumento del apetito y el peso, normalización de otros

parámetros sanguíneos y disminución o eliminación de medicación (figura 5).

La adecuada selección del paciente y del protocolo terapéutico, así como la realización de un seguimiento son cruciales para obtener los mejores resultados. Entre los parámetros determinantes del resultado y pronóstico con esta terapia se encuentran la edad, la medicación actual, la infección por virus (fundamentalmente calicivirus),

Entre todos los mecanismos de actuación de las MSC, su habilidad para modular el sistema inmunitario desempeña un papel fundamental en casi todos los efectos terapéuticos atribuidos a estas células.

el padecimiento de algunas enfermedades concomitantes (insuficiencia renal, entre otras), exodoncias previas y niveles de diferentes marcadores de inflamación fundamentales para el pronóstico y control de la evolución del proceso.

Enfermedad inflamatoria intestinal

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es un grupo de afecciones inflamatorias crónicas del tracto gastrointestinal. Es habitual en gatos, perros y seres humanos y, al igual que otras enfermedades autoinmunitarias, muestra un importante componente genético. Se desencadena una reacción autoinmunitaria inapropiada en el tracto digestivo, condicionada por alteraciones en la microbiota, factores ambientales y anomalías de la respuesta inmunológica, resultado de una disfunción de la barrera intestinal y pérdida de

tolerancia a los antígenos intestinales. Los protocolos actuales de tratamiento presentan a veces escasa respuesta clínica, frecuentes recaídas y efectos secundarios por la medicación inmunosupresora empleada (Webb *et al.*, 2015).

Actualmente, el control de la inflamación y la respuesta inmunitaria es un aspecto muy importante en su manejo y tratamiento.

La terapia celular con MSC, gracias a su capacidad inmunorreguladora, ha sido descrita como una alternativa terapéutica segura y eficaz en el tratamiento de esta enteropatía tanto en perros y gatos como en humanos, con un alto porcentaje de remisión del cuadro clínico. Su administración (vía intravenosa y/o intraperitoneal) ha demostrado ser una estrategia segura y eficaz, con una remisión clínica en el 85 % de los casos, un incremento sustancial de la albúmina, la cobalamina y el folato, y disminución de parámetros sistémicos de inflamación (Perez-Merino *et al.*, 2015).

Se han descrito diferentes mecanismos de actuación. Por un lado, en la EII, la disfunción de la mucosa intestinal inflamada permite que componentes de la microbiota intestinal se infiltren en su lámina propia. Las MSC administradas migran y anidan en la lámina propia del intestino lesionado, donde interactúan con los distintos agentes bacterianos. Fruto de dicha interacción, se desencadena en las MSC un incremento de la transcripción de determinados genes inmunomoduladores clave y la posterior secreción de factores antiinflamatorios (TSG-6, IDO y PgF₂) (Tsuchiya *et al.*, 2017).

Por otro lado, los macrófagos desempeñan una función fundamental en la homeostasis inmunitaria intestinal, y también están implicados en la patogénesis de la EII. En un intestino sano, los macrófagos residentes muestran un fenotipo M2 (antiinflamatorio), mientras que los macrófagos de perfil inflamatorio M1 dominan en la mucosa intestinal inflamada. Por tanto, la modificación del equilibrio de las poblaciones de macrófagos M1 hacia un fenotipo M2 supone un nuevo enfoque terapéutico en la EII.

En estas nuevas estrategias, las MSC, por su capacidad inmunomoduladora a través de la liberación de diferentes moléculas, han demostrado un enorme potencial para inducir macrófagos antiinflamatorios (M2) y restaurar la homeostasis, tal y como se ha comentado también en otras enfermedades inmunomediadas, donde la polarización del perfil de los macrófagos desempeña un papel básico en su patogénesis (Hidalgo-García *et al.*, 2018) (figura 6).

Asma felino

El gato es una especie que desarrolla asma de manera natural y frecuente (hasta el 5 % de la población), de forma parecida a la especie humana. Manifiesta cuadros recurrentes, hiperreactividad de las vías respiratorias, obstrucción del flujo de aire, inflamación eosinofílica y remodelación. El desencadenante es una respuesta polarizada Th2, que origina una reacción de hipersensibilidad tipo I o alérgica frente a alérgenos ambientales, con liberación de IL-4 e IL-5. Dichas citoquinas estimulan la producción de IgE por los linfocitos B, la proliferación de mastocitos (responsables de la respuesta tardía y del daño sobre el árbol bronquial) (Quimby *et al.*, 2018).

Actualmente, se ha demostrado que la administración de MSC en casos de asma modula el ambiente local a través de un mecanismo paracrino de liberación de diferentes citoquinas con propiedades antiinflamatorias y “despolariza” la respuesta Th2 frente a los alérgenos. El mecanismo propuesto de acción es múltiple:

- Por un lado, a través de la secreción del antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) reduce la inflamación alveolar, inhibiendo la proliferación de linfocitos IL-1-dependientes y la secreción de TNF- α . El ambiente inflamatorio también las estimula para secretar prostaglandina-E2 que promueve a los macrófagos para secretar la interleucina antiinflamatoria 10.

- Por otro lado, su efecto es complementado por mecanismos reparadores. De esta manera, la apoptosis de las células alveolares epiteliales que se produce progresivamente es inhibida por mecanismos epigenéticos inducidos por las MSC al promover la activación del gen antiapoptótico *Bcl-2*. A ello se suma la acción de diferentes factores de crecimiento epiteliotróficos secretado por las MSC, que estimulan la proliferación y restitución del epitelio alveolar.

Las rutas habituales de administración son la vía intratraqueal o intravenosa. Sin embargo, la vía intravenosa presenta mayores ventajas, gracias a las particularidades de la biodistribución de las propias MSC que quedan atrapadas en la vasculatura pulmonar antes de que las células lleguen a otros órganos, lo que hace del pulmón un órgano importante de almacenamiento tras su implantación. Esto facilita un enfoque factible y prometedor del tratamiento con este tipo celular en enfermedades pulmonares.

Clínicamente, la administración múltiple de MSC demostró a los 9 meses un efecto retardado en la reducción de la inflamación de las vías respiratorias, con disminución de los porcentajes de eosinófilos, de hiperreactividad y de remodelación de las vías respiratorias (Trzil *et al.*, 2014) (figura 7).



Figura 4. Episiolisis de la cabeza femoral en un paciente felino. Resultado a los 5 meses de la terapia con células madre mesenquimales vía intraarticular.



Figura 5. Resultado a los 4 meses de la terapia con MSC en paciente con gingivostomatitis crónica felina refractaria.

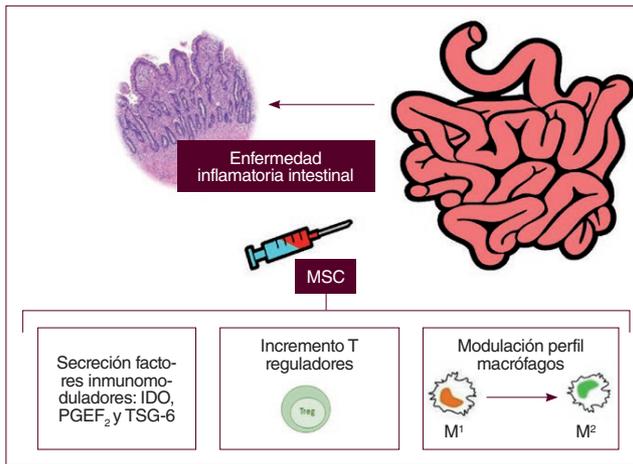


Figura 6. Mecanismo de acción de la inmunoterapia con células madre mesenquimales en la enfermedad inflamatoria intestinal: secreción de diferentes mediadores antiinflamatorios, activación de T reguladores y modulación de la polarización de los macrófagos.

► **Enfermedad renal crónica**

El riñón es un órgano complejo, compuesto por varios tipos de células dentro de un marco estructural único. En los últimos años, la identificación de diversos tipos de células madre en el riñón ha dado lugar a nuevas estrategias para regenerar las nefronas dañadas, algo que se ha convertido en uno de los grandes retos de la medicina regenerativa.

En el glomérulo se encuentran las células madre residentes en el polo urinario de la cápsula de Bowman en forma de podocitos. En el extremo distal de los túbulos proximales existe una población de células madre resistente a la isquemia. Por último, se han descrito en la base de

las renales. Por otro lado, desencadenan importantes mecanismos de neoangiogénesis estimulada a través de factores de crecimiento vascular, y mejoran el estrés oxidativo propio de esta enfermedad (Quimby *et al.*, 2015).

Actualmente, dado el impacto que suponen las enfermedades renales y la dificultad de su tratamiento, se están realizando importantes esfuerzos en investigación con el objetivo de lograr la implantación futura de novedosas técnicas regenerativas que van desde el uso de exosomas, la utilización de las MSC como inmunomoduladores que eviten el rechazo en el trasplante renal o la creación artificial de riñones a partir de órganos descelularizados y células modificadas genéticamente (Bochon *et al.*, 2019).

La administración de MSC en casos de asma modula el ambiente local a través de un mecanismo paracrino de la liberación de diferentes citoquinas con propiedades antiinflamatorias y “despolariza” la respuesta Th2 frente los alérgenos.

la papila células madre que responden al daño renal que generan células que pueden migrar al resto del tejido.

En la enfermedad renal crónica (ERC) el riñón tiene mermado su potencial regenerativo a causa de los continuos daños, sin que exista un tratamiento efectivo para prevenir la progresión a insuficiencia renal terminal. Esta pérdida de capacidad reparadora se ve, además, influida de manera negativa por múltiples factores que pueden contribuir a una disfunción de las propias MSC, como una edad avanzada, estados inflamatorios crónicos o la uremia.

Actualmente, los avances más importantes en regeneración renal en medicina veterinaria se desarrollan en la especie felina, en la que la administración de MSC ha demostrado buenos resultados funcionales en la ERC. Estos resultados se traducen en una mejora significativa de la función renal (disminución de las concentraciones séricas de creatinina y proteína en la orina y aumento de su densidad relativa), así como un efecto nefroprotector, que estabiliza la condición clínica y retrasa la progresión de la enfermedad (Vidane *et al.*, 2017).

Las MSC, a través de sus efectos paracrinos, favorecen una actividad proangiogénica, antiinflamatoria y antifibrótica (Hickson *et al.*, 2016) (figura 8).

Tras su administración (vía sistémica, intraperitoneal o en la arteria renal), las MSC migran al riñón e inhiben la apoptosis de las células renales mediante un efecto antiinflamatorio o inmunomodulador además de potenciar la proliferación de célu-

6 **Queratitis eosinofílica**

La queratitis eosinofílica felina (QEF) es una queratopatía crónica, de difícil curación y causada por una respuesta inmunitaria local secundaria a un posible estímulo antigénico que desencadena una importante proliferación celular sobre la superficie corneal. Se produce, por tanto, una respuesta 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 mediada por citoquinas, como la IL-4 e IL-5, que favorecen el infiltrado inflamatorio compuesto fundamentalmente por eosinófilos y con presencia concomitante de algunos mastocitos y células plasmáticas a nivel corneal.

En el globo ocular residen diferentes tipos de MSC (limbo basal, estroma corneal, malla trabecular, coroides y grasa periorbitaria), responsables de la regeneración/repación de las estructuras donde se ubican. Gracias a sus efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios, las MSC han demostrado un enorme potencial en el tratamiento de enfermedades inmunomediadas y en la reparación de la superficie ocular a través de muy diferentes mecanismos, entre los que destacan:

- Inmunomodulación: regula las células T (CD4+ y CD8+) y células B y potenciando la activación de células T reguladoras (mediadores celulares de tolerancia inmunológica).

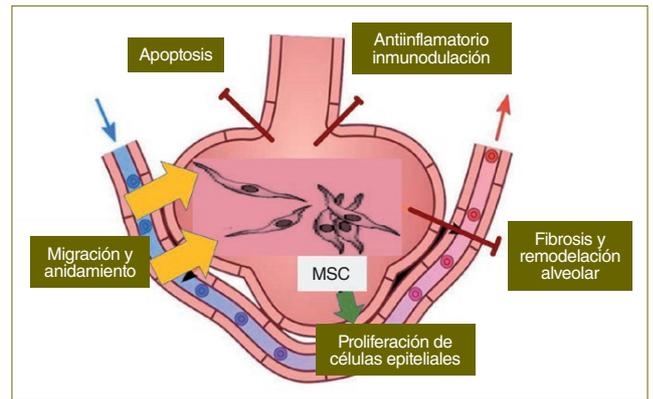


Figura 7. Células madre mesenquimales en la enfermedad pulmonar. Las MSC inducen la reparación/regeneración a través de diversos mecanismos paracrinos: inmunomodulación, estimulación de la proliferación del epitelio alveolar y disminución de su apoptosis.

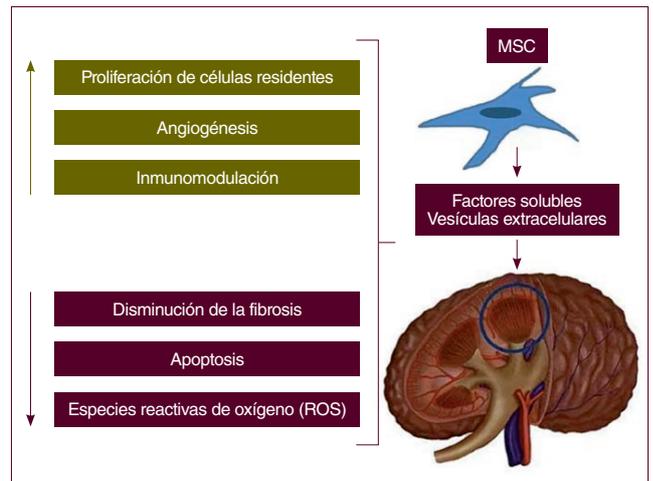


Figura 8. Mecanismos de acción de las células madre mesenquimales en la enfermedad renal. Las MSC disminuyen el daño e inducen la reparación/regeneración a través de diversos mecanismos paracrinos las MSC estimulan la reparación mediante efectos mitogénicos que estimulan las propias células madre residentes y potencian la angiogénesis; e inhiben la inflamación, los fenómenos oxidativos, la apoptosis y la fibrosis del tejido lesionado.



Figura 9. Resultado a los 4 meses de la terapia con células madre mesenquimales en un paciente con queratitis eosinofílica felina.

- Antiangiogénesis en la superficie ocular: a través del incremento de la expresión de trombospondina-1 (poderoso factor antiangiogénico) y la disminución de la metaloproteína 2 (potente factor proangiogénico relacionado con la inflamación).
- Regeneración de la superficie ocular: disminuyen la infiltración de neutrófilos y macrófagos y facilitan la recuperación epitelial, de las glándulas de Meibomio y de las células caliciformes.
- Antifibrosis: mediada a través de diversos factores solubles antiinflamatorios secretados, modula la migración de fibroblastos corneales (queratocitos estromales activados) y, con ello, evita la formación de cicatrices y escaras en la superficie corneal (Villatoro *et al.*, 2017). Los resultados del protocolo de tratamiento con terapia con MSC en la QEF realizado por los autores demuestran una importante mejoría clínica y resolución de los signos oculares durante al menos 11 meses (Villatoro *et al.*, 2018) (figura 9). □

Conclusión

El empleo clínico de MSC en medicina felina abre nuevas perspectivas terapéuticas en diversas enfermedades inmunomediadas que actualmente presentan limitadas opciones de tratamiento, y ha demostrado ser una técnica simple, eficaz y sin efectos secundarios.

La adecuada selección de la enfermedad, los factores relacionados con el paciente (edad, estado sanitario, etc.) y la medicación, entre otros, son parámetros fundamentales para individualizar el tratamiento, decidir la fuente celular, la vía de administración y el número de aplicaciones que incrementen el éxito de esta terapia.

Bibliografía disponible en www.argos.grupoasis.com/bibliografias/celulasmadre219.doc