

Medicina regenerativa en patologías de la superficie ocular en oftalmología veterinaria

En la última década, la medicina regenerativa ha supuesto una novedosa alternativa terapéutica para reparar o regenerar lesiones en tejidos oculares afectados por enfermedad o trauma.

**Antonio J Villatoro Jiménez^{1,2,3},
Viviana Fernández Gensini^{1,2},
Fernando Fariñas Guerrero¹,
José Becerra Ratia^{2,3,4}**

¹ImmuneStem. Instituto de Inmunología Clínica y Terapia Celular. Málaga. España. www.immunestem.com

²Labret. Laboratorio de Bioingeniería y Regeneración Tisular. Departamento de Biología Celular. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga. Málaga. España.

³Bionand. Centro Andaluz de Nanomedicina y Biotecnología. Parque Tecnológico de Andalucía. Málaga. España.

⁴Ciber bnn. Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina. Imágenes cedidas por los autores

En este artículo vamos a revisar de una manera práctica las diferentes y más habituales estrategias terapéuticas empleadas actualmente en oftalmología veterinaria en la reparación/regeneración de la superficie ocular.

Biomateriales

El empleo de diferentes tejidos de origen biológico, como biomateriales, ha sido una de las primeras terapias regenerativas empleadas en oftalmología veterinaria. Tejidos como pericardio, cápsula renal, omento, mucosa oral o membrana amniótica han sido utilizados en reparación de lesiones de la superficie corneal.

De todos ellos, la membrana amniótica sigue siendo universalmente la más aceptada como sustitutivo conjuntival y es en ella en la que vamos a profundizar.

Membrana amniótica (MA)

La MA (*figura 1*) fue empleada por primera vez por Roth en el año 1940, en quemaduras oculares en el ser humano. Fue en 1998 cuando Barros y colaboradores describieron su uso por primera vez en oftalmología veterinaria.

La MA es la capa interna de la placenta. Histológicamente está compuesta de una lámina epitelial, una membrana basal y un estroma avascular. Contiene grandes cantidades de colágeno de diferentes tipos (I,

Las patologías de la superficie ocular representan el motivo de consulta más frecuente en oftalmología veterinaria.

La medicina regenerativa emplea diferentes estrategias terapéuticas, que se pueden dividir en tres pilares fundamentales y que son empleadas solas o asociadas entre ellas:

- Biomateriales: diversos tipos de componentes empleados fundamentalmente como soporte o andamio para favorecer la integración y reparación tisular (ejemplo: membrana amniótica).
- Moléculas bioactivas: diferentes componentes, con gran variedad de funciones biológicas, que actúan como inductores en la reparación/regeneración tisular (ejemplo: suero autólogo o plasma rico en plaquetas).
- Células: fundamentalmente distintos tipos de células madre, procedentes de diferentes fuentes.

Su similitud con la conjuntiva hace que la membrana amniótica sea un eficaz sustitutivo para el tratamiento de diversas condiciones que cursan con pérdida de la continuidad de la superficie ocular; ya que actúa como sustrato que facilita la migración, proliferación y diferenciación de las células epiteliales.



Figura 1. Medicina regenerativa en superficie ocular en oftalmología veterinaria.

Comparación entre los componentes de lágrimas y suero autólogo

	Lágrimas	Suero autólogo
pH	7,4	7,4
Osmolaridad	298-300	296
Agua (%)	98	91
Albúmina (g/dl)	0,39	4 – 5,3
Globulinas (g/dl)	0,27	2,3
EGF (ng/ml)	0,2-0,3	0,1-0,2
TGF-β (ng/ml)	2-10	6-33
NGF (pg/ml)	107,5-468	54-401
IGF-1 (ng/ml)	1,33	15-17
VEGF (pg/ml)	-	34,7-160
Vitamina A (ng/ml)	16	372
Vitamina C (mg/ml)	0,117	0,02
Lisozima (mg/ml)	1,4	6
Fibronectina (mg/ml)	21	30-205
Lactoferrina (ng/ml)	1650	266

III, IV, V y VII), proteoglicanos, laminina, fibronectina, citocinas y diferentes factores de crecimiento. Actualmente la comercializada para su empleo en veterinaria suele proceder de placenta de bovinos o equinos.

Su similitud con la conjuntiva hace que la MA sea un eficaz sustitutivo para el tratamiento de diversas condiciones que cursan con pérdida de la continuidad de la superficie ocular, ya que actúa como sustrato que facilita la migración, proliferación y diferenciación de las células epiteliales. Por otro lado, evita la vascularización de la superficie corneal y previene la apoptosis de las células epiteliales corneales.

Se le atribuyen diferentes actividades:

- Antiinflamatoria: inhibe el sistema de señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF-β), ya que disminuye la producción de citocinas proinflamatorias como interleucinas (IL-1α, IL-2, IL-8), interferón (INF-λ) y factor de necrosis tumoral (TNF-α y TNF-β).
- Antiangiogénico: tanto por su acción antiinflamatoria como a través de la libe-

ración de factores antiangiogénicos como el receptor antagonista de IL-1, inhibidores tisulares de la metaloproteínasa, IL-10, trombospondina-1 y PEDF (factor derivado del epitelio pigmentario).

- Antifibrótico: de manera que la matriz estromal de la MA suprime la proliferación y diferenciación miofibroblástica de los fibroblastos corneales normales, limbares y conjuntivales a través de un mecanismo inhibitorio sobre el TGF-β, responsable de la activación fibroblástica. La MA ayuda a reducir la formación de cicatrices en la reparación de la superficie corneal.
- Antibacterianas y antivirales: por la presencia de diversos compuestos que promueven la inmunidad antimicrobiana como interleucinas, interferones, TNF-α, activina A, inhibina A, factor potenciador de crecimiento de células B, entre otros. Como factores que pueden condicionar su empleo, cabe resaltar la composición variable de la MA por las diferencias del donante y su preparación, que podrían influir en sus resultados.

Moléculas bioactivas

El uso de diferentes hemoderivados en el tratamiento de patologías de la superficie ocular ha dado lugar a un avance notable en el tratamiento de casos graves refractarios a terapia convencional. Actualmente, ►



Figura 2. Plasma rico en plaquetas activado y convertido en una matriz tridimensional de fibrina y liberadora de factores de crecimiento apta para ser aplicada sobre la superficie ocular.

- ▶ las preparaciones más comunes son el uso de suero autólogo y de plasma rico en plaquetas (Villatoro y col., 2017).

Suero autólogo (SA)

El suero es la fracción líquida de la sangre total obtenida después de su coagulación. Adecuadamente manipulado y preparado, es empleado en gotas para diferentes trastornos de la superficie ocular.

Su empleo ya fue descrito en 1975 para tratar lesiones por quemaduras en la superficie ocular humana. Las ventajas terapéuticas del uso de SA vienen dadas por su similitud con las lágrimas en ciertas características, como el pH, la osmolaridad y propiedades biomecánicas. Además de una función lubricante, el SA tiene funciones antiinflamatorias, antimicrobianas y epiteliotróficas a través de ciertas biomoléculas de su composición similar a las lágrimas naturales (ver *tabla*).

Las ventajas terapéuticas del uso de SA vienen dadas por su similitud con las lágrimas en ciertas características, como el pH, la osmolaridad y propiedades biomecánicas.

Cabe destacar en su composición factores de crecimiento como TGF- β , PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), EGF (factor de crecimiento epidérmico), NGF (factor de crecimiento nervioso), así como factores neurotróficos (sustancia P), citocinas, factores bacteriostáticos (lactoferrina, lisozima, inmunoglobulinas), fibronectina y vitamina A y E.

Algunos de ellos tienen una concentración mayor que las lágrimas naturales, como la vitamina A, la lisozima, el TGF- β y la fibronectina, mientras que otros poseen concentración menor, como la inmunoglobulina A, EGF epitelial y vitamina C.

El TGF- β es conocido por tener propiedades antiproliferativas dependientes de la dosis, y sus niveles promedio son generalmente cinco veces mayores en el SA que en lágrimas naturales, por lo que generalmente se recomienda su empleo a una dilución del 20 % para evitar el efecto potencialmente dañino de retraso de la curación de lesiones corneales.

En oftalmología humana, a pesar de los muchos estudios clínicos que demuestran su eficacia, no existe un protocolo estándar para su obtención. Particularidades individuales, estado de salud del paciente, recolección de sangre completa, protocolo de producción, dilución, almacenamiento y regímenes de tratamiento, se han descrito como factores que afectan la composición y la eficacia del producto, lo que lleva a la variabilidad en los resultados. Sin embargo, la presencia de leucocitos durante el procedimiento de preparación aumenta el nivel de citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-1, TNF- α , etc.), lo que, añadido a la presencia de inmunoglobulinas y complemento, puede ser perjudicial para muchos pacientes que sufren alteraciones inmunológicas. A pesar de su empleo en oftalmología veterinaria, son necesarios más estudios para la protocolización de su obtención y conservación.

Como consejos básicos para su empleo, el SA debe almacenarse congelado a -20 °C, descongelarse antes de su empleo y mantenerse en el refrigerador a +4 °C durante su uso. Las gotas oculares de SA, deben aplicarse en los tres meses posteriores a la fecha de producción, y los viales se deben mantener alejados de la luz

para evitar la degradación de la vitamina A. Considerar que la falta de conservantes, teóricamente, aumenta el riesgo de infecciones oculares.

Plasma rico en plaquetas (PRP)

Bajo el término genérico de PRP se incluyen una variedad de productos derivados de la propia sangre del paciente

obtenidos por centrifugación, de los que se obtiene una fracción de plasma con una concentración de plaquetas más alta que la de la sangre circulante. Las plaquetas se pueden activar artificialmente y liberar su contenido alojado en los gránulos alfa, que son ricos en una gran cantidad de proteínas y factores de crecimiento (EGF, PDGF, TGF- β , VEGF, IGF-1, HGF, NGF, PF-4, entre otros), involucrados en el proceso de reparación de la superficie ocular.

Dependiendo de su preparación, composición y, especialmente, de la concentración de plaquetas y presencia o ausencia de leucocitos, hay diferentes productos: plasma rico en factores de crecimiento (PRGF), plasma rico en plaquetas y factores de crecimiento (PRPGF), concentrado de plaquetas (PC), plasma rico en plaquetas y en leucocitos (LR-PRP), plasma rico en plaquetas y pobre en leucocitos (LP-PRP), entre otros.

Actualmente, en medicina humana el trasplante de LESC cultivadas permite restaurar la visión tras una lesión o enfermedad en la superficie ocular con afectación de la población celular del limbo esclerocorneal, y ha supuesto una auténtica revolución en la regeneración de la superficie corneal.

Actualmente, existen en veterinaria diferentes sistemas de preparación, lo que hace que sea difícil comparar sus resultados científicos en términos de eficacia y seguridad (Carr y col., 2016).

Su calidad y actividad biológica están directamente relacionadas con la composición celular (plaquetas, leucocitos y hematíes) del PRP, que condiciona las concentraciones de los factores de crecimiento y citocinas proinflamatorias:

- La concentración de plaquetas se correlaciona positivamente con todos los factores de crecimiento. Se considera que el PRP debe tener de 4 a 7 veces más concentración de plaquetas que la sangre circulante.
- Los componentes no plaquetarios de la sangre, en particular los glóbulos rojos y blancos, contribuyen de manera negativa en su actividad biológica, al participar en reacciones inflamatorias no deseadas, debido a la liberación de múltiples citocinas proinflamatorias.

En oftalmología humana, diferentes investigaciones han evaluado la seguridad y eficacia del uso de preparaciones de PRP en el tratamiento del ojo seco y reparación de la superficie ocular, y han demostrado una mejora en la calidad de la película lagrimal y la gravedad de los síntomas. En veterinaria son muy escasas las publicaciones relacionadas con su empleo en

oftalmología, donde sus resultados indican efectos beneficiosos sobre la proliferación y la capacidad de migración de las células epiteliales corneales en reparación de la superficie ocular (Rushton *et al.*, 2017).

Por tanto, la preparación del PRP dependerá de su aplicación clínica, cuyo objetivo será optimizar la concentración de plaquetas y leucocitos para lograr los mejores resultados terapéuticos (*figura 2*).

Células

Indudablemente, las células madre son la estrella en medicina regenerativa. Entre todos los tipos celulares candidatos a ser usados en terapia celular son dos los más empleados habitualmente en regeneración de la superficie corneal: células madre limbares y células madre mesenquimales (*figura 3*).

Células madre limbares (LESC)

Las LESC desempeñan un papel fundamental en la integridad de la superficie corneal, ya que intervienen en la renovación y reparación de la superficie ocular y, por tanto, mantienen su transparencia y, con ello, la visión.

Son la fuente primaria de las células del epitelio corneal, y residen en la capa basal de este epitelio a lo largo del limbo esclerocorneal, en una estructura llamada empalizada de Vogt. Desde su localización, y mediante una migración centripeta y crecimiento vertical (mecanismo X, Y, Z), se encargan de mantener la homeostasis del epitelio corneal (Thoft y col., 1983) (*figura 4*).

Otra función muy importante de las LESC es su interacción con otras células corneales, como las células estromales mesenquimales, que tienen un importante papel inmunosupresor. Por ello, la deficiencia de células madre se asocia frecuentemente con inflamación de la superficie corneal (*figura 5*).

En oftalmología humana está más que descrito el síndrome de insuficiencia limbar, tanto por disfunción como por destrucción de las propias LESC, responsable de la opacificación corneal a través de la conjuntivización y vascularización de la córnea transparente e ineficaz reparación de la superficie corneal.

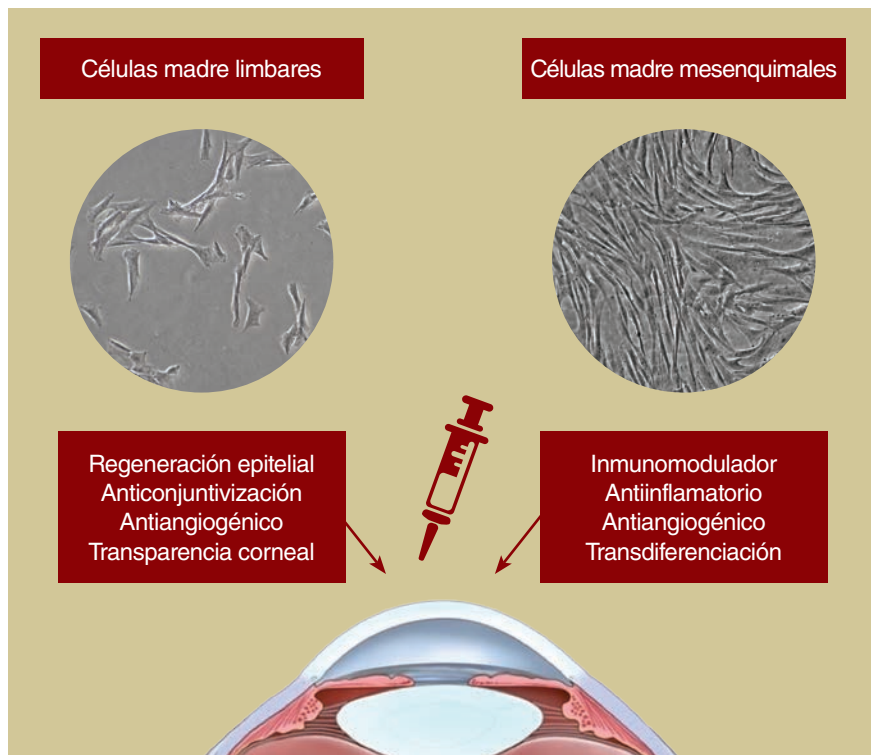


Figura 3. Tipos y mecanismos de acción de los principales tipos celulares empleados en terapia celular para la reparación de la superficie ocular en oftalmología veterinaria.

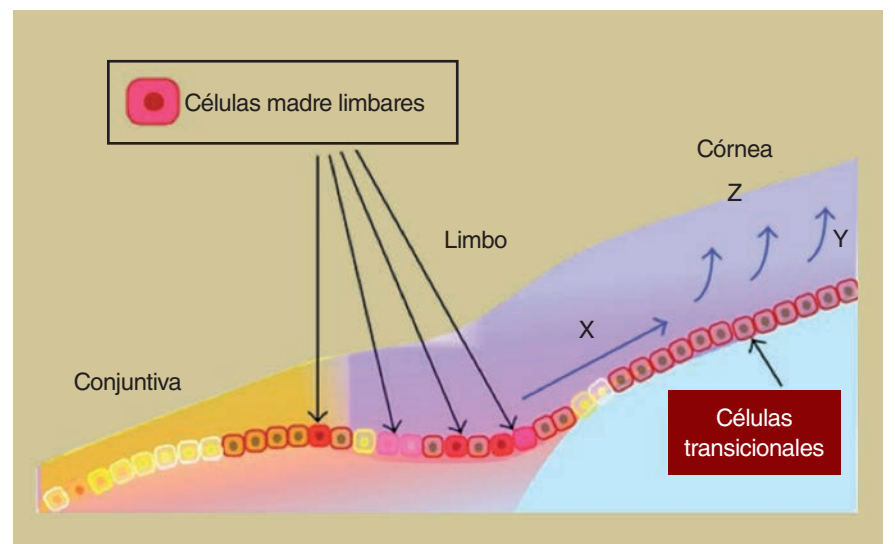


Figura 4. Células madre limbares. Están localizadas en la capa basal del limbo esclerocorneal. Las células transicionales (TA) son células progenitoras epiteliales que se diferencian desde las células madre limbares y migran hacia la córnea central. Desde su localización y mediante una migración centripeta y crecimiento vertical (mecanismo X, Y, Z) se encargan de mantener la homeostasis de la regeneración epitelial corneal.



Figura 5. Resultado de la terapia celular en un caso de leucoma corneal grave en perro con pérdida total de la transparencia corneal e hiperpigmentación.

► En nuestras mascotas, recientemente también se ha relacionado una variedad de enfermedades de la córnea con insuficiencia de LESC y, por tanto, con pérdida de visión, por opacificación/pigmentación y vascularización de la córnea, como en el simblefarón en gatos con Herpesvirus felino tipo 1, queratitis crónica superficial o queratitis pigmentaria en carlinos o en caso de daño químico en córnea (Sánchez y col., 2016).

Actualmente, en medicina humana el trasplante de LESC cultivadas permite restaurar la visión tras una lesión o enfermedad en la superficie ocular con afectación de la población celular del limbo esclerocorneal, y ha supuesto una auténtica revolución en la regeneración de la superficie corneal.

En medicina veterinaria, las aplicaciones de LESC en patología corneal son aún escasas y poco conocidas, pero sin duda están suponiendo una interesante alternativa en las patologías anteriormente citadas. Su implantación se realiza tanto vía subconjuntival como cultivadas sobre dife-

rentes biomateriales de soporte, dependiendo de las indicaciones clínicas (Nam y col., 2015) (Janjatović y col., 2015).

Células madre mesenquimales (MSC)

Las MSC desempeñan un papel fundamental como reservorio de células indiferenciadas para la regeneración/reparación de los tejidos donde se ubican. En el ojo están descritos distintos tipos de MSC, localizadas en limbo basal, estroma corneal, malla trabecular, coroides y grasa periorbitaria (Dhamodaran y col., 2014).

Cada vez existen más evidencias de que el mecanismo de acción de las MSC se realiza por efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios, a través de la liberación de una gran variedad de sustancias bioactivas con efectos autocrinos y paracrinos englobados en el concepto de secretoma. Entre todos sus efectos, la habilidad de modular el sistema inmunitario desempeña un papel fundamental en casi todos los efectos terapéuticos atribuidos a estas células. Dicha influen-

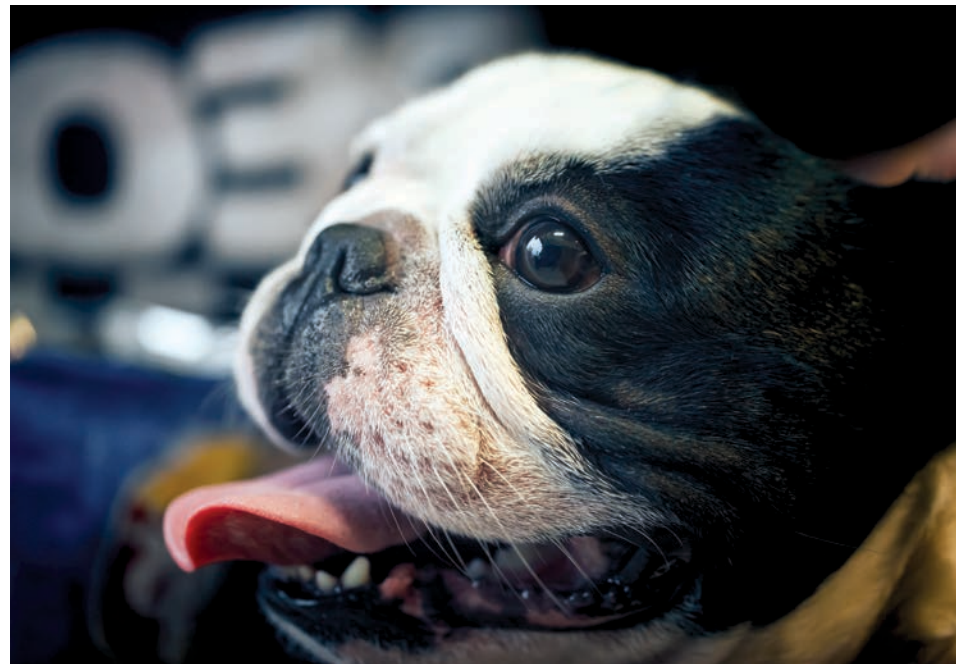
La implantación de MSC ha demostrado resultados muy interesantes en el tratamiento del ojo seco y en la regeneración de la superficie ocular, gracias a sus diversas capacidades.

cia es ejercida tanto sobre la inmunidad innata como adaptativa, a través de diferentes mecanismos, como es el contacto directo célula a célula y la secreción de diferentes sustancias solubles (IDO, NO, IL-10, PGE₂, TGF- β , etc.), que varían con la especie y la fuente celular.

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

La implantación de MSC ha demostrado resultados muy interesantes en el tratamiento del ojo seco y en la regeneración de la superficie ocular, gracias a sus diversas capacidades (figuras 3 y 5):

- Capacidad inmunomoduladora, mediante la regulación de las células T (CD4+ y CD8+), las células B y potenciando la generación y el mantenimiento de la actividad de diferentes tipos de células T reguladoras (mediadores celulares de tolerancia inmunológica).
- Capacidad antiangiogénica sobre la superficie ocular, al incrementar la expresión de trombospondina-1 (TSP-1, un poderoso factor antiangiogénico) y disminuir la de metaloproteína 2 (MMP-2, potente factor proangiogénico relacionado con la inflamación).
- Capacidad regenerativa de la superficie ocular, disminuyendo la infiltración de neutrófilos y macrófagos, facilitando la



Nuestro equipo demostró por primera vez el efecto terapéutico de la terapia celular con MSC, implantadas alrededor de las glándulas lagrimales en perros con QCS primaria refractaria al tratamiento convencional.

Futuras perspectivas

Es indudable que la evolución de nuevas técnicas relacionadas con la medicina regenerativa e ingeniería tisular es imparable y nos va a permitir el desarrollo de productos, medicamentos y terapias que hasta hace unos días eran impensables.

En lo relativo a la superficie ocular, cabe destacar el desarrollo de nuevos biomateriales para la protección de la misma, o bien que permitan la liberación constante de medicamentos o el desarrollo de córneas artificiales de distintos componentes (queratoprostesis) desarrolladas por cultivo celular en el laboratorio a partir de distintos tipos celulares, que permita eliminar el rechazo.

En el uso de nuevas moléculas existe un enorme avance en la utilización de diferentes productos secretados por las propias células o asociados a nanopartículas (<100 nm) para permitir su integración en la propia superficie ocular. Nuestro equipo trabaja actualmente en el empleo de exosomas producidos por MSC (microvesículas de menos de 30 nm) en reparación de superficie ocular sin necesidad de uso de las propias células.

Por último, la modificación genética de distintos tipos celulares (terapia génica), para potenciar algunas de sus capacidades, abre otra puerta de esperanza para el tratamiento de aquellas patologías con difícil solución tanto en oftalmología humana como en veterinaria. □

recuperación epitelial, de las glándulas de Meibomio y de células caliciformes.

- Capacidad antifibrótica, tanto por su efecto antiinflamatorio a través de su secretoma como modulando de manera muy importante la migración de fibroblastos corneales (queratocitos estromales activados) y, con ello, la formación de cicatrices y escaras en la superficie corneal (que es la complicación más grave de la cicatrización corneal).

Nuestro equipo demostró por primera vez el efecto terapéutico de la terapia celular con MSC, implantadas alrededor de las glándulas lagrimales en perros con QCS primaria refractaria al tratamiento convencional. Los resultados demostraron que el 75 % de los animales tratados manifestó una mejoría significativa de la producción lagrimal y de los signos oculares (secreción ocular, hiperemia y daños de la superficie corneal) al menos durante 9 meses. (Villatoro y col., 2015) (figura 6).

Otros estudios demostraron que el uso de MSC en ojo seco mejoró el volumen y la estabilidad de la película lagrimal, así como la regeneración epitelial, incrementando el número de células caliciformes y disminuyendo el número de glándulas de meibomio lesionadas. Además, disminuyó la cantidad de células T CD4+ y factores proinflamatorios (IL-2, IFN- γ , IL-17 y MMP-2) y se incrementó el número de células T reguladoras, lo que detuvo la progresión del proceso (Li y col., 2016).

Bibliografía:

- Barros PS, García JA, Laus JL, Ferreira AL, Salles Gomes TL. The use of xenologous amniotic membrane to repair canine corneal perforation created by penetrating keratectomy. *Vet Ophthalmol.* 1998;1(2-3):119-23.
- Villatoro AJ, Fernandez V, Claros S, Alcoholado C, Cifuentes M, Merayo-Lloves J, et al. Regenerative Therapies in Dry Eye Disease: From Growth Factors to Cell Therapy. *Int J Mol Sci.* 2017;18(11).
- Carr BJ, Canapp SO, Mason DR, Cox C, Hess T. Canine Platelet-Rich Plasma Systems: A Prospective Analysis. *Front Vet Sci.* 2015;2.
- Rushton JO, Kammergruber E, Tichy A, Egerbacher M, Nell B, Gabner S. Effects of three blood derived products on equine corneal cells, an in vitro study. *Equine Vet J.* 2017.
- Sanchez RF, Daniels JT. Mini-Review: Limbar Stem Cells Deficiency in Companion Animals: Time to Give Something Back? *Curr Eye Res.* 2016;41(4):425-32.

- Nam E, Fujita N, Morita M, Tsuzuki K, Lin HY, Chung CS, et al. Comparison of the canine corneal epithelial cell sheets cultivated from limbar stem cells on canine amniotic membrane, atelocollagen gel, and temperature-responsive culture dish. *Vet Ophthalmol.* 2015;18(4):317-25.
- Janjatović, AK; Mršić, G y col. Subconjunctival application of allogenic limbar cells in dogs with corneal disorders. *Veterinarski Arhiv.* 2015; 85 (5), 547-561, 2015
- Dhamodaran K, Subramani M, Ponnalagu M, Shetty R, Das D. Ocular stem cells: a estatus update! *Stem Cell Res Ther.* 2014;5(2):56.
- Villatoro AJ, Fernandez V, Claros S, Rico-Llanos GA, Becerra J, Andrade JA. Use of adipose-derived mesenchymal stem cells in keratoconjunctivitis sicca in a canine model. *Biomed Res Int.* 2015;2015:527926.
- Li F, Zhao SZ. Control of Cross Talk between Angiogenesis and Inflammation by Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Ocular Surface Diseases. *Stem Cells Int.* 2016;2016:7961816.

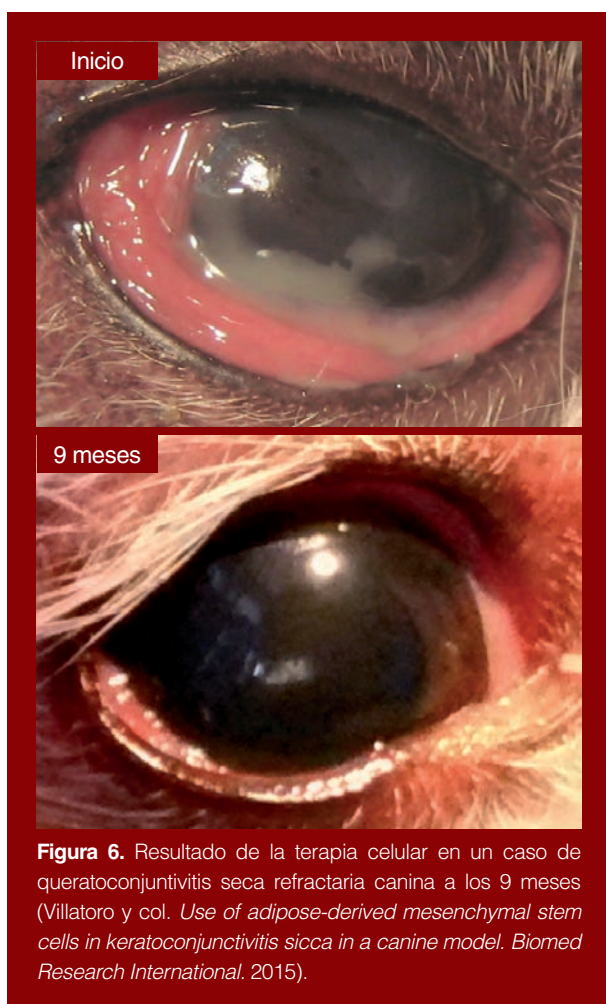


Figura 6. Resultado de la terapia celular en un caso de queratoconjuntivitis seca refractaria canina a los 9 meses (Villatoro y col. *Use of adipose-derived mesenchymal stem cells in keratoconjunctivitis sicca in a canine model. Biomed Research International.* 2015).