



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD
ANIMAL

USO DE CÉLULAS TRONCALES ALÓGENAS PARA EL
TRATAMIENTO DE UVEITIS RECURRENTE EQUINA

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

PRESENTA:
CAMACHO FLORES MONTSERRAT
ERANDI

TUTORA PRINCIPAL:
DRA. MARÍA MASRI DABA-FMVZ

COMITÉ TUTORAL:
DRA. AYTZEÉ ELOISA PIÑÓN CABRERA-FMVZ
DR. FRANCISCO JAVIER BASURTO ALCÁNTARA-FMV

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD
ANIMAL

USO DE CÉLULAS TRONCALES ALÓGENAS PARA EL
TRATAMIENTO DE UVEITIS RECURRENTE EQUINA

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

**PRESENTA: CAMACHO FLORES MONTSERRAT
ERANDI**

Tutora: Dra. María Masri Daba-FMVZ

Comité tutorial: Dra. Aytzeé Eloisa Piñón Cabrera-FMVZ

Comité tutorial: Dr. Francisco Javier Basurto Alcántara-FMVZ

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado a mi mamá, lo que soy, a donde me dirijo y mis logros profesionales son por y gracias a ti.

No menos importante al resto de mi familia y amigos. A todos y cada uno de ustedes les agradezco de corazón el apoyarme a cada paso, no podría nombrarlos a todos, la vida ha sido muy generosa en rodearme de gente increíble a cada segundo, esto también va por ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a la Dra. María Masri por expresar su apoyo e interés en el proyecto desde el primer día. Por permitirme usar las instalaciones de DITEQ para trabajar con los caballos del grupo control y por su grupo de trabajo, en especial a mi gran amiga Jennifer Michel, sin ella gran parte de la fase experimental no hubiera sido posible.

A mi comité tutor, al Dr. Francisco Basurto por creer en mí y mostrar su apoyo en cada momento y a la Dra. Aytzeé Piñón por cada enseñanza.

Quiero agradecer al Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra y al Dr. Ricardo Gómez por abrirme las puertas de tan honorable institución y trabajar mis muestras.

Al Dr. Sergio Hayen, no hay palabras suficientes que puedan expresar lo agradecida que estoy con él y el Rancho Sayavedra; sin olvidar a su equipo de trabajo, el cual estuvo conmigo a cada paso de la recolección de cordones umbilicales.

Por supuesto gracias a la Dra. Ana Rodríguez por ayudarme a correr mis muestras en el Multiplex del Departamento de Reproducción de la FMVZ-UNAM, siempre fue sumamente atenta y comprensiva.

Gracias infinitas a Nuria Galindo, ¡su ayuda fue invaluable!

Por último, a los miembros del Departamento de Medicina, Cirugía y Zootecnia para Équidos por su aliento constante, gracias.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo se enfocó en medir la variabilidad de distintas citocinas involucradas en la uveítis recurrente equina por medio de ensayos multiplex. Lo anterior se llevó a cabo tras obtener gelatina de Wharton de 26 partos equinos y su posterior cultivo para conseguir células troncales mesenquimales de cordón umbilical. Las células se caracterizaron por medio de diferenciación celular y citometría de flujo. Más adelante se inyectaron 5 millones de células troncales en P3 vía subpalpebral, tanto a caballos enfermos como a un grupo control sano. Por último, se tomaron muestras lagrimales previo y posterior a su inyección para así comparar los factores solubles que se deseaban cuantificar.

Los resultados del ensayo multiplex no encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el conjunto de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en distintos tiempos y entre los grupos de estudio; se observó en un caso mejoría clínica tras el paso de 7 días postratamiento. Lo anterior puede deberse a múltiples causas, tales como la vía de administración elegida, la cantidad de células troncales mesenquimales utilizadas, la cantidad de veces que se inyectaron o los momentos en que se colectaron las lágrimas.

En conclusión, la inyección subpalpebral de células troncales mesenquimales de cordón umbilical en la dosis y frecuencia utilizada, no parece ser tan eficiente para controlar los signos de uveítis recurrente equina, en comparación con otros trabajos ya publicados. Esto abre camino a nuevas y distintas aproximaciones para encontrar la vía, dosis y frecuencia ideal de éstas para controlar esta y otras enfermedades.

PALABRAS CLAVE: Células troncales Mesenquimales, Uveítis Recurrente, Equina.

ABSTRACT

The purpose was to investigate the variability of different cytokines involved in equine recurrent uveitis by means of multiplex assays. This was carried out after obtaining Wharton's gelatin from 26 equine births and its subsequent cultivation to obtain mesenchymal stem cells from the umbilical cord. The cells were characterized through cell differentiation and flow cytometry. Later, 5 million stem cells on P3 were injected via subpalpebral, both sick horses and a healthy control group. Finally, tear samples were taken before and after injection in order to compare the soluble factors to be quantified later on using the multiplex.

The results of the multiplex assay did not find statistically significant differences when comparing the set of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines at different times and between the study groups; however, clinical improvement was observed in one case after 7 days post-treatment. This can be due to multiple causes, such as the chosen route of administration, the number of mesenchymal stem cells used, the number of times they were injected or the times when tears were collected.

In conclusion, the subpalpebral injection of umbilical cord mesenchymal stem cells in the dose and frequency used does not seem to be as efficient to control the signs of recurrent equine uveitis, compared to other published studies. This allows us to develop new and different approaches to find the ideal route, dose and frequency of these to control this and other diseases.

Key words: Stromal stem cells, Recurrent equine uveitis

ÍNDICE

LISTA DE CUADROS.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
REVISIÓN LITERARIA Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	9
Anatomía de la úvea.....	9
Uveítis recurrente equina.....	12
Células troncales.....	23
Capacidad inmunomoduladora de CTM.....	25
Antecedentes.....	30
JUSTIFICACIÓN.....	33
HIPÓTESIS.....	34
OBJETIVO GENERAL.....	35
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
MATERIAL Y MÉTODOS.....	36
Obtención y cultivo de células troncales mesenquimales.....	37
Caracterización de células troncales mesenquimales.....	41
Muestra lagrimal e inyección de CTM.....	45
Ensayo Multiplex.....	47
Análisis estadístico.....	49
RESULTADOS.....	50
DISCUSIÓN.....	60
CONCLUSIONES.....	68
ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS.....	69
REFERENCIAS.....	71

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Hoja de examinación física general y oftálmica.....	44
Cuadro 2. Expresión de la totalidad de muestras de marcadores de CTM.....	51
Cuadro 3. Histogramas de marcadores de superficie en CTM.....	52
Cuadro 4. Comparación de citocinas entre grupos.....	58
Cuadro 5. Comparación de citocinas en tiempo.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Recolección de cordones umbilicales inmediatamente posparto.....	38
Figura 2. Cordón umbilical equino en Tricrómica de Masson.....	39
Figura 3. Procesamiento de muestras umbilicales en el INR.....	40
Figura 4. Evaluación oftalmológica e inyección de CTM.....	46
Figura 5. Ensayo Multiplex.....	48
Figura 6. CTM equinas.....	50
Figura 7. Tinciones positivas posterior a la diferenciación de CTM.....	53
Figura 8. Endrick pretratamiento.....	54
Figura 9. Endrick postratamiento.....	55
Figura 10. Faraón pretratamiento.....	56
Figura 11. Faraón postratamiento.....	56

INTRODUCCIÓN

Los novedosos tratamientos con células troncales mesenquimales (CTM) han cautivado a la comunidad científica, sin embargo, la información con la que se cuenta hoy en día no ha sido suficiente para utilizarlas de manera cotidiana. En la medicina veterinaria se han utilizado con menos restricciones que en la medicina humana, considerada aún en fase experimental, esto no significa que puedan utilizarse de manera arbitraria (Gugjoo, 2019). El efecto terapéutico que tienen ha sido comprobado ya en modelos animales y distintas enfermedades inmunomediadas, pero necesitan responderse aun distintas preguntas antes utilizarlas rutinariamente; como la vía de administración ideal, la cantidad de células adecuada, los posibles efectos adversos y su eficiencia a largo plazo (Gilger, 2017). La uveítis recurrente equina por definición es la inflamación del tracto uveal del ojo equino, es una enfermedad inmunomediada y la principal causa de ceguera en la especie. Por lo anterior este trabajo plantea que las células troncales mesenquimales de cordón umbilical equino inyectadas subpalpebralmente podrían tener un efecto inmunomodulador y en estos pacientes disminuirá el proceso inflamatorio que causa dicha enfermedad. Este trabajo pretende medir la variabilidad de ciertas citocinas involucradas por medio de ensayos multiplex tras su aplicación.

REVISIÓN LITERARIA Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

ANATOMÍA DE LA ÚVEA

Para poder entender la uveítis recurrente equina (URE), se necesita profundizar en las bases anatómicas de las estructuras que componen la úvea dentro del ojo. Ésta se encuentra entre la esclera y la retina, se compone de células pigmentarias, fibras elásticas, plexos nerviosos y una red densa de vasos sanguíneos. Este tracto altamente vascular se compone de tres estructuras oculares: el iris, cuerpo ciliar y coroides (Gilger, 2017; König, 2009; Brooks, 2008).

Iris.-

Es la porción anterior del tracto vascular, separando el espacio entre la córnea y el cristalino en cámara anterior y posterior. Funciona como un obturador al regular la cantidad de luz que entra hacia el segmento posterior hasta la retina, por una apertura central conocida como **pupila**. El iris es un anillo formado de tejido altamente vascularizado, melanocitos y fibroblastos. Su estroma contiene racimos de fibras de colágeno, vasos sanguíneos, células pigmentarias, fibras nerviosas y de músculo liso. Posee dos músculos lisos, el esfínter y el dilatador del iris, los cuales regulan la cantidad de luz que entra. Orientado circunferencialmente se encuentra el **músculo del esfínter del iris**, recibe inervación parasimpática, y da la forma horizontal característica de la especie durante la miosis; este músculo se encuentra cerca del margen libre del iris, a la periferia pupilar. Por otro lado, el **músculo dilatador del iris**, se encuentra inmediatamente posterior al estroma, se compone de fibras musculares radiales, formando una malla en su porción posterior y es inervado por fibras simpáticas. Los caballos presentan principalmente en el margen dorsal del iris, en contadas ocasiones ventralmente, crecimientos irregulares del epitelio posterior con capilares enrollados dentro conocidos como **corpora nigra** o granula irídica. (Gilger, 2017; Ku, 2017; König, 2009; Brooks, 2008)

Cuerpo ciliar.-

La porción media de la úvea, se encarga de la producción del humor acuoso por medio de la ultrafiltración del plasma. Se encuentra posterior a la base del iris, y tiene una forma triangular al verla transversalmente. Desde la cavidad vítrea se divide en la **pars plicata** (anterior) y la **pars plana** (posterior), es un anillo desde el cual crestas y procesos ciliares irradian hacia el cristalino, formando los bordes laterales de la cámara posterior. La pars plicata es la porción más prominente, tiene apariencia plegada dada por los procesos ciliares. Los caballos, quienes presentan una cámara anterior grande, tienen más procesos que otras especies, asemejando crestas romas. De los procesos se extienden las fibras zonulares hasta el ecuador del cristalino y lo fijan en su posición suspendida. Mientras la pars plana es la porción posterior del cuerpo ciliar, es relativamente lisa y se extiende desde la pars plicata hasta la periferia de la retina. La superficie interna del cuerpo ciliar, la cual tiene contacto con el vítreo, está revestida de una doble capa de células epiteliales; la interna se conoce como **epitelio no pigmentado** del cuerpo ciliar, converge con la retina sensorial y la capa más interna del epitelio del iris posterior. La segunda capa celular es el **epitelio pigmentado** del cuerpo ciliar, contiguo al epitelio retinal y la capa más externa del epitelio posterior del iris. Debajo del epitelio del cuerpo ciliar, cada proceso presenta tejido conectivo y un plexo vascular fenestrado que permite la fuga de plasma al estroma del cuerpo ciliar, las capas epiteliales lo filtran eliminando proteínas y células. Formando la base del triángulo, se encuentran los **músculos ciliares**, músculos lisos orientados circunferencialmente e inervados parasimpáticamente. Éstos permiten que el cristalino cambie su forma y enfoque, pero a diferencia de los carnívoros, en caballos presenta un acomodo pobre. Al contraerse los músculos ciliares, las fibras zonulares se relajan permitiendo al cristalino engrosarse pasivamente, dado por la inervación parasimpática, mientras que impulsos simpáticos causan su relajación. (Gilger, 2017; Ku, 2017; König, 2009; Brooks, 2008)

Coroides. -

El aspecto posterior uveal envuelve la parte posterior del ojo entre la retina y la esclera, siendo el aporte sanguíneo principal de la retina en equinos. Se divide en dos capas: la **externa/vascular** y la **interna/coroidocapilar**. La externa forma una conexión laxa entre la coroides y la esclera, sus vasos sanguíneos proveen de soporte a la capa interior neuronal de la retina, y se conocen como **arterias ciliares** y **venas vorticosas**, las cuales mandan ramas a la capa interna. Esta capa se forma de una densa red capilar responsable de la nutrición de la capa externa de la retina. Dorsal al disco óptico hay un área en forma de media luna que tiene una capa adicional reflectora entre la capa externa y la interna, el **tapetum lucidum**. El tapetum varía de color (azul-verdoso al amarillo) dependiendo del color del pelaje y el iris, dando una apariencia iridiscente al ojo. Posee bastones cristalinos altamente reflectores, lo que multiplica el estímulo luminoso en los receptores sensibles a la luz de la retina, mejorando la visión nocturna. En esta área corren arteriolas coroides para nutrir a la retina, las cuales, durante el examen, aparecen como puntos pequeños, conocidos como **estrellas de Winslow**. (Gilger, 2017; König, 2009; Brooks, 2008)

La úvea al ser el mayor suministro de sangre en el ojo tiene contacto directo con la vasculatura periférica, existe entonces la posibilidad de que enfermedades sistémicas afecten también al globo ocular, por lo que la naturaleza diseñó una barrera para evitar este tipo de adversidades conocida como **barrera hemato-ocular**. Ésta impide que ciertas moléculas o células entren al ojo y pierda su estado inmunoprivilegiado. La barrera consiste en una porción hemato-acuosa, refiriéndose a uniones estrechas entre células epiteliales no pigmentadas del cuerpo ciliar y vasos sanguíneos no fenestrados del iris; y una porción hemato-retinal, formada por uniones estrechas de las células epiteliales pigmentadas de la retina y vasos sanguíneos no fenestrados. Debido a traumas o infecciones la barrera puede verse involucrada y permitir el paso de una respuesta inmune, sangre y células causantes

de daño considerable al globo ocular, siendo importante denotar que el ojo equino no tolera ningún tipo de daño. (Gilger, 2017 Brooks, 2008)

UVEITIS RECURRENTE EQUINA

El tracto uveal es responsable de la suspensión y acomodación del cristalino, regulación del tamaño pupilar, producción del humor acuoso, drenaje y nutrición del ojo, así como de diversas respuestas inmunes. (König, 2009; Brooks, 2008)

Por definición la uveítis es la inflamación del tracto uveal del ojo, es un síndrome multietiológico e inmunomediado por Th1. La uveítis a su vez se subdivide en anterior cuando la inflamación abarca al iris y cuerpo ciliar, mientras que la posterior es al verse afectada la coroides y la retina. Sin embargo, comúnmente en los caballos todas las estructuras se inflaman, en estos casos se habla de una panuveítis; la inflamación puede ser aguda, crónica o recurrente, siendo esta última conocida como uveítis recurrente equina o URE. (Gilger, 2017; Gerding, 2016)

La URE, también conocida como ceguera lunar, oftalmia periódica o iridociclitis recurrente, es la causa principal de ceguera en caballos, sin predilección de género o edad. Es una panuveítis inmunomediada con una prevalencia en EUA aproximada del 2-25%.

Se caracteriza por episodios de inflamación intraocular recurrente, los cuales son separados por periodos de quiescencia, periodos donde no hay signos de inflamación activa aparente. Estos rebotes de inflamación se separan por semanas o años. Usualmente la URE se desarrolla tras un episodio de uveítis primaria, ya que cada caballo que desarrolla signos de uveítis está en riesgo de desarrollar URE, incluso pasados varios años del primer cuadro con uveítis primaria. Mas se ha visto que, si pasan 2 o más años sin episodio alguno, el riesgo de desarrollarla disminuye. (Gilger, 2017; Gerding, 2016; Witowski, 2016; Brooks, 2008)

Conforme su presentación se ha clasificado en clásica, insidiosa y posterior; adicionalmente, se separa según su cronicidad en agudo/activo, quiescente o crónico. La presentación más común es la clásica, involucrando episodios de inflamación ocular, seguido de periodos de quiescencia; después de un período variable de tiempo, que puede ir de semanas a años, viene otro ataque, aún más severo que el anterior. La insidiosa frecuentemente ocurre en Appaloosas y caballos de tiro, se caracteriza por ser subclínica, sin manifestar dolor, pero con una inflamación intraocular mínima, pero persistente con efecto gradual y acumulativo que conlleva a la degeneración de estructuras oculares y signos clínicos de URE crónico. La posterior afecta el vítreo, retina y coroides, observándose comúnmente en Warmbloods, caballos de tiro y caballos europeos. (Gilger, 2017; Witowski, 2016)

Dentro de la cronicidad se pueden englobar los signos presentes. En la activa/aguda se observa dolor e inflamación interna manifestado con blefaroespasmo, edema corneal leve a moderado, flama acuosa, hipopión, miosis, epífora, fotofobia, fibrina en la cámara anterior, hiperemia conjuntival, inyección escleral, hifema, rubeosis iridis, infiltrado celular vítreo y posible inflamación retinal. Mientras tanto en la quiescente externan comodidad, demostrando poca inflamación activa interna, sin embargo, pueden verse secuelas de inflamación crónica como sinequias, atrofia de corpora nigra, cambios en la coloración del iris, cataratas y degeneración vítrea. Por último, en la fase crónica los ojos tienen cambios severos como *atrofia/phtisis bulbi*, cataratas maduras, luxación del cristalino y pérdida de la arquitectura normal pupilar. Otro signo en un episodio activo de uveítis es la hipotensión, de manera normal la presión intraocular (PIO) se encuentra entre 14-32mmHg y puede bajar hasta 5-12mmHg; mientras que con la URE la PIO presenta elevaciones intermitentes, ocasionando dificultades para diagnosticar glaucoma concomitante. (Gilger, 2017; Brooks, 2008)

La miosis es el signo por excelencia, siempre presente en un episodio agudo, en ocasiones incluso en la quiescente. Si no es controlada, además de causar dolor,

provocará el desarrollo de sinequias, y cambios en los iris previamente mencionados. Dentro de las secuelas más comunes en el segmento anterior podemos observar sinequias, pigmento en la cápsula anterior del cristalino, cataratas y luxación o subluxación del cristalino. El segmento posterior es relativamente más fácil de observar si no tienen una vitritis severa. Es relativamente común encontrar degeneración retinal como cicatrices corioretinales en el área no tapetal cerca del disco óptico, viéndose múltiples áreas focales circulares de despigmentación con un centro hiperpigmentado conocidas como “cicatrices en agujero de bala” o “en forma de mariposa”. Llega a tal grado el daño que generan *phthisis bulbi*, desprendimiento de retina o cataratas que dan lugar a una ceguera irreversible. (Gilger, 2017; Brooks, 2008)

El 80% de los casos se presenta unilateralmente, mas se ha observado que el 80% de los Appaloosas presentan bilateralidad con URE. Esta raza es 8.3 veces más propensa que cualquier otra raza; mientras que en los Standardbred se ve esporádicamente. La uveítis en ellos es diferente, mostrando un curso insidioso, pasando muchas veces desapercibido por los propietarios, no es hasta que el médico veterinario examina al paciente y observa secuelas. El patrón del pelaje y el color del iris se asocian también a la predisposición de esta raza. Aquellos con la capa más uniforme son más resistentes que aquellos con la capa moteada o en patrón leopardo; mientras que los que presentan ojos marrones son más susceptibles que los que tienen colores claros o heterocrómicos. La leptospirosis está altamente relacionada con URE y en el caso del Appaloosa ocasiona un curso clínico más severo, utilizándose incluso como un pronóstico de ceguera; la posibilidad de quedar ciegos en menos de 11 años del primer ataque uveítico es del 100% en caballos Appaloosa seropositivos, 72% en Appaloosa seronegativos, 50% en no Appaloosa seropositivos y 34% en no Appaloosa seronegativos. Al presentar un componente racial, lógicamente presenta un componente genético. Se ha demostrado en los Appaloosas que marcadores tanto en el locus del complejo de manchas leopardo en el cromosoma 1, como en el Complejo mayor de

histocompatibilidad tipo 1 (MHC-I) del cromosoma 20 están asociados a URE insidiosa. Recientes estudios han analizado los genes LP y MHC en Appaloosa de EUA y 9 marcadores genéticos tanto del locus LP en la región ECA1, como de 13 microsatélites que abarcan la región MHCELA en ECA20 se mostraron asociados con URE. Además, en Warmblood alemán se asocia fuertemente con el haplotipo MHC-I, ELA-A9, ECA18 y ECA20. (Gilger, 2017; Witowski, 2016; Brooks, 2008)

La patogénesis poco se entiende, mas se sabe es inmunomediada, explicando entonces la recurrencia de episodios inflamatorios, el efecto positivo a inmunosupresores como corticoesteroides e inmunomoduladores y el poco éxito con antibióticos. De manera normal el ojo se reconoce como un órgano inmunoprivilegiado, no cuenta con células que forman parte del sistema inmune, y mantiene un medio inmunosuprimido a través de factores expresados en el vítreo, tales como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Este privilegio se atribuyó en un inicio a su separación del sistema inmunológico sistémico por la barrera hemato-ocular, falta de sistema linfático y la presencia de un número limitado de leucocitos. Sin embargo, diferentes trabajos han demostrado que este privilegio es un proceso mucho más activo. La barrera hemato-ocular es un endotelio especializado con uniones estrechas que controlan el tráfico celular estrictamente. Las células T vírgenes, no pueden cruzar la barrera hemato-retinal, debido al alto esfuerzo que sería abrirse camino en los vasos de la retina; entonces, ¿cómo es que la URE es el resultado de una pobre regulación de la respuesta de células T cooperadoras? Se proponen 3 mecanismos autoinmunes: activación por espectador, mimetismo molecular y propagación de epítomos, no son mutuamente excluyentes y seguramente interactúan entre sí; inclinándose en éstos últimos dos, explicando entonces las recaídas por una respuesta contra autoantígenos oculares. Estudios han confirmado que la mayoría de las células que infiltran el ojo en esta enfermedad son linfocitos T CD4⁺ que secretan citocinas proinflamatorias como interleucina 2 (IL-2) e interferón gamma (IFN- γ). (Gilger, 2017; Gerding y Witowski, 2016; Gilger, 2010)

Los desencadenantes antigénicos de la uveítis autoinmune siguen en discusión, gran evidencia implica respuestas contra antígenos de la retina en la etiología y progresión de la enfermedad. Muchos, aunque no todos los casos tienen respuestas inmunológicas detectables, frecuentemente a la proteína intersticial de la unión al retinol (IRBP). El IRBP es una glicoproteína sintetizada por los bastones y se encuentra en la matriz interfotorreceptora, se piensa transporta retinoides entre el epitelio pigmentario retinal y los fotorreceptoras, rol crítico en el proceso visual. Una vez que el sistema inmunológico identifica al IRBP, se ha visto desencadena URE y durante los ataques uveítics la matriz interfotorreceptora desaparece por todo el daño ocasionado, sin embargo, el autoantígeno se sigue expresando, incluso aumenta. Otro autoantígeno altamente mencionado es el antígeno-S (S-Ag), una proteína fotorreceptora encontrada en bastones y la glándula pineal. Ejerce una reacción inhibitoria en la cascada de traducción de la luz y presenta el mismo comportamiento que IRBP, se mantiene aún con la destrucción del tejido. La sinaptotagmina 1 y la proteína celular de unión al retinaldehido (CRALBP) se descubrieron recientemente también implicados en uveítis. CRALBP probándose ya en pacientes con UAH, 54% de los cuales fueron positivos y la sinaptotagmina 1 identificada recientemente como el primer autoantígeno asociado a membrana en URE, mostró una disminución en la mayoría de las retinas afectadas. Aunque se ha demostrado que las células Th1 específicas a estos autoantígenos desencadenan progresión y recaídas en URE, los procesos moleculares que conducen a la degeneración retiniana y tisular y, en consecuencia, a la ceguera siguen siendo desconocidos. (Gilger, 2017; Deeg, 2007)

La etiología, al igual que la patogénesis, no se tiene 100% establecida. Traumatismos, neoplasias, toxinas, endotoxemia y patógenos han sido asociados. Los patógenos que se han identificado capaces de iniciar un episodio uveítico son *Toxoplasma gondii*, *Brucella* spp, *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Rhodococcus equi*, borreliosis, estrogilosis, onchocercosis, influenza equina, herpes virus tipo 1

y 4, arteritis viral equina y anemia infecciosa equina; mas ningún patógeno se ha visto tan relacionado como *Leptospira interrogans*, cuya patogénesis precisa de inducción sigue sin dilucidarse. En 1985 se demostró una relación antigénica entre leptospira y la córnea equina, lo que sugiere cierto mimetismo molecular entre bacteria y huésped. Se descubrió que un fragmento de ADN codifica epítomos de reacción cruzada hacia la córnea equina. Este fragmento fue encontrado en otros subgrupos patogénicos de *L. interrogans*. Además, en el humor acuoso y vítreo del ojo equino con uveítis, IgA e IgG contra lipoproteínas LruA y LruB de *L. interrogans*, son significativamente más altas que en el suero, indicando producción de Ac's intraoculares que también reaccionan contra autoantígenos. Igualmente, antisueros específicos a LruA y LruB, reaccionaron de forma cruzada a cristalino (α -cristalino B y vimentina con LruA y la proteína retinal β -cristalino B2 con LruB respectivamente), cuerpo ciliar y retina normales. (Gilger, 2017; Witowski, 2016; Brooks, 2008)

La leptospirosis es una enfermedad bacteriana cuyos principales reservorios de las serovariedades asociadas con URE son venados, ganado bovino, porcino y ratas. Los organismos se multiplican en el riñón de éstos y los liberan por la orina. Leptospiras patogénicas solo sobreviven por periodos cortos en la tierra, pero pueden vivir hasta semanas si existe agua con pH alcalino (6.2-8), baja salinidad y una temperatura mayor a 22°C. La exposición se da cuando los caballos toman agua contaminada o su comida contiene orina contaminada. Caballos que pastan cerca de granjas con ganado, en la misma existen venados o ratas y tiene estanques cercanos a un río tienen un riesgo mayor. La bacteria penetra las membranas mucosas o piel lesionada y rápidamente llega al espacio vascular, ocasionando una bacteremia que puede persistir por 8 días, llegar a varios órganos y la infección inducir una fuerte respuesta inmune detectada en el suero de 4-8 días después de la exposición. El patógeno es eliminado rápidamente de la sangre y órganos por mecanismos propios del huésped, sin embargo, los organismos pueden localizarse en el tracto genital y túbulos renales; una yegua infectada puede liberarlo

por la orina por más de 3 meses. Los signos en equinos son poco comunes, pero si los presentan incluyen abortos, depresión, fiebre, ictericia, anemia y anorexia por unos días. (Gilger, 2017; Brooks, 2008)

L. interrogans tiene clasificada más de 20 serovariedades, los asociados mayormente en URE son Pomona en EUA y Grippotyphosa en Europa. Mientras que reportes esporádicos lo asocian con las serovariedades Autumnalis, Icterohemorrhagiae, Australis, Sejroe y Javanica. Exámenes serológicos de leptospira deben realizarse, aunque los resultados pueden ser difíciles de interpretar, ya que muchos caballos son positivos sin evidencia de enfermedad ocular o sistémica y no todos los caballos positivos a leptospira tienen uveítis, aun así, títulos positivos desde 1:400 deben ser considerados factor de riesgo para presentar URE. (Gilger, 2017; Gerding, 2016; Witowski, 2016; Brooks, 2008)

La patología temprana de la URE involucra congestión de vasos de la úvea anterior e infiltración del tracto uveal por células inflamatorias. El iris y el cuerpo ciliar son infiltrados primero por neutrófilos, los cuales escapan a la cámara anterior causando hipopión, y son reemplazados rápidamente por un gran número de linfocitos, fibrina, plasma, proteínas y macrófagos. Conforme se hace crónica y presenta episodios recurrentes, el infiltrado linfocitario se hace evidente. Las células T dominan la inflamación en la URE y autoanticuerpos son detectados en suero y tejidos oculares. Conforme continua el daño, el epitelio de los procesos ciliares y las paredes de los vasos uveales se engrosa, se encuentra exudado en la úvea visto fácilmente ocupando espacio sobre los procesos ciliares y el epitelio posterior del iris. El cristalino muestra un grueso exudado adherido a la cápsula, particularmente en el aspecto posterior en la URE temprana y sinequias en la cápsula anterior de manera crónica. Se van formando adherencias y la cápsula del cristalino prolifera y se desarrollan cataratas. Su luxación es común conforme se deteriora la zónula. De igual modo, la recurrencia y cronicidad provocan muchos cambios en la retina y la coroides adyacente. Se observan focos dispersos de infiltración linfocitaria T,

particularmente cerca del borde ciliar de la retina y la cabeza del nervio óptico. El epitelio pigmentado retinal puede sufrir hipertrofia o degeneración focal, mientras que el nervio óptico muestra hinchazón y con el tiempo se atrofia, secundario a un glaucoma. La úvea misma desarrolla nódulos linfoides que actúan como un ganglio linfático accesorio dentro del ojo. Las células T predominan en estos nódulos generando una respuesta inflamatoria local, las células B por otra parte, se encuentran en menor cantidad en el centro de los nódulos, sin embargo, su presencia puede sugerir producción de inmunoglobulinas intraoculares y una respuesta inmune humoral durante la URE, gran daño que es visto en la retina se atribuye a estas últimas. (Gilger, 2017; Witowski, 2016; Rohrbach, 2005)

El diagnóstico clínico de URE se basa en la presencia de signos característicos y la historia documentada de episodios recurrentes. Ambas cosas necesarias para diferenciarlo de otras causas de persistencia de opacidades oculares como queratitis por herpes virus, queratitis inmunomediada, glaucoma y abscesos estromales. Si el ojo tiene signos clínicos consistentes con uveítis es imperioso que el médico veterinario distinga entre un cuadro primario o recurrente, al ser entidades diferentes. Un examen ocular completo es necesario, se requiere inspeccionar toda estructura anatómica ocular, en busca de masas, cambios pigmentarios, cicatrices, opacidades, acumulación de fluido en medios oculares y cambios en el fondo, particularmente la región peripapilar. El médico veterinario deberá realizar el examen en ambos ojos, incluso si solo uno presenta malestar. El tonómetro se recomienda en todos los casos para descartar glaucoma o hipotonía. Un examen completo también es importante en un caballo en confort para documentar signos consistentes con secuelas como sinequias, pigmento en la porción anterior del cristalino, cataratas difusas y cicatrices peripapilares. Se debe obtener la historia de episodios inflamatorios previos, altamente sugestivo a URE. En casos donde la historia se desconoce, pero se sospecha de URE, al menos deben presentar tres signos de la enfermedad. (Gilger, 2017)

Las principales metas en el tratamiento de URE son preservar la visión, reducir y controlar la inflamación ocular tratando de limitar daño permanente, controlar el dolor y prevenir recurrencia. (Gilger, 2017; Witowski, 2016; Brooks, 2008)

Tratamiento médico. -

Al ser la pérdida de visión una manifestación común a largo plazo en URE, el tratamiento inicial debe ser agresivo y rápido para mantener la transparencia de las estructuras oculares. Las dos metas son reducir el dolor, esto a través de midriáticos/ciclopéjicos (ciclopentolato/fenilefrina), y reducir la inflamación con medicamentos sistémicos (corticoesteroides o AINES). Una pobre respuesta a los midriáticos en general sugiere una inflamación intraocular severa; controlarla es necesario. Los corticoesteroides se usan para disminuir la inflamación. El acetato de prednisolona al 1% y la dexametasona al 0.1% son los más usados. Ambos medicamentos tienen excelente penetración ocular. La frecuencia dependerá de la severidad, pero va desde cada hora hasta 1 vez al día. Es imprescindible asegurarse que no exista un daño corneal antes de administrar corticoesteroides tópicos, ya que pueden potenciar infecciones y enzimas como colagenasas, retrasando la epitelización en úlceras corneales y posiblemente potencializan el desarrollo de queratopatías en bandas de calcio. Los AINES tópicos pueden ser usados, pero en general su efecto es mucho menor al de los corticoesteroides. El tratamiento sistémico es el manejo más potente para la URE, el flunixin de meglumine PO o IV es el antiinflamatorio más potente y con mejor efecto en el ojo, a diferencia de la fenilbutazona y la aspirina; los corticoesteroides sistémicos solo son recomendados en casos severos que no responden a otro medicamento antiinflamatorio. La terapia inicial debe mantenerse al menos 1-2 semanas y deben disminuirse paulatinamente al desaparecer los signos clínicos. En casos severos o refractarios, las inyecciones subconjuntivales locales de acetato de triamcinolona pueden indicarse. Éste liberará el medicamento por 7-10 días, sin causar granulomas o abscesos como otros esteroides, mas puede predisponer a queratitis fungales, de modo que deben usarse con extrema precaución. Los episodios

pueden ser progresivamente más severos y refractarios en caballos. Éstos usualmente terminan ciegos, a pesar del tratamiento. (Gilger, 2017; Gerding y Witowski, 2016; Brooks, 2008)

Antimicrobianos. -

Muchos reportan el beneficio de usar antibióticos como tratamiento primario en la URE. En casos sospechosos a leptospira (títulos elevados en suero o medios oculares) se recomienda doxiciclina oral por 4 semanas (10-12mg/kg PO bid), minociclina por 1 mes (4mg/kg sid) o enrofloxacin por 21 días (7.5mg/kg PO sid). Se piensa que estas terapias pueden matar organismos residuales responsables de los episodios, pero no existen estudios que determinen si esto es cierto o si los medicamentos han hecho algún otro efecto. Además, con la fuerte evidencia de que la URE es una enfermedad inmunomediada, el uso de antimicrobianos es poco probable que sea exitoso. Estudios en la administración oral de doxiciclina, indican que falla para alcanzar concentraciones terapéuticas en el humor vítreo y acuoso en caballos normales. Sin estudios que respalden lo anterior se recomienda utilizar estos tratamientos con discreción y solo como último recurso. (Gilger, 2017; Gerding, 2016)

Dispositivo de liberación prolongada supracoroideo de ciclosporina.-

Estos implantes tienen varias ventajas sobre los métodos más tradicionales, incluyendo la liberación constante de niveles terapéuticos de la droga directo al sitio de acción eludiendo la barrera hemato-ocular y eliminando la necesidad de confiar en que los propietarios y caballerangos traten al caballo. La tasa de liberación se encuentra por debajo de niveles tóxicos, de modo que concentraciones mayores se alcanzan en el ojo sin efectos adversos sistémicos. La ciclosporina A (CsA) es un péptido que bloquea la transcripción para la producción de IL-2, inhibiendo la calcineurina e impidiendo la activación de células T. Sin embargo, de manera sistémica promueve efectos adversos renales, hepáticos y neurológicos. Además, en caballos, su seguridad, farmacocinética y toxicidad no han sido evaluados. En

ojos equinos con uveítis inducida la CsA disminuyó la duración y la severidad de la inflamación, infiltrado celular, destrucción de tejido y el nivel de transcripción de citocinas proinflamatorias. En un estudio utilizaron caballos con URE y aunque éste previno el desarrollo de episodios en 81% de los caballos, se notaron complicaciones como hemorragias intraoculares, cataratas y desprendimiento de retina. Caballos con ojos activamente inflamados que no pueden controlarse con antiinflamatorios no son candidatos, ya que CsA tiene pobre efecto antiinflamatorio y ojos inflamados son propensos a complicaciones posterior a la cirugía. Los datos obtenidos sugieren que para los pacientes toma de 30-45 días posteriores a la implantación para tener niveles oculares adecuados de CsA. De ocurrir episodios inflamatorios se recomienda tratamiento tradicional médico. Se reporta que es común que los pacientes presenten episodios tras la cirugía, pero medicamentos en menor cantidad son necesarios y la duración es corta. Aún más importante, el implante supracoroideo no está asociado a complicaciones relacionadas con pérdida de la visión como desprendimiento de retina. La duración de entrega de medicamento es aproximadamente de 36 meses. Se recomienda cambiar el dispositivo antes de los 48 meses, existen casos donde los caballos pasado ese tiempo no presentan problemas, debido probablemente a la tolerancia generada en ese tiempo, pero se ha visto que dosis muy bajas de CsA y por ende muy bajas de calcineurina activan linfocitos T in vitro, por eso es recomendable cambiarlos y mantener una dosis elevada de CsA. (Gilger, 2017, 2010)

Vitreotomía de Pars plana (VPP). -

Desde los 1980's la VPP se ha utilizado como manejo de uveítis crónica endógena en humanos. Su meta es mejorar la visión aclarando el medio y removiendo físicamente toda célula inflamatoria del vítreo. En 1991, VPP se describió como manejo de URE y desde ese momento fue muy utilizado como tratamiento en Europa con caballos positivos a leptospira, pero no se vieron los mismos resultados en EUA. Similar a los humanos, los caballos presentaron complicaciones como hipopión, hemorragia vítrea o retinal, desprendimiento de retina y formación de

cataratas; y por lo anterior actualmente no es un tratamiento convencional. (Gilger, 2017; Witowski, 2016)

El pronóstico en general es pobre sin tratamiento adecuado, los Appaloosa y caballos seropositivos a *L. interrogans* tienen mayor riesgo de quedar ciegos, pero si se controla pueden tener una buena calidad de vida. La educación y asesoría al propietario son vitales siempre que se detecten signos de URE, recalcando los posibles escenarios y preparar al propietario en cuanto al gasto monetario, tratamiento, progresión de los futuros ataques y el probable bajo rendimiento al regresar a su fin zootécnico. (Gilger, 2017; Gerding, 2016; Brooks, 2008)

CÉLULAS TRONCALES

Las células troncales (CT) son un grupo específico de células indiferenciadas que cuentan con un potencial proliferativo elevado, mantienen la homeostasis en tejidos y órganos gracias al recambio de las células muertas, reemplazándolas por células diferenciadas. Al tener la capacidad de generar células diferenciadas que suplen a las muertas y de mantener una población original, deben cumplir con dos características: **autorrenovación**, capacidad de división para perpetuarse a sí mismas y cuya progenie mantiene su potencialidad (capacidad de diferenciación) y estado inicial indiferenciado, así como el potencial de **diferenciación** a distintos tipos celulares. Las CT se mantienen en los tejidos en estado de *quiescencia*, importante para evitar el agotamiento de CT en los órganos. (Chávez, 2017-1; Flores, 2006)

Las CTM se encuentran en el mesodermo en su origen embrionario, encargado de dar origen al tejido conectivo, son capaces de adherirse al plástico, formar colonias a partir de una sola célula (CFU-F), tienen forma fibroblastoide, dar origen a osteoblastos, adipocitos y condroblastos y aislarse de tejidos adultos y neonatales. Actualmente, las CTM pueden obtenerse de diferentes tejidos de dicho origen, como médula ósea, tejido adiposo, cordón umbilical, músculo esquelético, entre otros.

Investigaciones recientes *in vitro* realizadas en células troncales mesenquimales de cordón umbilical (CTM-CU) han reportado la capacidad de autorrenovación y diferenciación en hasta 5 linajes (adipogénico, osteogénico, miogénico, condrogénico y fibroblastos). Las CTM-CU presentan un enorme interés biológico, ya que no representan un problema ético como en el caso de las embrionarias y se obtienen de tejidos desechados al momento del parto. (Chávez, 2017-1; Chávez, 2017-2; Lipeng, 2016; Ma, 2016; Hidalgo, 2015; Flores, 2006)

La Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) definió criterios básicos para la identificación de CTM:

1. Ser capaces de adherirse al plástico bajo condiciones normales de cultivo
2. Expresar marcadores de superficie, en humano proponen CD105, CD73 y CD90 y carecer de MHC-II, CD45, CD34, CD14, etc.
3. Diferenciarse *in vitro* principalmente a células de linaje condrogénico, osteogénico y adipogénico. Su diferenciación puede extenderse más allá del mesodermo, presentan plasticidad al generar células de linaje ectodermal y endodermal como hepatocitos, neuronas, cardiomiocitos y células del mesodermo visceral. (Chávez, 2017-1; Chávez, 2017-2; Lipeng, 2016; Castro e Hidalgo 2015; Barberini, 2014; Flores, 2006)

Las CTM-CU se obtienen del tejido del cordón umbilical, conocido como la **gelatina de Wharton**. Se ha observado un rango de rendimiento que va de 10,000-4,700,000 células/ml; más de lo que se obtiene de tejido adiposo y médula ósea. Presentan autorrenovación por largo tiempo, alta capacidad de expansión y estabilidad fenotípica. Las CTM-CU producen cantidades moderadas de MHC-I y no expresan el MHC-II (característica importante inmunomoduladora, dándole la oportunidad de escapar al reconocimiento de células T) ni moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, convirtiéndolo en una perfecta elección para trasplantes alogénicos. (Lipeng, 2016, Barberini, 2014)

El uso de CTM en caballos ha sido demostrado en heridas, cartílago, hueso y tendón, no obstante, en ellos se han estudiado más las CTM de médula ósea. Sin embargo, las adiposas son abundantes y accesibles, aunque las de membrana amniótica y cordón umbilical son fuentes prometedoras, al ser menos inmunogénicas y poder colectarlas de manera poco invasiva. Al igual que las CTM humanas, el criterio de selección en las CTM equinas se basa en el criterio mínimo de ISCT. Deben adherirse al plástico y diferenciarse en linajes mesenquimales. En cuanto a la inmunotipificación por citometría de flujo, se ha visto que son positivos a CD44, CD90, CD29, CD105, poco MHC-I y negativos a CD14, CD34, MHC-II, CD45 o moléculas coestimuladoras. (Dias, 2016; Hidalgo, 2015; Barberini, 2014; Carrade, 2013, 2012)

CAPACIDAD INMUNOMODULADORA DE CTM

Hace casi 2 décadas se realizaron los primeros estudios de las propiedades inmunomoduladoras de las CTM. Éstos demostraron que las CTM de médula ósea eran capaces de inhibir la proliferación de linfocitos T activados, hoy en día se sabe que son capaces de modular la función también de células NK, monocitos, células dendríticas y linfocitos B. Dentro de las expectativas en el uso de las CTM, se pretende el tratamiento de enfermedades inflamatorias, degenerativas y autoinmunes, en las cuales el sistema inmune de un individuo reconoce como extraños antígenos expresados por el propio organismo y las ataca; resultando en inflamación y daños en tejidos y órganos; aplicándose ya en modelos animales con enfermedades reumáticas, musculoesqueléticas y heridas. (Chávez, 2017-1; Chávez, 2017-2; Lipeng, 2016)

La capacidad inmunorreguladora se cree se lleva a cabo a través de la secreción de factores, quimiotaxis y mediante el contacto directo célula-célula, modificando el microambiente del tejido dañado. Los cultivos de CTM liberan factores con efectos terapéuticos clasificados en 6 categorías: inmunomodulación, antiapoptosis, angiogénesis, soporte a células troncales vecinas en crecimiento y diferenciación,

anticicatrizal y quimioatracción. Las CTM en reposo tienen la capacidad de expresar, aunque en baja cantidad, algunas moléculas inmunorreguladoras. Sin embargo, expuestas a un ambiente inflamatorio, en donde se encuentran concentraciones elevadas de citocinas, como $\text{IFN}\gamma$, factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$) e interleucina 1 (IL-1); activan, inducen o incrementa la expresión de moléculas inmunorreguladoras como $\text{TGF-}\beta 1$, Factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF), prostaglandina E_2 (PGE_2), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), interleucina 10 (IL-10) e indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO). Estas moléculas también son empleadas por células reguladoras del sistema inmune y a través de ellas se modula la activación, proliferación, diferenciación y función de las poblaciones celulares involucradas en la respuesta inmune innata y adquirida. Aunado a lo anterior, los factores tróficos secretados por las CTM contribuyen a la regeneración de los tejidos dañados, dado que promueven la proliferación de fibroblastos, células endoteliales, células progenitoras residentes en los tejidos, y la angiogénesis. En conjunto, las moléculas inmunorreguladoras y los factores tróficos favorecen la regeneración de los tejidos dañados por la inflamación en las enfermedades autoinmunes u otras patologías que involucren inflamación. (Chávez, 2017-1; Chávez, 2017-2, Lipeng, 2016; Ma, 2016; Castro, 2015)

La respuesta inmune innata es el primer sistema de defensa del organismo, actúa de forma inmediata e inespecífica. Las células NK forman parte de este sistema y se encargan de atacar células infectadas con virus, microorganismos intracelulares y células cancerosas. Al activarse liberan citocinas y adquieren actividad citotóxica; se ha demostrado que las CTM a través de la producción de IDO y PGE_2 , principalmente, son capaces de disminuir su proliferación, potencial citotóxico y secreción de citocinas de NK activadas. (Chávez, 2017-1; Lipeng, 2016)

Las células dendríticas (DC) forman parte de la inmunidad adquirida, considerándose las células presentadoras de antígeno más especializadas del organismo; su principal función es la captura, procesamiento y presentación de

antígenos a los linfocitos T vírgenes y de memoria. Se encuentran en un estado inmaduro en piel y mucosas, regiones del cuerpo que están en contacto con el ambiente; ahí los antígenos son fagocitados por DC inmaduras, después inician el proceso de maduración y migran a nodos linfáticos, culminando en la presentación de antígenos a linfocitos T vírgenes. Al madurar incrementan la producción de HLA-II, CD1a, CD40, moléculas coestimuladores CD80 y CD86 y el marcador de maduración CD83. Todo esto es necesario para activar linfocitos T e iniciar una respuesta adaptativa. Se ha demostrado que las CTM son capaces de afectar a las DC en tres niveles: a) disminuyen la diferenciación de los monocitos hacia DC inmaduras, b) afectan su capacidad de maduración y c) pueden revertir las DC maduras hacia un estado inmaduro. Todo lo anterior ocasiona una menor capacidad de estimular linfocitos T e incluso pueden generar tolerancia, involucrándose en este procesoIDO y PGE₂. (Chávez, 2017-1; Lipeng, 2016; Carrade, 2013)

Las principales células efectoras de la respuesta inmune adaptativa son los linfocitos B y T. Son células capaces de reconocer antígenos específicos, algunas poblaciones tienen “memoria”, es decir, son capaces de reconocer y actuar rápidamente sobre antígenos que previamente hayan entrado al organismo, ayudando a su rápida eliminación. Los linfocitos B, responsables de la inmunidad humoral, están especializados en la producción de anticuerpos. Mientras que los linfocitos T se subdividen principalmente en CD4⁺/cooperadores, los cuales se encargan de coordinar la respuesta inmune celular a través de la secreción de citocinas y los linfocitos T CD8⁺/ citotóxicos. En el caso de los linfocitos B, se ha demostrado que las CTM disminuyen su proliferación y afectan su diferenciación, disminuyendo la producción de inmunoglobulinas (IgM, IgG, IgA). (Chávez, 2017-1; Lipeng, 2016)

En experimentos *in vitro*, se ha demostrado que las CTM son capaces de disminuir la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, además de afectar su diferenciación y función efectora. Dependiendo del microambiente en el que se

encuentren los linfocitos T CD4⁺ (Th0) son activados por la presencia de patógenos o señales de daño y son capaces de diferenciarse en distintas subpoblaciones: Th1, Th2, Th17 o células T reguladoras (Treg); cada una tiene la capacidad de secretar determinadas citocinas a través de las cuales llevan a cabo su función; esencial para la eliminación de patógenos y para el mantenimiento de la homeostasis inmune. Diversos estudios sugieren que las CTM son capaces de modular la diferenciación, función y balance de estas subpoblaciones, encaminado a favorecer el desarrollo de una respuesta inmune antiinflamatoria. Así, las CTM favorecen la diferenciación de linfocitos Th2 y Treg, estas secretan moléculas inmunorreguladoras como interleucina 4 (IL-4), IL-10, TGF- β y PGE₂, que en conjunto incrementan una respuesta inmune antiinflamatoria, a su vez, disminuyen la diferenciación de poblaciones proinflamatorias tipo Th1 y Th17. Estudios en modelos animales, e incluso humanos, han comprobado algunos de los mecanismos inmunorreguladores empleados por las CTM *in vitro*. Los linfocitos Treg son capaces de suprimir la respuesta inmune y mantener la tolerancia inmunológica. Se generan en el timo o en la periferia al convertirse a partir de células T vírgenes, diferenciándose en Th3 o Tr1, esto es promovido por TGF- β 1 e IL-10. Su diferencia fenotípica es que las Th3 son Foxp3⁺ y las Tr1 son Foxp3⁻. Foxp3 es un factor de transcripción que se expresa constitutivamente en células Treg, reconociéndose como el regulador principal de éstas, ya que promueve el efecto regulador al mejorar la expresión del receptor para IL-2, suprimiendo la IL-2, IL-4 e IFN- γ . Todo lo anterior lo controlan por el nivel exógeno de IL-2, la unión de IL-2 a CD25 potencia la expresión de genes asociados a células Treg y regula la inflamación suprimiendo la proliferación de células T efectoras o alterando la función de células presentadoras de antígeno. Las CTM dan lugar a Treg tipo Th3 son Foxp3⁺. (Chávez, 2017-1; Lipeng, 2016; Ma, 2016)

La evidencia sugiere que las CTM equinas, como las de humano y roedor, mejoran la regeneración y función de tejido por la capacidad proliferativa que tienen, sintetizan factores de crecimiento, citocinas antiinflamatorias e inmunomoduladoras

(PGE₂, TGF-β1, IL-6, óxido nítrico (NO),IDO e IL-10); estimulándose por TNF-α e IFN-γ. Se han observado que pueden existir diferencias entre las especies en términos de mecanismos inmunomoduladores. Por ejemplo, las CTM de ratón secretan NO para suprimir células T, mientras que las humanas utilizan IDO. Se ha sugerido que las CTM equinas de tejido adiposo, médula ósea, sangre de cordón y tejido de cordón son similares en términos funcionales *in vitro*. Al activarse, sin importar su origen, aumentan la secreción de PGE₂ e IL-6, aumentando el efecto inhibitor en la proliferación de linfocitos T y producción de citocinas. El parámetro en donde difirieron fue en la producción de NO, las de médula ósea y sangre de cordón si lo producen, mientras que las adiposas y de tejido umbilical no lo hicieron. TGF-β1 fue producido en los 4 tipos, sugiriendo que la secreción basal de éste por las CTM puede ser suficiente para inhibir la proliferación de células T *in vitro*. La capacidad inmunomoduladora fue amplificada al incubarlas en células T activas, en comparación con aquellas inactivas. Por esto, se sugiere que las CTM al entrar a un nicho inflamatorio dominado por TNF-α e IFN-γ pueden activar y regular negativamente la respuesta linfocitaria y promover la curación. (Barberini, 2014; Carrade, 2012)

Al secretarse TGF-β1 por las CTM, un potente inmunosupresor, secretado también por linajes de linfocitos; suprime la proliferación de células T, activación de células B, maduración y presentación de antígenos por DC, citotoxicidad de NK, efecto fagocítico de macrófagos y la conversión de células T vírgenes a Th3 Foxp3⁺. La PGE₂ es un lípido derivado de la conversión del ácido araquidónico por la acción enzimática de COX1 y COX2, es expresada por CTM estimulando la secreción de IL-4 e IL-10, así como para inducir células Treg. Reduce la producción de IFN-γ de las NK y limita la habilidad fagocítica de macrófagos e interfiere en la activación temprana de células B. Posee la capacidad de provocar inflamación, sin embargo, es un mediador de las CTM que ayuda como antiinflamatorio en combinación de otras citocinas. La IL-10 regula negativamente la expresión de citocinas Th1 y

pueden estimular la expresión y secreción de antígeno leucocitario humano-G5 (HLA-G5), la cual estimula la secreción de IL-10 positivamente. También está involucrada en la disminución de la maduración y la función de DC. Las galectinas son una familia de proteínas que se unen específicamente a β -galactosidasa. Participan como inmunoestimuladores o inmunosupresores. Las CTM expresan galectina-3, molécula que regula la proliferación, adhesión y migración de linfocitos T. De igual modo, se ha visto que en ambientes inflamatorios expresan altos niveles de galectina-9, demostrándose su participación en la reducción de la proliferación de linfocitos B y T activados. (Ma, 2016; Castro, 2015)

Los trasplantes autólogos de CTM son muy usados en medicina veterinaria ya que no ocasionan efectos adversos, pero presentan problemas de logística ya que el cultivo celular es prolongado, sin mencionar que en pacientes geriatras la cantidad, proliferación y diferenciación disminuye considerablemente. La terapia alogénica en caballos ofrece ventajas, se inyectarían rápidamente las CTM en caso necesario, eliminando el tiempo de aislamiento y expansión, permitiendo tener un banco; en otras palabras, una población celular más homogénea, con capacidad comprobada de diferenciación y proveyendo tratamiento inmediato. (Dias, 2016; Barberini, 2014; Carrade, 2011)

ANTECEDENTES

Actualmente hay muchos estudios que evalúan la terapia de CTM en el mundo, el interés crece debido a su papel en la reparación de tejidos e inmunomodulación sin causar respuestas aloreactivas por células T u otras células inmunes. Se han realizado tratamientos en modelos animales con CTM-CU, en algunos casos las células cultivadas se administran directamente en el área lastimada con inyecciones subcutáneas o intravenosas, así como de manera indirecta en una membrana de polivinilo alcohol en heridas de piel. Por sus características, las CTM-CU se han empezado a usar ampliamente en enfermedades autoinmunes. (Dias, 2016; Lipeng, 2016)

Estudios a largo plazo en medicina veterinaria han demostrado no ocasionar efectos adversos al administrar CTM en diferentes animales. Pocos estudios controlados en medicina veterinaria han demostrado efectos adversos, viéndose únicamente inflamaciones localizadas tras su administración *in vivo*. En varios hospitales estadounidenses se aplican de manera rutinaria en casos de tendinitis, heridas, osteoartritis, entre otros y no es común ver efectos adversos severos en los pacientes. De cualquier manera, *in vivo* los resultados son variables, probablemente debido a la falta de estandarización en la dosis, la ruta de administración, fuente y mediciones finales. Sin embargo, las CTM-CU equinas ya han demostrado que, al ser inyectadas intraarticular, intralesional, intramuscular e intradérmicamente, no inducir respuestas inflamatorias. (Dias, 2016; Carrade, 2013)

Se demostró que las articulaciones sanas no responden de manera adversa ante inyecciones con CTM-CU alógenas en comparación con CTM autólogas. El mismo grupo de trabajo, determinado en comprobar que las CTM-CU no causaban reacciones desfavorables, realizó múltiples inyecciones intradérmicas *in vivo*. Se colectaron CTM-CU a partir de partos de Cuartos de Milla, cada caballo en el estudio recibió 12 inyecciones intradermales en la tabla del cuello de 1 millón de células/100 μ L, junto con un control positivo y otro negativo, pasadas 4 semanas se volvieron a inyectar con el mismo protocolo. Se evaluaron las zonas de inyección diariamente, por un dermatólogo veterinario certificado, y se tomaron biopsias el día 2, 3 y 7 posterior a las inyecciones. No se encontraron evidencias clínicas de una respuesta sistémica negativa a múltiples inyecciones de CTM-CU, ni en la evaluación externa ni histológicamente se encontraron cambios dérmicos, permitiendo pensar que si son inmunoprivilegiadas. (Carrade, 2011)

Otro estudio colectó CTM-CU de Pura Sangre Inglés (PSI) para trasplantar 3 millones en diferentes puntos del músculo glúteo superficial de distintos caballos. Se realizaron biopsias 30 días antes de la inyección y al día 2 y 7 posterior a la

inyección. Por medio de US y junto con las biopsias verificaron la integridad de las fibras musculares, sin ser capaces de observar degeneración o necrosis de los miocitos. En algunos casos al segundo día observaron una inflamación aguda, pero todas resolvieron al séptimo día, atribuyéndolo entonces al trauma de la inyección misma. (Dias, 2016)

Las ratas con uveítis autoinmune experimental (UAE) exhiben una recurrencia espontánea, evidenciando una inflamación intraocular posterior crónica, deteriorando la retina, similar a lo que sucede en los humanos. En ratones ya se demostró que la aplicación única al inicio de la UAE reduce significativamente la inflamación, así como la frecuencia de recidivas. Mientras que una segunda dosis falló en el efecto terapéutico aplicado en el segundo ataque. De modo que se trató de verificar la eficacia de la terapia con CTM administradas en una fase tardía de la enfermedad y con dosis dobles. A ratas libres de patógenos se les indujo UAE, mientras tanto se obtuvieron, cultivaron y definieron las CTM de médula ósea según la ISCT. Posterior a la inducción se administraron vía IV SID 5 millones de CTM alogénicas suspendidas en 1ml de Solución salina tamponada de fosfatos (PBS). Esto se realizó por tres días consecutivos: los días 4-6 como tratamiento inmediato, 20-22 como tratamiento tardío y en ambas fechas para aquellos con doble dosis. Se examinaron hasta el día 40 por medio de una lámpara de hendidura, graduando la inflamación del 0-4; se realizó también la última electroretinografía y se enuclearon los ojos para su examinación histológica. Los resultados fueron significativos tanto en el tratamiento único como el doble, el tratamiento tardío demostró mejores resultados en los últimos 20 días que la dosis única al inicio. Histológicamente se encontró daño severo en la retina y una infiltración inflamatoria severa en el grupo control, las terapias con CTM significativamente disminuyeron las graduaciones histológicas y mejoraron el grosor retinal, sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre la terapia única y la doble. Se observó además que la aplicación tardía ocasiona que el daño a fotorreceptores suceda más lentamente. En la electroretinografía los potenciales osciladores disminuyeron de

amplitud conforme pasó el tiempo en el grupo control, mientras que con el tratamiento mejoraron los potenciales. En contraste las tres terapias con CTM demostraron una mejor estructura retinal, reducción significativa de puntos reflejantes en el vítreo, así como las masas en la retina. Se demostró que una sola dosis de CTM administrada al inicio de la enfermedad fue suficiente para inhibir el progreso y recurrencia de la enfermedad, siendo también efectiva la dosis una vez desarrollada la enfermedad. En este experimento, se encontró que, aunque el tratamiento temprano fue ventajoso sobre el tardío para reducir las recidivas y proteger la estructura retinal y función; el tardío también de manera efectiva alivia la severidad, disminuye inflamación, interrumpe el daño en las capas externas retinales y mejora la función de la retina. Ambas terapias disminuyen la pérdida de fotorreceptores, demostrando propiedades neuroprotectoras reduciendo el estrés oxidativo y secretando factores neurotróficos, e inhibiendo la respuesta inmune. (Zhao, 2016)

Distintas enfermedades autoinmunes podrían verse beneficiadas al utilizar CTM. La URE es muy similar tanto clínica como patológicamente con la uveítis autoinmune humana (UAH), ocupando el 10% de las causas de ceguera en humanos (Simeonova, 2016). Las principales causas de discapacidad en el mundo se deben a afecciones inmunomediadas, la URE es considerado el único modelo natural para la UAH. Aunque aún no se comprenden del todo, permite suponer que se encuentran involucrados, sino los mismos, mecanismos inmunes muy parecidos, siendo la infiltración de células mononucleares el sello en ambas especies (Papotto, 2014; Simeonova, 2016).

JUSTIFICACIÓN

Dado que la enfermedad autoinmune, uveítis recurrente equina, no cuenta con tratamientos resolutivos, su pronóstico es pobre y es la principal causa de

incapacidad por ceguera en equinos; el uso de las células troncales mesenquimales de cordón umbilical equino representa una opción viable para disminuir los episodios inflamatorios, al tener capacidad inmunomoduladora.

HIPÓTESIS

Si las células troncales mesenquimales de cordón umbilical equino inyectadas subpalpebralmente tienen un efecto inmunomodulador, entonces en caballos con uveítis recurrente equina disminuirá el proceso inflamatorio.

OBJETIVO GENERAL

Medir la variabilidad de citocinas involucradas en la uveítis recurrente equina por medio de ensayos multiplex, tras la aplicación de células troncales mesenquimales de cordón umbilical equino por vía subpalpebral y así cuantificar factores solubles y correlacionarlos clínicamente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Colección de cordones umbilicales equinos posterior al nacimiento de los potros para la obtención de células troncales mesenquimales a partir de la gelatina de Wharton.
- b. Cultivar las células troncales mesenquimales a partir de 1 gramo de tejido mediante digestión enzimática y su posterior caracterización mediante citometría de flujo, para verificar su linaje celular.
- c. Medir los cambios en las citocinas en muestras lagrimales, previo y tras la inoculación subpalpebral de las células troncales mesenquimales de cordón umbilical.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Instituto Nacional de Rehabilitación, el Hospital DITEQ (Clínica de Diagnóstico y Terapéutica Equina) en el Hipódromo de Las Américas, el Rancho Sayavedra, 3 ranchos privados en la CDMX y el Estado de México y el Banco de Sueros de la FMVZ-UNAM.

Obtención y cultivo de células troncales mesenquimales

La colección se realizó en el Rancho Sayavedra, a partir de 26 partos en pradera de yeguas PSI, de 5-20 años de edad, se consiguieron muestras de cordones umbilicales para obtener CTM de la gelatina de Wharton.

Por cuestiones de seguridad los cordones umbilicales fueron tomados hasta expulsarse la placenta. Lo anterior no representó un riesgo de contaminación del cordón debido al arreglo que presentan las membranas placentarias; los cordones descansaban dentro del amnios mientras la placenta envolvía ambas estructuras. Con guantes estériles se tomaba el cordón envuelto aún en el amnios y se corta un trozo de 10-15 cm de largo. Posteriormente se envolvía en un campo estéril para mantenerlo limpio antes de prepararlo para su traslado al Instituto Nacional de Rehabilitación (INR).

El cordón envuelto era ubicado en una mesa y toda manipulación posterior se realizaba usando guantes quirúrgicos y utilizando la técnica de “mano limpia mano sucia”. Con la mano limpia se tomaba el cordón y se desenvolvía del amnios, mientras que con la mano sucia se cogía todo el instrumental necesario. Éste era lavado dos veces con una mezcla de solución yodada y alcohol, entre cada lavado se enjuagaba con SSF. Terminado el segundo lavado se procedía a cortar con tijeras Metzenbaum, previamente esterilizadas, una porción aproximada de 5 cm y se procedía con un último y tercer lavado. La muestra se guardaba en un tubo Falcon de 50 ml con 25ml de PBS y antibiótico al 10% (anfotericina B y estreptomina, Invitrogen Co. Gibco. NY, EU). Se mantuvo en refrigeración a 4° C hasta su procesamiento en el laboratorio de la Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación, ese lapso nunca fue mayor a 12 horas.



Figura 1. Recolección de cordones umbilicales inmediatamente postparto. a) Posterior al nacimiento se espera a que salgan las membranas placentarias, b) Recolección del cordón, c) proceso de lavado, d) muestra lista para su procesamiento.

En el laboratorio las muestras se procesaron para su posterior cultivo y caracterización de forma estéril en una campana de flujo laminar (Forma Scientific, Inc. Ohio, EUA). Se limpió el exterior del tubo Falcon con una gasa impregnada de alcohol al 70% y dentro de la cámara de flujo laminar se destapó. La muestra fue colocada en una caja de Petri y se lavó nuevamente con alcohol al 70%. Una vez que se extrajo el exceso de líquido, se separó la gelatina de Wharton del resto del tejido del cordón umbilical con ayuda de pinzas estériles y hojas de bisturí del número 20. Conforme se separó el tejido deseado, se ubicaba en otra caja de Petri

con PBS, al obtenerse alrededor de 1 gramo de tejido, se cortó finamente para facilitar la digestión enzimática.

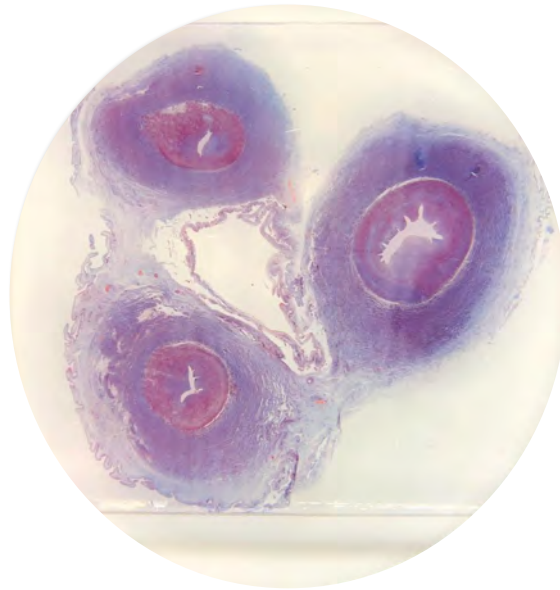


Figura 2. Cordón umbilical equino en Tricrómica de Masson. Se observan las dos venas y la arteria que lo componen, y alrededor de los vasos se encuentra el tejido conocido como gelatina de Wharton.

La digestión enzimática de la gelatina de Wharton se realizó en una solución de 10 ml de medio de eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 100 μ l de colagenasa (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, EU), incubándose por 1 hora a 37.5°C. Se centrifugó a 300 g por 7 minutos a 37°C, se eliminó el excedente y se agregaron 4 ml de DMEM para resuspender las células e incubarse en cajas T25 (Falcon, Becton Dickinson, NJ, EU). El medio, 4 ml de DMEM, 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% anfotericina B y estreptomycin, se cambiaba cada tercer día y se cultivaron a 37°C y 5% de CO₂. Los pases se realizaban al alcanzar las cajas de cultivo un 80% de confluencia, desprendiendo las células de las cajas de cultivo con una solución de tripsina y PBS (Gibco, Invitrogen Corporation, NY, EU), volviéndose a cultivar en las mismas condiciones hasta su tercer pase.

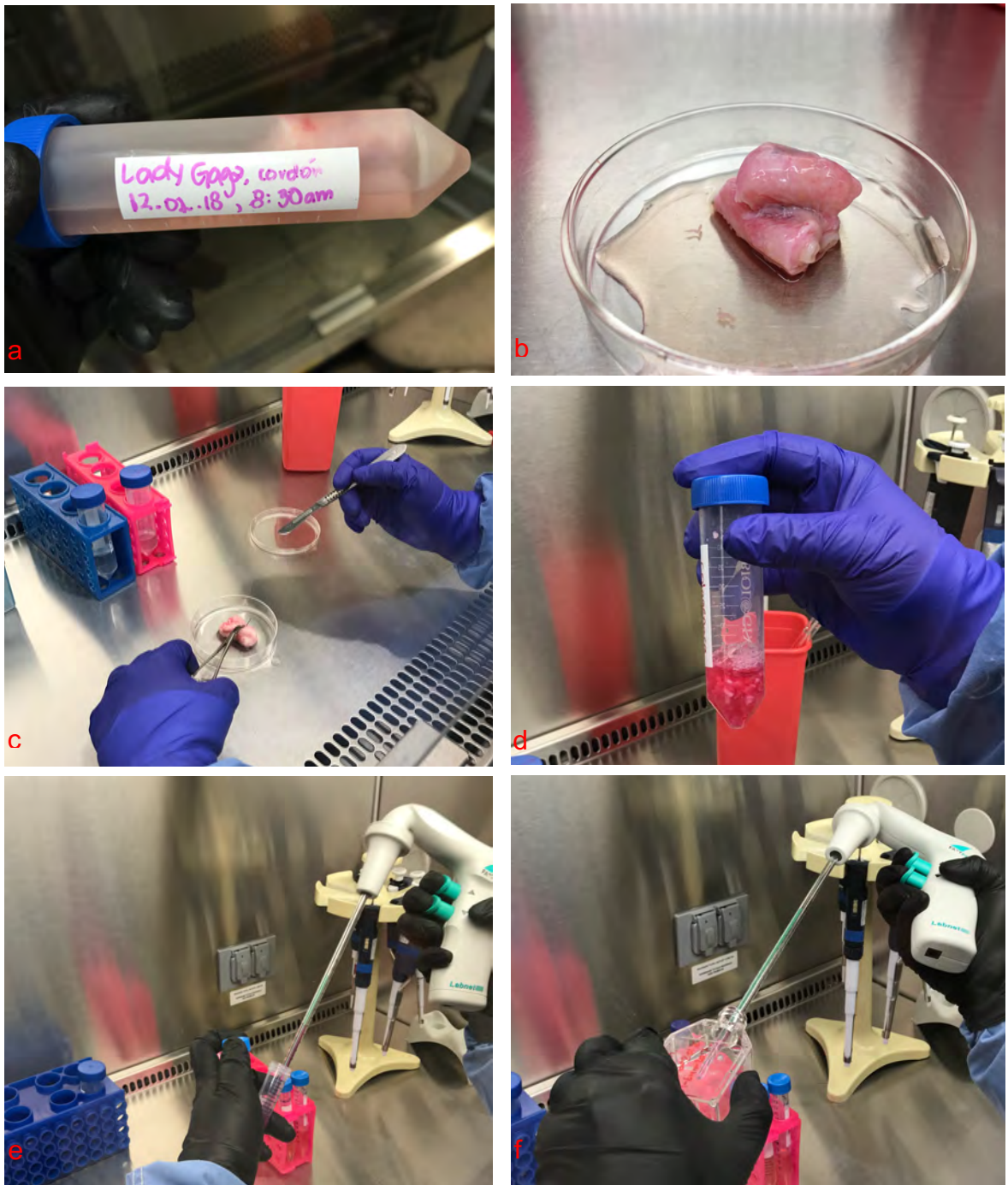


Figura 3. Procesamiento de muestras umbilicales para primocultivos en el INR. a) Las muestras se mantienen en refrigeración hasta ser procesadas, b) El cordón es expuesto dentro de la cámara de flujo laminar, c) separación de 1 gramo de gelatina de Wharton, d) digestión enzimática, e) toma de medio de cultivo y f) suspensión celular en cajas T25.

Caracterización de células troncales mesenquimales

Análisis de citometría de flujo

Antes de realizar el tercer pase se realizó un análisis de citometría de flujo. Las células fueron contadas por medio de una cámara de Neubauer, una porción fue utilizada para el análisis, otra para la diferenciación y el restante continuó en cultivo. Se utilizaron aproximadamente 250 mil células por tubo, fueron resuspendidas en 1 ml de PBS e incubadas por 45 min con 3 μ l de anticuerpo capaz de reconocer marcadores de superficie como CD90, CD73, CD105, CD45, CD34, CD14 y MHC-II. La lectura de las muestras se llevó a cabo con el software Cell Quest Pro (Becton Dickinson FACS Calibur).

Procedimiento completo para realizar dicha técnica:

- Marcar los tubos
- Eliminar el medio de las cajas con las muestras que se van a preparar
- Lavar las cajas con PBS y posteriormente tripsinizar (tripsina y PBS en una relación 1:1) e incubar por 6 minutos
- Verificar que las células se desprendieron, aspirarlas con una pipeta y ponerlas en un tubo de 15 ml con 4ml de medio
- Centrifugar a 1500 rpm por 7 minutos
- Decantar y resuspender el pellet con 3ml de PBS y hacer un conteo celular con una cámara de Neubauer
- Tanto en el tubo control como los que tendrán anticuerpos colocar 250,000 células, todas ellas en 1ml de PBS
- Marcar las células con 3 μ l de cada anticuerpo e incubar por 45 minutos
- Posteriormente, centrifugar todos los tubos 1500 rpm por 5 minutos
- Decantar, agregar 1ml de PBS
- Realizar la lectura correspondiente en el citómetro de flujo

Diferenciación de células troncales mesenquimales

Se emplearon cajas de 12 pozos para hacer pruebas por duplicado, se cultivaron 50 mil células por pozo y en un inicio se cultivó con medio DMEM, 5% de SFB y 1% de antibiótico, pasados 2 días se inició con el medio de diferenciación.

Para la inducción del linaje adiposo se utilizaron 10 ml de DMEM añadiéndole 50 μ l SFB, 0.5 μ l dexametasona, 5 μ l de isobutilmetilxantina, 5 μ l de insulina, 50 μ l de indometacina y 50 μ l de Pen-Gen; adaptándose el protocolo a partir de distintas combinaciones. El medio se cambiaba cada tercer día por 21 días, mas se intercalaba medio de mantenimiento cada 3 cambios adipogénicos. La diferenciación se evaluó por medio de la tinción Rojo Nilo.

La inducción del linaje osteoblástico se realizó a partir de DMEM en combinación con 10 nmol/L de dexametasona, 10 μ mol/L de ácido ascórbico, 10 mmol/L de β -glicerofosfato, 10ng/ml BMP-7 y 1% de SFB. El medio se cambió cada tercer día por 21 días y se evaluó la diferenciación con la tinción Von Kossa (Hidalgo, 2015).

Por último, el linaje condrogénico se logró adicionando al medio insulina, ácido ascórbico, 100 ng/ml de TGF- β y 100 ng/ml de BMP-2. El medio se cambió cada tercer día por tres semanas, evaluándose con la tinción de Azul Alciano (Pérez, 2018).

Criopreservación

Conforme alcanzaban confluencia los pases, se criopreservaron al menos en 2 viales de 8 yeguas entre P2 y P4 para su posterior caracterización o uso en los pacientes.

- Retirar el medio de la caja de cultivo
- Lavar las cajas con PBS y tripsinizar con 4 ml (solución tripsina y PBS en una relación 1:1) e incubar por 6 minutos
- Una vez las células desprendidas, aspirarlas con una pipeta y ubicarlas en un tubo de 15 ml con 4ml de medio
- Centrifugación 300 xg por 7 min y posterior obtención del sobrenadante

- Resuspensión del pellet y contar celularidad con cámara de Neubauer utilizando azul tripán
- Las células son colocadas posteriormente en un criotubo (1ml de medio de criopreservación por cada 5 millones de células), el medio en el que se criopreservan consiste en 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) y 90% de SFB
- La curva de enfriamiento inicia al colocarles el medio a 4°C, pasan posteriormente a un congelador a -20°C por 1 hora. Terminado ese lapso pasaban a un congelador a -80°C

Individuos

Todos los animales utilizados en el grupo control fueron caballos de carreras, PSI, que habitaban en el Hipódromo de las Américas y se realizó cada muestreo en el Hospital DITEQ. Mientras que los caballos pertenecientes al grupo experimental residían en ranchos privados.

Criterios de inclusión

Grupo control

- Individuos clínicamente sanos
- Examen físico general y oftalmológico sin anormalidades

Grupo experimental

- Caballo con un episodio de URE
- Presentar signos característicos como miosis, hiperpigmentación del iris, blefaroespasmo, edema corneal, flama acuosa, hipopión, hifema, epífora, fotofobia, fibrina en la cámara anterior, hiperemia conjuntival, inyección escleral

Tanto los caballos control como aquellos afectados con URE fueron sometidos a un examen físico general y oftalmológico completo estricto, manteniendo la uniformidad con una hoja de examinación general.

Caballo:				
Nombre:				
Sexo:				
Edad:				
Rancho/Cuadra:				
Observaciones:				
EXAMEN FÍSICO GENERAL				
	Fecha:	Fecha:		
FC				
FR				
Mucosas				
TLLC				
Motilidad				
Temperatura				
Pulso digital				
EXAMEN OFTALMOLÓGICO				
	OI	OD	OI	OD
R. Amenaza				
R. Pupilares				
R.P.Consensual				
Pba. Schirmer				
S. Corneal				
T. Fluoresceína				
Pba. Jones				
T. R. B.				
Oftalmoscopio (Fondo de ojo)				
Ojo en Tx				
Tratamiento				
Xilacina (ml):				
Macroscopicamente:				

Cuadro 1. Hoja de examinación física general y oftalmológica.

Muestra lagrimal e inyección de CTM

- Mediante el examen físico general y el oftalmológico, se verificó que los controles estuvieran realmente sanos y los pacientes enfermos si tuvieran únicamente URE
- Dependiendo del temperamento del individuo se sedó con xilacina a una dosis de 0.3-0.5 mg/kg
- Se procedía a enguantarse y tomar un tubo capilar sin aditivos, previamente esterilizado, para la toma de 50-100 μ l de lágrima del canto medial. Inmediatamente después de su toma se guardó en un tubo Eppendorf estéril previamente marcado para su inmediata congelación a -80°C
- Posterior a la primera colección de lágrima, se cambian los guantes y se colecta cuidadosamente con una jeringa para insulina el tratamiento (PBS o CTM en los controles y CTM en los experimentales), preservando en todo momento la esterilidad
- Con una torunda empapada en alcohol se limpió cuidadosamente el área, para evitar que el alcohol entrase al ojo y se procede a introducir una aguja de 25 G en la zona subpalpebral, después se conectaba la jeringa y se inyectaba el contenido. Se retiraba todo y se presionaba la zona con una torunda seca evitando cualquier sangrado
- En todos los individuos se inyectó un volumen de 0.1-0.2 ml, las muestras con CTM contenían 5 millones de células en P3
- Exactamente 30 min después de la inyección se realizó la segunda colecta de lágrima
- La tercera y última colecta se realizaba una semana después del procedimiento anterior
- La única indicación en el caso de los controles era no trabajar al día siguiente; mientras que los caballos enfermos se quedaban en caballeriza con sus medicamentos si eran tratados, y si no lo eran se les aplicaba tópicamente un midriático para controlar el dolor esa semana.



Figura 4. Evaluación oftalmológica e inyección de CTM. a) Examen físico general, b) examen oftalmológico, c) toma de lágrima, d) colección del tratamiento, e) inyección subpalpebral y f) inyección de 0.1-0.2 ml.

Ensayo Multiplex

El kit que se utilizó con la finalidad de comparar si ocurre algún cambio significativo en las citocinas lagrimales pre y pos exposición a la inyección de CTM fue el “Milliplex MAP Kit: Equine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel” (Merck Millipore, EU). Se cuantificaron por duplicado 6 citocinas: IL-1 α , IL-6, IL-2, IL-10, IFN- γ y TNF α .

- Previo a correr las muestras del Luminex y se calibró el equipo (Bio-Plex 200, Bio-Rad Laboratories, EU), de igual modo el kit se atemperó por 1 hora a una temperatura ambiental de 20°C, mientras tanto se prepararon los reactivos necesarios, donde el estándar fue diluido 2 veces más para alargar la curva.
- Se adicionaron 200 μ l de “wash buffer” en cada pocillo de la placa, se cubrió y mezcló en un agitador de placas por 10 min a 20°C. Al terminar se decantó el contenido y se removió el exceso golpeando la placa sobre una cama de servilletas absorbentes.
- Se adicionaron 25 μ l de cada estándar y los controles previamente preparados en los pocillos designados y 25 μ l de “Assay buffer” en los pozos restantes, donde se pondrían las muestras. Se añadieron 25 μ l de solución matriz en todos los pozos de la placa, y se agregaron 25 μ l de muestra lagrimal en su respectivo pocillo y por último se adicionó la mezcla de microesferas, 25 μ l en cada pozo; la placa se cubrió con papel aluminio y se dejó incubar toda la noche, un total de 18 horas a 4°C, en un agitador de placas.
- La mañana siguiente se volvió a atemperar por una hora el kit, mientras la placa pasó por la estación de lavado automático y se calibraba el equipo.
- Terminado el lavado se adicionaron 25 μ l de anticuerpos de detección en cada pozo, se cubrió la placa y se dejó incubar por 1 hora en el agitador de placas a 20°C.
- Se adicionaron 25 μ l de estreptavidina-ficoeritrina a cada pocillo, la placa se cubrió nuevamente con aluminio y se incubó en agitación por 30 min a 20°C.

- Posteriormente se vuelve a lavar la placa en la estación de lavado y al terminar se adicionaron en todos los pozos 150 μ l de “Sheath fluid”, por 5 minutos se mantuvo en agitación a temperatura ambiente.
- Finalmente se realizó la lectura de las concentraciones de cada muestra lagrimal en el Bio-Plex 200 empleando el software Bio-Plex Manager.

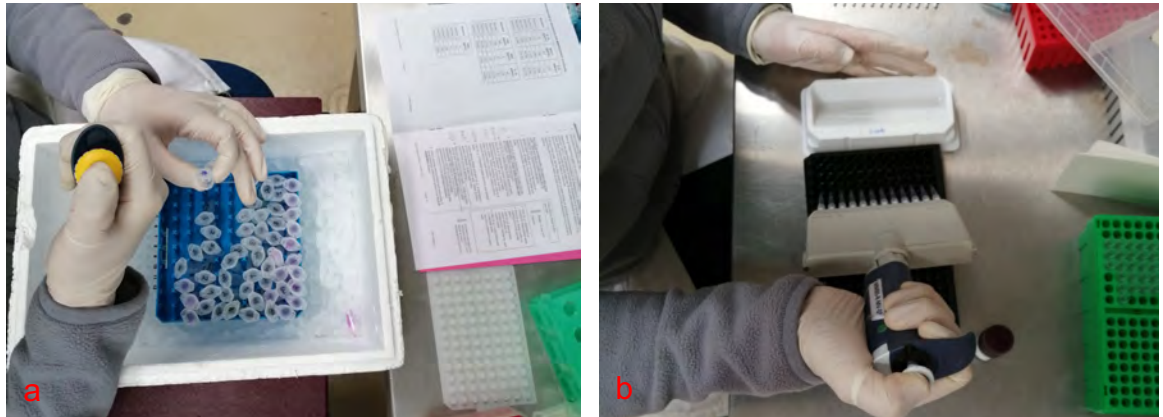


Figura 5. Ensayo Multiplex. a) toma de muestras lagrimales y b) lavado de placa.

Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados de la concentración de citocinas, se utilizó estadística no paramétrica de acuerdo con los resultados obtenidos de las pruebas de homogeneidad de varianza (análisis de residuos) y de distribución normal (prueba Shaphiro-Wilk) incluidos en el programa estadístico Prism 8.0 (GraphPad, Software Inc., USA).

De manera particular, se utilizó la prueba U de Mann Whitney para comparar la concentración de citocinas entre los medios empleados (PBS y CTM) en el grupo control. Posteriormente, se retomó esta prueba para comparar la concentración de citocinas entre el grupo control y el experimental. Adicionalmente, se realizó la prueba de Kruskal Wallis seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunn para determinar posibles cambios la concentración de citocinas a diferente tiempo (basal, 30 minutos y 7 días) en ambos grupos. En todos los casos se consideró un valor de $p < 0.05$ como significativo.

RESULTADOS

Todos los primocultivos se sembraron inicialmente en cajas T25, alrededor del tercer día se podían apreciar cúmulos y células dispersas, su morfología inicial era redondeada y pequeña, formando cúmulos de casi 100 μm , no era hasta que se adherían que se podía observar una forma fibroblastoide, la adhesión no se presentaba hasta pasado el 5^{to} día de cultivo. Se observó una lenta proliferación inicial, pero alcanzaban el 80% de confluencia cerca de cumplir 2 semanas de sembrarse. Una vez que se realizaba el P1 en cajas T75 la proliferación era rápida en comparación con el primocultivo.

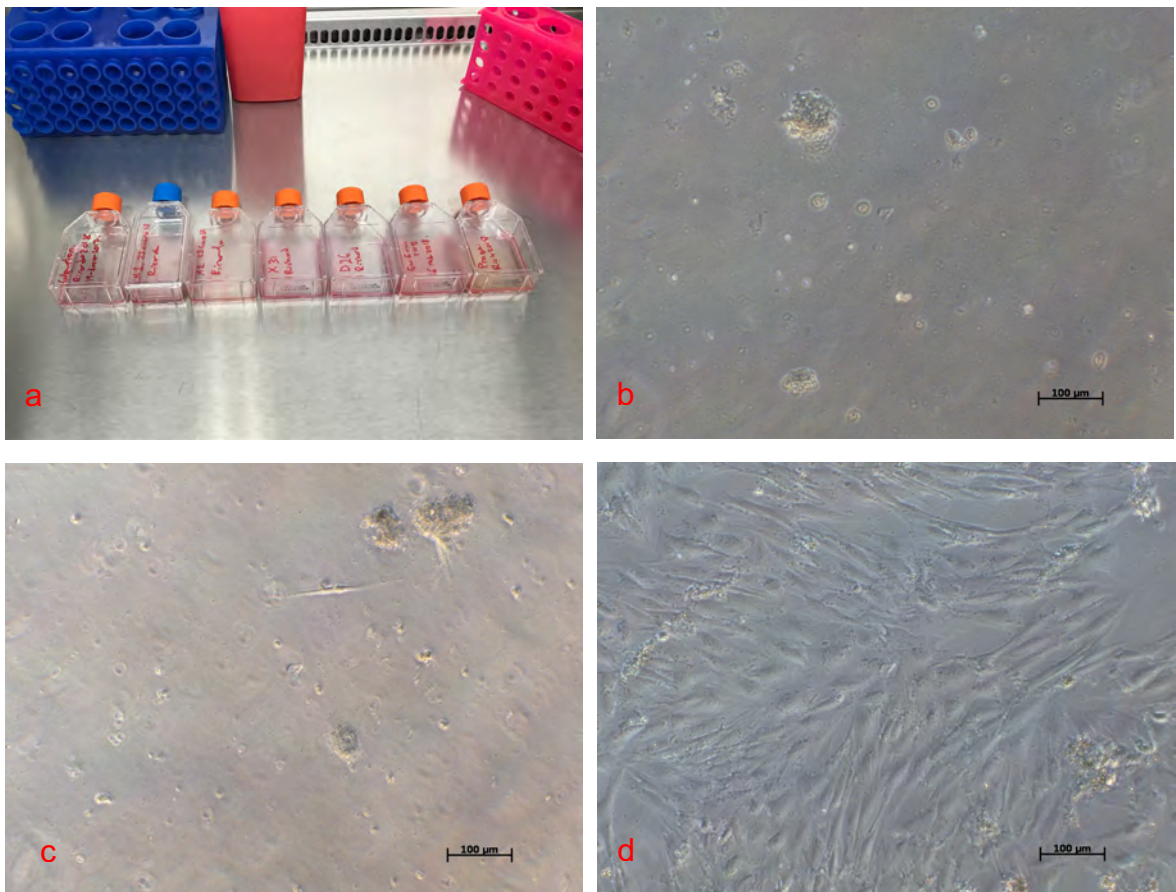
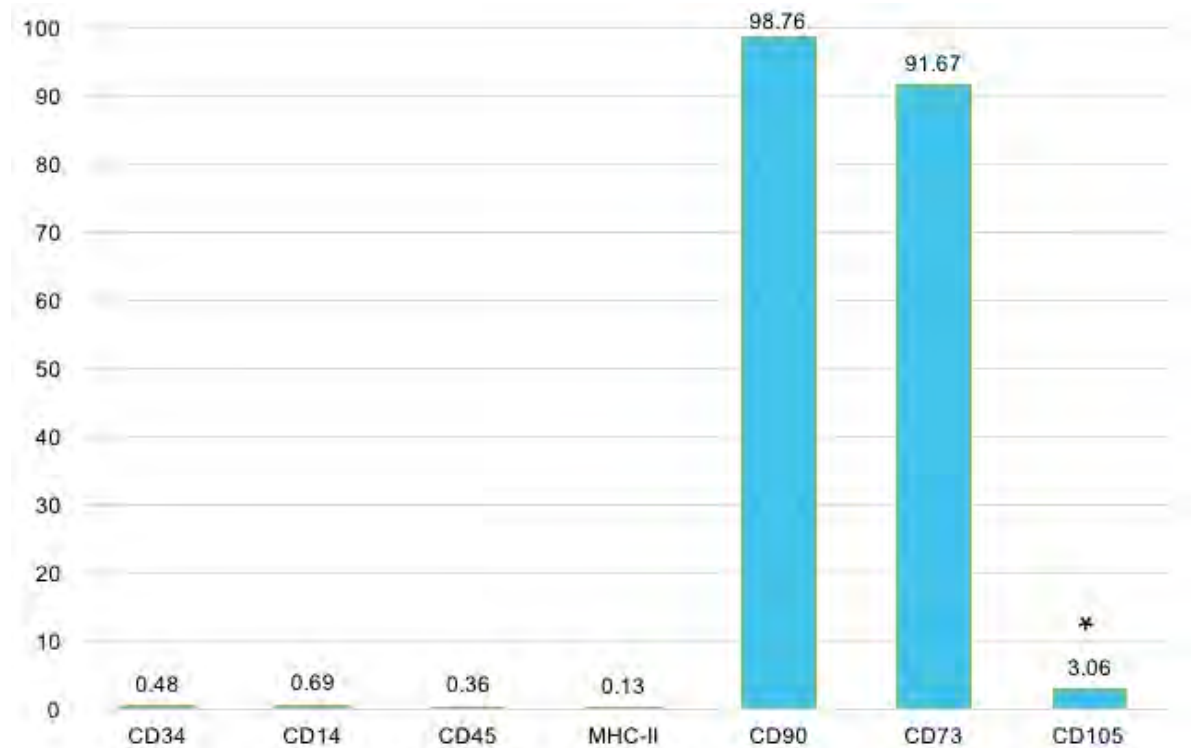
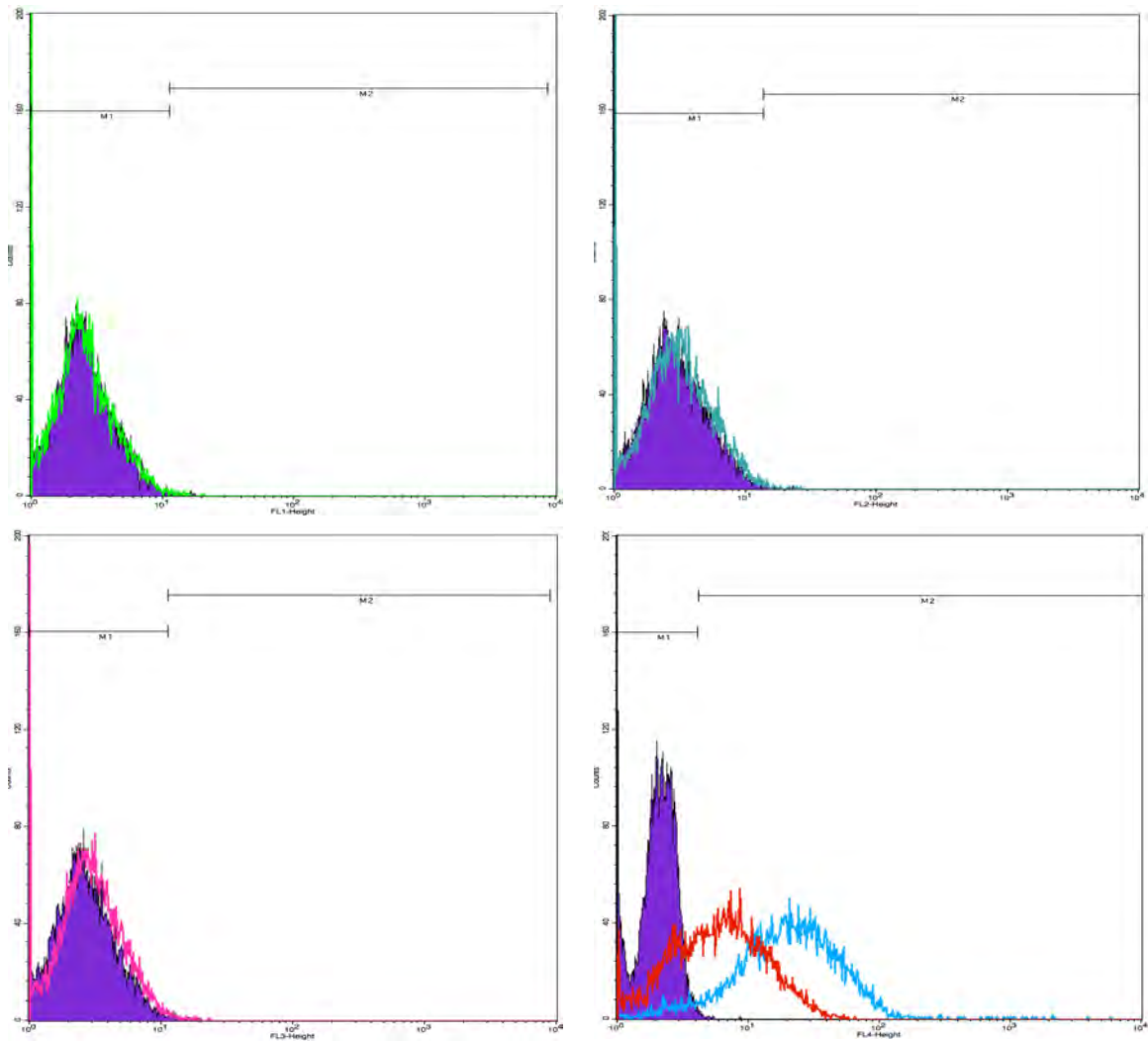


Figura 6. CTM equinas. a) Primocultivos de células mesenquimales obtenidas a partir de gelatina de Wharton de PSI, b) cúmulos de células en los primeros días del cultivo, c) primeras células fibroblastoides adheridas a la caja, vistas antes de cumplir una semana y d) confluencia al 80%, listas para realizar el siguiente pase.

La identificación de marcadores de superficie se realizó por medio de citometría de flujo para demostrar la presencia de marcadores positivos a células troncales mesenquimales. De manera regular se deben expresar marcadores como CD90, CD73 y CD105, mientras los reguladores negativos son CD14, CD34, CD45 y MHC-II. Aunque se colectaron 26 cordones umbilicales, sólo se trabajaron con 8 muestras, desde su diferenciación hasta su inyección en los caballos y todas las muestras mostraron una expresión disminuida de CD105. El resto de las muestras fue criopreservada en P1.



Cuadro 2. Expresión de marcadores de células troncales mesenquimales provenientes de gelatina de Wharton equino. Fenotipo negativo ante marcadores CD34, CD14, CD45 y MHC-II en las CTM como se esperaba y la expresión positiva de CD90 y CD73 es comparablemente visible, no así con CD105.



Cuadro 3. Histogramas que muestran la presencia o falta de expresión de marcadores de superficie. La sombra morada es el control, mientras que las líneas de colores indican si las células son positivas o negativas a dicho fenotipo. Se expone una evidente falta de marcadores de células troncales mesenquimales al observar la línea verde fosforescente (CD45), turquesa (CD34) y rosa (CD14); en comparación con las células positivas en rojo (CD73) y azul (CD90).

Las células troncales mesenquimales fueron sembradas en cajas de 12 pozos y al terminar los 21 días en cultivos de diferenciación se realizaron distintas tinciones. La diferenciación del linaje adiposo se evaluó por medio de la tinción Rojo Nilo para detectar vacuolas de ácidos grasos dentro de las células. El linaje osteoblástico se detectó con la tinción Von Kossa, específica para depósitos de calcio (café). Finalmente, el linaje condrogénico se valoró con la tinción de Azul Alciano, la cual detectó la presencia de mucopolisacáridos sulfatados presentes en la matriz extracelular de dicho tejido.

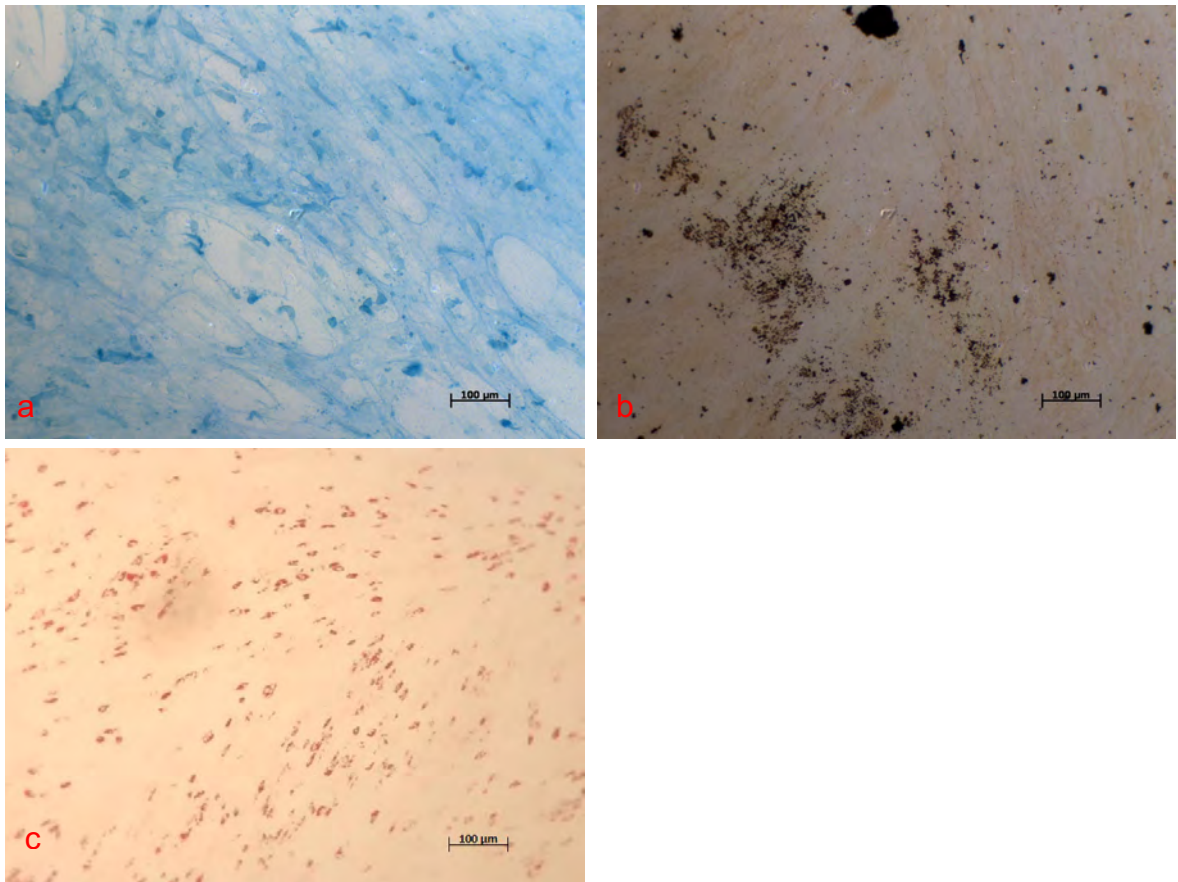


Figura 7. Tinciones positivas posterior a la diferenciación de CTM. a) Azul Alciano en diferenciación condral, b) diferenciación osteoblástica con Von Kossa y c) Rojo Nilo en diferenciación adiposa.

Todos los caballos utilizados en el grupo control eran atletas del Hipódromo de Las Américas. En total se utilizaron 7 machos y 5 hembras PSI con un rango de edad que va de 2-7 años. De manera aleatoria se inyectaron a 6 de ellos con PBS y la otra mitad con células troncales mesenquimales.

El primer caballo del grupo experimental, Don Wizard, Warmblood, 12 años, retinto macho castrado. Presentó signos de uveítis e inició tratamiento (betametasona, ciclosporina A, antibiótico y lágrima artificial). Posteriormente inició el protocolo y se tomó la decisión de inyectar únicamente el ojo izquierdo, a lo largo de la semana, no se observaron cambios clínicos.

Endrick, Frisón, 15 años, macho entero; fue el segundo caballo del grupo experimental, presentaba un cuadro agudo de uveítis en el ojo izquierdo, contaba con tratamiento previo (prednisolona y ciclosporina A). En comparación con Don Wizard presentaba signos serios como dolor, edema, vascularización, epífora y blefaroespasmos.

A la semana, en la segunda visita para la tercera toma de muestra, clínicamente presentó cierta mejora, todos los signos anteriores disminuyeron, pero no de manera significativa; mostraba mejor estado anímico.



Figura 8. Endrick pretratamiento. a) Se muestra el blefaroespasmio y epífora, b) se muestra el edema y la vascularización; los márgenes palpebrales se ven verdes debido a la tinción previa con fluoresceína.



Figura 9. Endrick postratamiento. a) Se muestra el blefaroespasmio del ojo izquierdo, pero no se apreciaba tan pronunciado como la semana anterior. b) Ligeramente disminuido el edema.

Faraón, Pony, 21 años, tordillo, macho entero; fue el tercer y último equino del grupo experimental, a diferencia de los anteriores presentaba un cuadro agudo, pero no había sido tratado. Ambos ojos presentaban miosis, epífora, edema y neovascularización corneal, inyección escleral y conjuntival, ambos ojos fueron tratados con CTM y se mantuvo por una semana con un midriático tópico.

En la segunda visita ambos ojos se encontraron midriáticos, sin dolor, menor epífora, edema e inyección conjuntival y escleral. Tres días posterior a la segunda visita inició tratamiento médico, pero ya presentaba aún menor edema y se le veía mucho más cómodo.



Figura 10. Faraón pretratamiento, presentaba un cuadro con signos agudos de uveítis de ambos ojos, observándose edema, neovascularización e hiperemia conjuntival.



Figura 11. Faraón postratamiento, en la segunda visita se le notó más cómodo y el edema disminuyó al igual que la hiperemia.

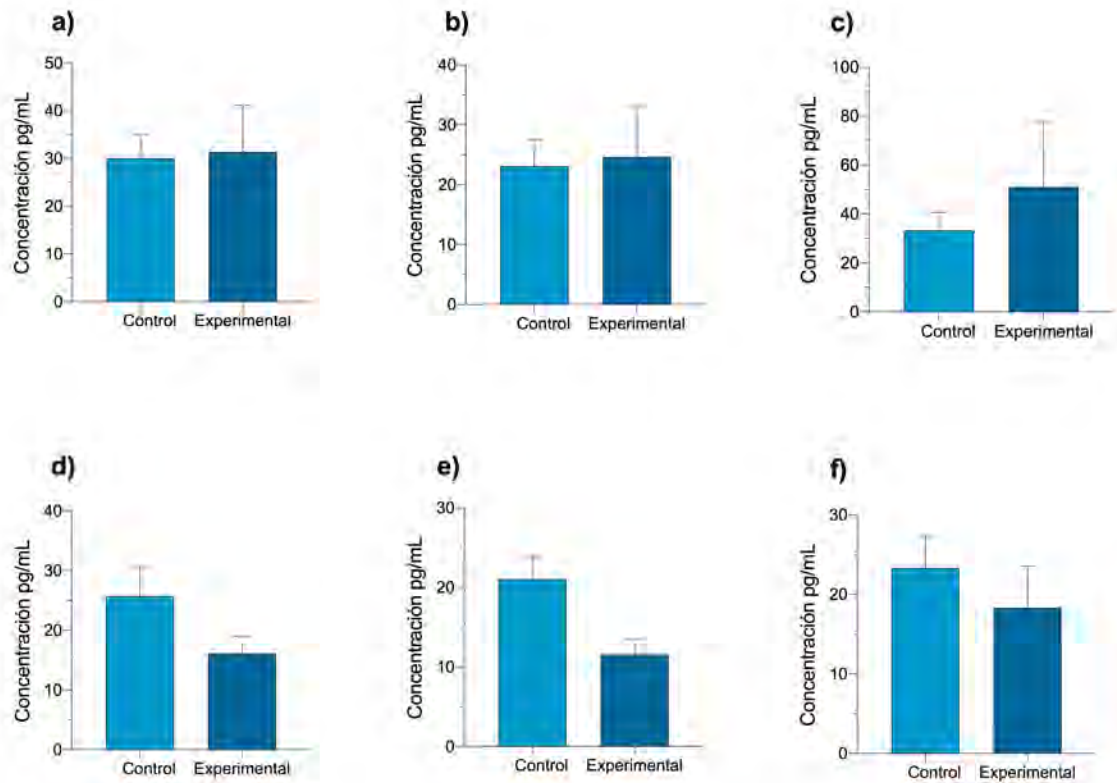
La comparación entre los medios empleados (PBS y CTM) para el grupo control no mostró diferencias en ninguna de las citocinas medidas. No obstante, al comparar la concentración de éstas en diferente tiempo (basal, 30 minutos y 7 días), se encontró que la concentración de IL-1 α con el uso de PBS como vehículo, mostró diferencias estadísticamente significativas entre la medición basal y la realizada 7 días después.

Debido a que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos medios, las mediciones se consideraron dentro de un solo grupo (control) y se contrastaron con los datos obtenidos en el grupo experimental. Al respecto, es importante destacar que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar estos grupos en cuanto a la concentración ni en cuanto a las mediciones realizadas en los tres momentos descritos previamente.

	Grupo control (n=12)						Grupo experimental (n=3)					
	Basal		30 minutos		7 días		Basal		30 minutos		7 días	
	Mediana	Rango	Mediana	Rango	Mediana	Rango	Mediana	Rango	Mediana	Rango	Mediana	Rango
IL-1 α	43.27	38.71 - 53.20	41.62	36.95 - 51.00	38.71*	36.17 - 46.36	40.39	38.31 - 45.32	41.26	35.19 - 43.78	38.31	36.17 - 39.06
IFN- γ	33.94	7.450 - 175.3	18.52	3.900 - 186.6	28.30	3.900 - 341.5	93.12	25.22 - 97.09	45.18	11.17 - 95.31	108.3	14.78 - 329.7
IL-2	1.323	0.4534 - 10.75	0.7810	0.1316 - 14.56	0.8325	0.3679 - 30.42	1.383	0.5992 - 1.729	0.8926	0.4229 - 1.611	1.516	0.9307 - 2.082
IL-10	19.52	6.709 - 70.25	19.43	7.694 - 46.30	17.84	6.709 - 52.23	18.59	10.34 - 19.46	12.43	7.857 - 14.38	14.89	11.49 - 28.56
TNF α	14.63	2.200 - 56.80	2.998	2.200 - 52.03	25.61	2.200 - 70.88	11.53	2.200 - 19.22	2.797	2.200 - 15.64	13.86	8.015 - 17.99

Cuadro 4. Citocinas en dónde se midieron medidas por técnica (mediana y rango) (<Nivel de cuantificación). Nótese que IL-1 α (*) medida 7 días post-tratamiento mostró una disminución estadísticamente significativa en comparación con la medición basal (P=0.0356). Todos los valores son reportados en pg/mL.

Por otra parte, al realizar la comparación entre el conjunto de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias a diferente tiempo en ambas condiciones, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.



Cuadro 5. Gráficas de barras muestran la comparación en la concentración de citocinas pro-inflamatorias (a-c) y citocinas antiinflamatorias (d-e), en condiciones basales (a y d), 30 minutos (b y e) y 7 días pos tratamiento (c y f). En todos los casos se presentan los valores promedio (\pm EE).

DISCUSIÓN

En este trabajo se trató de verificar que el uso de CTM ayudaría a disminuir el proceso inflamatorio en URE, sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el experimental a lo largo del tiempo. La seguridad de las CTM alogénicas utilizadas como terapia por distintas vías de administración está relativamente bien aceptada (Joswig, 2017); sigue sin determinarse la dosis ideal para cualquier aplicación médica o la frecuencia, mas se ha demostrado que la inyección sistémica de CTM adiposas y de médula ósea no inducen una respuesta inflamatoria sistémica en individuos sanos (Kol, 2015; Owens, 2016). Su administración puede ser vía intraperitoneal, intravenosa, subconjuntival e incluso tópica. Distintas investigaciones confirman que tanto la vía subconjuntival como la intravenosa resultan en mejores resultados clínicos al disminuir la inflamación (Shukla, 2019). En este trabajo nos concentramos en la aplicación subpalpebral y no en la conjuntiva bulbar como suele recomendarse, confirmándose su probable baja eficacia al no encontrar cambios importantes entre las 3 tomas de muestras, ni de las citocinas proinflamatorias como las antiinflamatorias. Ha sido descrito antes, mas no tenemos conocimiento de que exista otro trabajo que haya intentado abordar la URE por esta ruta en caballos (Bertone, 2004).

Se han evaluado distintas rutas de administración, buscando la ruta menos invasiva y con mejores resultados ante distintas enfermedades (Shukla, 2019). Se ha comprobado la eficiencia de CTM en modelos de ratón tras quemaduras químicas en la córnea administradas subconjuntivalmente al promover la regeneración del epitelio corneal, reducir la inflamación, la neovascularización y aumentar la expresión de citocinas antiinflamatorias (Ke, 2015; Zakirova, 2019); en modelos de ojo seco en ratas, las aplicaron tópicamente y reportaron una disminución de la inflamación y reepitelización corneal (Beyazyildiz, 2014). En ratones inyectados con CTM humanas subconjuntivalmente, disminuyeron significativamente el TNF- α e inhibieron la respuesta Th1 en quemaduras corneales

(Martínez, 2019; Jia, 2018). Un estudio demostró que una inyección subconjuntival de CTM es más eficaz que la membrana amniótica humana en daño corneal (Ghazaryan, 2016). En gatos con queratitis eosinofílica proliferativa felina se aplicaron CTM de tejido adiposo, obteniendo resultados sumamente alentadores, en comparativa con casos refractarios a tratamientos convencionales (Villatoro, 2018). En caballos se ha observado la efectividad de células troncales mesenquimales de médula ósea (CTM-MO) autólogas en pacientes con queratitis inmunomediada equina, se inyectaron subconjuntivalmente y 3 de 4 individuos tratados respondieron favorablemente, demostrando mejoría en los signos clínicos pasadas 3 semanas de tratamiento. Demostrando que pueden ser una alternativa de tratamiento viable para pacientes que no han mostrado una mejoría con las opciones terapéuticas tradicionales (Davis, 2019).

La administración de distintos fármacos vía periocular está ganando importancia como alternativa para lograr niveles sostenidos de fármacos en diferentes dolencias oculares, mas la biodisponibilidad de la mayoría de los fármacos por esta vía no está claramente establecida en el caballo (Martins, 2012), la inyección subconjuntival es una vía de administración clínica fácil y común (Yao,2012). El que no se encontraran cambios en las citocinas lagrimales de manera significativa en el estudio multiplex ni clínicamente, puede deberse a múltiples causas más allá de la vía de administración elegida. La cantidad de células utilizadas, la cantidad de veces que se inyectaron CTM o los momentos en que se colectaron las lágrimas, son algunas de muchas variables que deben tomarse en cuenta.

Debido a los resultados obtenidos se supone fácilmente que la vía subpalpebral no es la indicada, sin embargo, también podría deberse a la fase de la enfermedad, puesto que la mayoría de los reportes indican una eficacia significativa al aplicarlas en la fase aguda, las primeras horas de malestar son aparentemente vitales. Parece entonces apropiado comparar esta vía de administración con la vía subconjuntival y la intravenosa en futuros trabajos.

Las CTM han demostrado ser superiores a los corticoesteroides y los inmunosupresores en ratas con UAE, fueron tratadas vía intravenosa con las células y se compararon con inyecciones de dexametasona vía intraperitoneal. Las CTM redujeron significativamente la gravedad y la incidencia, sin observarse diferencias significativas entre la terapia preventiva, terapéutica y doble. Por otro lado, los grupos de tratamiento con dexametasona no mostraron ninguna mejora significativa a largo plazo y la terapia con CTM redujo notablemente la gravedad cuando se administró antes de la estabilización de la enfermedad, suprimiendo casi por completo la expresión clínica de la uveítis (Zhang, 2014). Proponiéndose en futuros trabajos administrarlas de manera preventiva, una vez que cedan los signos de enfermedad, en espera de que el siguiente cuadro tarde más en llegar y no sea tan severo.

En este caso se quiso evitar la obtención de humor acuoso, debido a que es un procedimiento en extremo invasivo en ojos que cuentan con un cuadro inflamatorio, ocasionando un mayor daño. Es por eso que se eligió la medición de lágrimas, en humanos existe evidencia de que se producen cambios en las lágrimas debido a la UAH (Carreño, 2017). Hace una década el porcentaje de artículos publicados sobre biomarcadores de lágrimas en enfermedades sistémicas representó casi el 50% del total de artículos publicados en 10 años, demostrando un interés exponencial como fuente potencial de nuevos biomarcadores en diversas patologías (Cutler, 2010). Se ha demostrado incluso, tras obtener muestras lagrimales y humor acuoso de pacientes con glaucoma y comparar los niveles de citocinas, que todas las muestras, excepto la IL-2, mostraron niveles significativamente más altos en lágrimas en comparación con el humor acuoso (Csösz, 2019).

Las lágrimas proporcionan un entorno extracelular óptimo y fundamental para numerosas funciones oculares, sabiéndose que, la película lagrimal normal contiene varias citocinas pro y antiinflamatorias. La tecnología basada en perlas ha permitido

la cuantificación simultánea de múltiples citocinas y quimiocinas en muestras lagrimales tan pequeñas como 1 μ l (Carreño, 2010). Se ha sugerido que las lágrimas podrían usarse para controlar el estado *in vivo* de la superficie ocular; sin olvidar que su recolección es indoloro y no invasivo. En humanos con uveítis se han medido citocinas lagrimales, tanto en pacientes sin tratamiento sistémico en el momento de la recolección, como algunos con antiinflamatorios no esteroideos, algún agente inmunomodulador y la combinación de dos o más inmunomoduladores. Concluyéndose que las lágrimas de pacientes con uveítis tienen un perfil diferente de concentraciones de citocinas en comparación con sujetos normales (Carreño, 2017).

La producción de citocinas proinflamatorias está regulada por el daño de la superficie ocular, produciéndose tanto por células linfocíticas que se infiltran en la superficie ocular como por las propias células de la superficie ocular. (Sgrignoli, 2019). La inflamación ocular que impulsa la patogénesis se ha asociado con un perfil de citocinas de tipo Th1 y recientemente con Th17. Además, la IL-6 se encuentra elevada en distintos tejidos oculares, perpetuando la inflamación y promoviendo células Th17. Aunque sus roles no se han comprendido del todo, lo anterior sugiere que tanto la IL-6 como la IL-17 juegan un papel inmunológico importante en la URE (Regan, 2012; Mesquida, 2017; Diedrichs-Möhring, 2018). En el ensayo se buscaron ambas citocinas, mas no fueron detectadas, por lo anterior, no fueron tomadas en cuenta en los resultados. La falta de detección no es sorprendente, puesto que otros trabajos también indican que es poco común encontrarlas, incluso en pacientes con la fase aguda de la patología. Existe la posibilidad de que dichas moléculas pudiesen detectarse en otro momento de la enfermedad, en pacientes sin tratamiento previo, se encuentran unidas a distintos tejidos o simplemente porque la lágrima en este tipo de pacientes no es un biomarcador factible, por lo que se requieren más investigaciones al respecto.

Se ha visto que en ojos afectados por la URE los niveles de IL-10, así como de IL-1 α , IFN- γ , IL-6 e IL-17 son altos (Saldinger, 2019); sin embargo, de las moléculas que logró detectar el ensayo multiplex, no presentaron cambios estadísticamente significativos y no concuerdan con lo reportado anteriormente. En el caso de la recolección de humor acuoso en pacientes con distintos padecimientos, entre ellos la URE, la IL-10 y IL-6 se encontraban elevadas, incluso en ojos tratados con esteroides tópicos (Curto, 2016). Se necesitan más estudios al respecto, buscando primero, si existe cierta normalidad en caballos sanos y posteriormente en distintas patologías como la expuesta. Existen muchas variables que pueden haber ocasionado tales resultados, sin mencionar, que se desconoce de dónde provienen las citocinas lagrimales de los pacientes; si difundieron, fueron secretadas por linfocitos infiltrados o del mismo tejido ocular (Carreño, 2017). Se requiere determinar si las citocinas en lágrima realmente son un reflejo de lo que expresan el resto de los tejidos oculares afectados, incluso sistémicos en dado caso. De ser así, abriría una puerta diagnóstica con grandes ventajas, que, junto con las CTM como tratamiento, permitirían divisar un horizonte lleno de posibilidades en la clínica oftalmológica.

Por otro lado, debido a la disponibilidad limitada de anticuerpos comerciales específicos de especie y reacciones cruzadas, muchas veces las poblaciones celulares son bastante heterogéneas al compararlas con los requisitos que ha impuesto la ISCT en humanos (Maia, 2013). Hasta ahora no se cuenta con criterios uniformes para la caracterización de CTM de origen animal, las CTM equinas cumplen con la adherencia al plástico y la pluripotencia (Gugjoo, 2019). Las muestras con las que se trabajó presentaron una inconsistencia homogénea de negatividad en el marcador CD105, puesto que en humanos debería ser altamente positivo. Estos resultados coinciden con otros trabajos que han declarado que, en caballos, la molécula CD105 presenta fluctuaciones; inestabilidad expresada no solamente en tejido de cordón, sino también en sangre de cordón umbilical y sangre periférica. De igual forma, el marcador CD73 ha presentado cambios en

comparación con las humanas, sin embargo, en este trabajo fue considerado positiva (De Schauwer, 2011, 2014; Tessier, 2015). Se ha propuesto que estas diferencias se pueden deber a las distintas fuentes de tejido, los anticuerpos utilizados, ya que no todos son reactivos a moléculas de caballo y los métodos de recolección (De Schauwer, 2011; Gugjoo, 2019). Aunque los lineamientos de la ISCT son de ayuda, se cree que se debe buscar una nueva uniformidad dentro del criterio de CTM en medicina veterinaria, puesto que existen también fluctuaciones en otras especies, y la falta de uniformidad complica el progreso de las investigaciones de esta rama (De Schauwer, 2012; Penny, 2012).

La diferenciación fue exitosa, sin embargo, la adipogénica no fue considerada sencilla, la literatura menciona que esto se ha visto más de lo que es publicado en este tipo celular y algunos refieren que es logrado fácilmente utilizando suero de conejo en el coctel de diferenciación. En este caso no fue necesario, sin embargo, es una situación que para posteriores experimentos debe tomarse en cuenta para evitar demoras (De Schauwer, 2011; Penny, 2012).

Se han utilizado modelos de uveítis en cobayos, ratas, ratones, monos y caballos para entender los mecanismos de esta enfermedad tan compleja y heterogénea (Bose, 2016). La importancia de estudiar la URE, se debe a que es el equivalente equino, y único modelo espontáneo, de UAH (Degroote, 2017), mas no existe modelo animal que sea capaz de replicar todas las características implicadas en la UAH (Simeonova, 2016). Más de la mitad de los caballos con URE en algún punto perderán la vista, y los tratamientos actuales, aunque sean agresivos, solo retardan el proceso inflamatorio. Por ello, al saberse ya que el daño es resultado de una activación de células T, se busca como alternativa el uso de CTM. Utilizadas ya en enfermedades inflamatorias e inmunomediadas al inducir un cambio en los subconjuntos de células T proinflamatorias hacia las supresoras (Saldinger, 2019).

En equinos se han aislado CTM de tejidos tales como sangre periférica, periostio, tejido adiposo, médula ósea, endometrio, membrana sinovial, ligamento periodontal, pulpa dental, folículo piloso y anexos fetales, como sangre de cordón umbilical y la gelatina de Wharton (Gugjoo, 2019; Maia, 2013). La médula ósea, tanto en equinos como en humanos, es considerada la principal fuente, no obstante, disminuye significativamente con la edad. En humanos se ha comprobado que la tasa de éxito del aislamiento de obtención de CTM a partir de sangre umbilical es menor que el rendimiento del tejido umbilical, cercano al 100% (Secco, 2008; De Schauwer, 2014). La gelatina de Wharton presenta altas tasas de proliferación, son clonogénicas, pueden diferenciarse en distintos tejidos, no son teratogénicas y son bien toleradas (Fong, 2016). La colección de las CTM-CU no representó riesgo alguno para la yegua o el potro, no fue invasiva, fue indolora, no figuró un problema ético; ciertamente fue una fuente copiosa de células, su expansión, almacenamiento y congelación se realizaron sin mayor contratiempo.

Al obtenerse muestras de animales de granja se suele cuestionar el nivel de contaminación que puedan presentar, debido al entorno no estéril de donde se obtienen y el posible contacto con heces. Se reportó ya, que los cordones no presentan contaminación alguna tras la inmersión nocturna a 4°C posterior a su colección con 5% de penicilina/estreptomicina y 2% de anfotericina B (Passeri, 2009). En este caso, una sola muestra de primocultivo presentó contaminación tras el reposo protocolario de casi 12 horas en antibiótico, el cambio de medio permitió su eliminación, mas se decidió retirar dicha muestra del resto del proyecto.

El principal obstáculo fue la obtención de casos de la URE, aunque es una enfermedad común, no suele verse diario. Sin tomar en cuenta que muchos de los casos que llegaron no completaban los requerimientos de inclusión y por ende solo se trabajó con 3 caballos, de los cuales 2 se encontraban ya con tratamiento, capaz de modificar la detección de los marcadores que se buscaron. El segundo obstáculo fue la obtención de datos a partir de las lágrimas con el ensayo multiplex, la curva

tuvo que realizarse 2 veces, alargándola, ya que era tan pequeña la cantidad de moléculas que se deseaba detectar, que el equipo no permitía su lectura, y hubo datos que nunca fueron detectados. El tercer obstáculo fue mencionado durante la diferenciación de las CTM, se ha observado que dependiendo del origen que estas tengan, se comportan diferente y con las que se trabajó no salen de la regla. Su diferenciación a tejido adiposo fue difícil al inicio, al igual que la mínima expresión de ciertos marcadores moleculares, que, aunque pretenden darles valor y estabilidad a los estudios al compararlo con trabajos humanos, se ha observado que las células que vienen de animales, en este caso caballos, no se comportan de igual manera a las humanas.

CONCLUSIONES

La inyección subpalpebral de CTM con la dosis y frecuencia utilizada, no parece ser tan eficiente para controlar los signos de URE, en comparación con otros trabajos ya publicados.

En prospectiva se requieren de distintas aproximaciones para medir las citocinas, y encontrar la vía, dosis y frecuencia ideal de dichas células para controlar los signos de enfermedad. Se han observado avances en distintos escenarios, confirmando existe entonces la manera de aprovecharlas en diversos padecimientos. Las CTM tienen un potencial colosal que aún no se termina de comprender, este estudio abre oportunidades de crecimiento para intentar nuevas rutas que no solo puedan mejorar la calidad de vida de los caballos, sino también en un futuro de humanos con UAH.

ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

cm	centímetros
CRALBP	Proteína celular de unión al retinaldehído
CsA	Ciclosporina A
CT	Célula troncal
CTM	Células troncales mesenquimales
CTM-CU	Células troncales mesenquimales de cordón umbilical
CTM-MO	Células troncales mesenquimales de médula ósea
DC	Células dendríticas
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
g	gramos
g	unidades g
HGF	Factor de crecimiento de los hepatocitos
HLA-G5	Antígeno leucocitario humano-G5
IDO	Indolamina-2,3-dioxigenasa
IFNγ	Interferón gamma
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
INR	Instituto Nacional de Rehabilitación
IRBP	Proteína intersticial de la unión al retinol
ISCT	Sociedad Internacional de Terapia Celular
L	litros
mg	miligramos
MHC-I	Complejo mayor de histocompatibilidad tipo I

MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad tipo II
min	minutos
ml	milímetro
mm	milímetros
NO	Óxido nítrico
P#	Número de pase
PBS	Solución salina tamponada de fosfatos
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PIO	Presión intraocular
PSI	Pura Sangre Inglés
S-Ag	Antígeno S
SFB	Suero fetal bovino
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Células T reguladoras
UAE	Uveítis autoinmune experimental
UAH	Uveítis autoinmune humana
URE	Uveítis recurrente equina
VPP	Vitrectomía de la pars plana
°C	Grados centígrados
μg	microgramos
μL	microlitros
μm	micrómetros

REFERENCIAS

- Barberini, D.J. Freitas, N.P.P. Magnoni, M.S. Maia, L. Listoni, A.J. Heckler, M.C. Sudano, M.J. Golim, M.A. Landim-Alvarenga, F.C. & Amorim, R.M. (2014) Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. *Stem Cell Research & Therapy*. 5 (25), 1-11.
- Bertone, J.J. & Horspool, L.J.I. (2004) *Equine Clinical Pharmacology*. EUA, Saunders.
- Beyazyildiz, E. Pinarli, F.A. Beyazyildiz, O. Hekimoglu, E.R. Acar, U. Demir, M.N. Albayrak, A. Kaymaz, F. Sobaci, G. & Delibasi, T. (2014) Efficacy of topical mesenchymal stem cell therapy in the treatment of experimental dry eye syndrome model. *Stem cell International*. 1-9.
- Bose, T. Diedrichs-Möhrling, M. & Wildner G. (2016) Dry eye disease and uveitis: A closer look at immune mechanisms in animal models of two ocular autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*. 15, 1181-1192.
- Brooks, D.E. (2008) *Equine Ophthalmology for the Equine Practitioner*. 2nd ed. EUA, Teton New Media.
- Carrade, D.D. Affolter, V.K. Outerbridge C.A. Watson, J.L. Galuppo, L.D. Buerchler, S. Kumar, V. Walker, N.J. & Borjesson D.L. (2011) Intra-dermal injections of equine allogeneic umbilical cord-derived mesenchymal stem cells are well tolerated and do not elicit immediate or delayed hypersensitivity reactions. *Cytotherapy*. 13, 1180-1192.
- Carrade, D.D. & Borjesson D.L. (2013) Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells in Veterinary Species. *Comparative Medicine*, 63 (3), 207-217.
- Carrade, D.D. Lame, M.W. Kent, M.S. Clark, K.C. Walker, N.J. & Borjesson, D.L. (2012) Comparative Analysis of the Immunomodulatory Properties of Equine Adult-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell Medicine*. 4, 1-11.
- Carreño, E. Enríquez-de-Salamanca, A. Tesón, M. García-Vázquez, C. Stern, M.E. Whitcup, S.M. & Calogne, M. (2010) Cytokine and chemokine levels in tears from healthy subjects. *Acta Ophthalmologica*. 88, e250-e258.

- Carreño, E. Portero, A. Herreras, J.M. García-Vázquez, C. Whitcup, S.M. Stern, M.E. Calogne, M. & Enríquez-de-Salamanca, A. (2017) Cytokine and chemokine tear levels in patients with uveitis. *Acta Ophthalmologica*. 95, e405-e414.
- Castro-Manrreza, M.E. & Montesinos, J.J. (2015) Immunoregulation by Mesenchymal Stem Cells: Biological Aspects and Clinical Applications. *Journal of Immunology Research*. 2015, 1-20.
- Chávez, G. M. A., Chimal, M. J., Flores, F. E. & Lamas, M. (2017) Células Troncales Biología y Aplicaciones en Biomedicina 1. México, Porrúa.
- Chávez, G. M. A., Chimal, M. J., Flores, F. E. & Lamas, M. (2017) Células Troncales Biología y Aplicaciones en Biomedicina 2. México, Porrúa.
- Csösz, É. Deák, E. Tóth, N. Traverso, C.E. Csutak, A. & Tözsér, J. (2019) Comparative analysis of cytokine profiles of glaucomatous tears and aqueous humour reveals potential biomarkers for trabeculectomy complications. *FEBS Press*. 9, 1020-1028.
- Curto, E. Messenger, K.M. Salmo, J.H. & Gilger, B.C (2016) Cytokine and chemokine profiles of aqueous humor and serum in horses with uveitis measured using multiplex bead immunoassay analysis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 182, 43-51
- Cutler, A.J. Limbani, V. Girdlestone, J. & Navarrete, C.V. (2010) Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells modulate monocyte function to suppress T cell Proliferation. *The Journal of Immunology*. 185, 6617-6623.
- Davis, A.B. Schnabel, L.V. & Gilger, B.C. (2018) Subconjunctival bone marrow-derived mesenchymal stem cell therapy as a novel treatment alternative for equine immune-mediated keratitis: A case series. *Veterinary Ophthalmology*. 00, 1-9.
- Deeg, C. A. Hauck S. M. Amann B. Kremmer, E. Stangassinger M. & Ueffing M. (2007) Major retinal autoantigens remain stably expressed during all stages of spontaneous uveitis. *Molecular Immunology*. 44, 3291-3296.

- Degroote, R.L. Uhl, P.B. Amann, B. Krackhardt, A.M. Ueffing, M. Hauck, S.M. & Deeg, C.A. (2017) Formin like 1 expression is increased on CD4+ Tlymphocytes in spontaneous autoimmune uveitis. *Journal of Proteomics*. 154, 102-108.
- De Schauwer, C. Piepers, S. Van de Walle, G.R. Demeyere, K. Hoogewijs, M.K. Govaere, J.L.J. Braeckmans, K. Van Soom, A. & Meyer, E. (2012) In search for cross-reactivity to immunophenotype equine mesenchymal stromal cells by multicolor flow cytometry. *Cytometry Part A*, 81A, 312-323.
- De Schauwer, C. Meyer, E. Van de Walle, G.R. & Van Soom, A. (2011) Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. *Theriogenology*, 75, 1431-1443.
- De Schauwer, C. Goosens, K. Piepers, S. Hoogewijs, M.K. Govaere, J.L.J. Smits, K. Meyer, E. Van Soom, A. & Van de Walle, G.R. (2014) Characterization and profiling of immunomodulatory genes of equine mesenchymal stromal cells from non-invasive sources. *Stem Cell Research & Therapy*, 81A, 5 (6),1-13.
- Dias, M.C., Landim-Alvarenga, F.C. Moraes C.N. Costa, L.D. Geraldini, C.M. Machado V.M.V. & Maia, L. (2016) Intramuscular Transplantation of Allogeneic Mesenchymal Stromal Cells Derived from Equine Umbilical Cord. *International Journal of Stem Cells*, 9 (2), 239-249.
- Diedrichs-Möhring, M. Kaufmann, U. & Wildner, G. (2018) The immunopathogenesis of chronic and relapsing autoimmune uveitis – Lessons from experimental rat models. *Progress in Retinal and Eye Research*. 65, 107-126.
- Flores, F. E., Montesinos, J. J. y Mayani H. (2006) Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Revista de Investigación Clínica*, 58 (5), 498-511.
- Fong, C-Y. Subramaniam, A. Biswas, A. & Bongso, A. (2016) Freezing of fresh Wharton's jelly from human umcilical cords yields high post-thaw

mesenchymal stem cells numbers for cell-based therapies. *Journal of Cellular Biochemistry*. 117, 815-827.

- Gerding, J.C. & Gilger, B.C. (2016) Prognosis and impact of equine recurrent uveitis. *Equine Veterinary Journal*, 40, 290-298.
- Ghazaryan, E. Zhang, Y. He, Y. Liu, X. Li, Y. Xie, J. & Su, G. (2016) Mesenchymal stem cells in corneal neovascularization: Comparison of different application routes. *Molecular Medicine Reports*. 14, 3104-3112
- Gilger, B.C. Wilkie, D.A. Clode, A.B. McMullen Jr, R.J. Utter, M.E. Komaromy, A.M Brooks D.E. & Salmon J.H. (2010) Long-term outcome after implantation of a suprachoroidal cyclosporine drug delivery device in horses with recurrent uveitis. *Veterinary Ophthalmology*, 13(5), 294-300.
- Gilger, B.C. ed. (2017) *Equine Ophthalmology*. 3rd ed. Singapore, Wiley Blackwell.
- Gugjoo, M.B. Makhdoomi, D.M & Sharma, G.T. (2019) Equine Mesenchymal Stem Cells: Properties, Sources, Characterization, and Potential Therapeutic Applications. *Journal of Equine Veterinary Science*. 72, 16-27.
- Hidalgo, M.D.L.G (2015) Obtención, Cultivo y Diferenciación de Células Troncales de Pulpa Dentaria de Equinos. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Jia, Z. Li, F. Zeng, X. Lv, Y. & Zhao, S. (2018) The effects of local administration of mesenchymal stem cells on rat corneal allograft rejection. *BMC Ophthalmology*. 18 (139), 1-10.
- Joswig, A.J. Mitchell, A. Cummings, K.J. Levine, G.J. Gregory, C.A. Smith III, R. & Watts, A.E. (2017) Repeated intra-articular injection of allogeneic mesenchymal stem cells causes an adverse response compared to autologous cells in the equine model. *Stem Cell Research & Therapy*. 8 (42), 1-11.
- Ke, Y. Wu, Y. Cui, X. Liu, X. Yu, M. Yang, C. & Li, X. (2015) Polysaccharide hydrogel combined with mesenchymal stem cells promotes the healing of corneal alkali burn in rats. *Plos One*. 10 (3), 1-18.

- Kol, A. A Wood, J. Carrade, D.D.H. Gillette, J.A. Bohannon-Worsley, L.K. Puchalski, S.M. Walker, N.J. Clark, K.C. Watson, J.L. & Borjesson, D.L. (2015) Multiple intravenous injections of allogeneic equine mesenchymal stem cells do not induce a systemic inflammatory response but do alter lymphocyte subsets in healthy horses. *Stem Cell Research & Therapy*. 6 (73), 1-9.
- König, H. E., Liebich, HG. ed. (2009) *Veterinary Anatomy of Domestic Mammals Textbook and Colour Atlas*. 4ta ed. Alemania, Schattauer.
- Ku, Z.Q. (2017) *Estandarización Técnica de los Potenciales Evocados Visuales en Caballos Adultos Sanos*. Maestría en Ciencias de la Producción y Salud Animal, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Leonardi, A. Curnow, S.J. Zhan, H. & Calder, V.L. (2006) Multiple cytokines in human tear specimens in seasonal and chronic allergic eye disease and in conjunctival fibroblast cultures. *Clinical and Experimental Allergy*. 36, 777-784.
- Lipeng, B. Danting, L. Jie, L. Zhengzhong, L. Shumin, Y. Suizhong, C. Lihong, S. Zhicai, Z. & Xiaoping M. (2016) Bioactive molecules derived from umbilical cord mesenchymal stem cells. *Acta Histochemica*, 118, 761-769.
- Ma, O.K. Chan, K.H. (2016) Immunomodulation by mesenchymal stem cells: Interplay between mesenchymal stem cells and regulatory lymphocytes. *World Journal of Stem Cells*. 8(9), 268-278.
- Maia, L. Dias, M.C. de Moraes, C.N. Freitas-Dell'Aqua, C.P. da Mota, L.S.L.S. Santiloni, V. & Landim-Alvarenga, F.C. (2017) Conditioned médium: a new alternative for cryopreservation of equine umbilical cord mesenchymal stem cells. *Cell Biology International*. 41, 239-248.
- Maia, L. Landim-Alvarenga, F.C. Silveira da mota, L.S.L. De Assis Golim, M. Laufer-Amorim, R. De Vita, B. Barberini, D.J. Listoni, A.J. Nogueira de Moraes, C. Thomas, M.C.H. & Martins, R.A. (2013) Immunophenotypic, immunocytochemistry, ultrastructural and cytogenetic characterization of

mesenchymal stem cells from equine bone marrow. *Microscopy research and technique*. 76, 618-624.

- Martínez, R.C. Sánchez, L.I.A. Nieto, C.G. García, E.M. Sánchez, F.G. Argüeso, P. Aijón, J. Hernández, E.G. & Velasco, A. (2019) Subconjunctival injection of mesenchymal stromal cells protects the cornea in an experimental model of GVHD. *The Ocular Surface*. 17, 285-294.
- Martins, B.C. & Brooks, D.E. (2012) Subconjunctival drug administration in horses. *Equine Veterinary Education*. 24 (10), 493-495.
- Mesquida, M. Molins, B. Llorenc, V. Sainz, M.M. & Adán, A. (2017) Targeting interleukin-6 in autoimmune uveitis. *Autoimmunity Reviews*. 16, 1079-1089.
- Owens, S.D. Kol, A. Walker, N.J. & Borjesson, D.L. (2016) Allogeneic mesenchymal stem cell treatment induces specific alloantibodies in horses. *Stem Cells International*. 2016, 1-8.
- Papotto, P.H. Marengo, E.B. Sardinha, L.R. Goldberg, A.C. & Rizzo, L.V. (2014) Immunotherapeutic strategies in autoimmune uveitis. *Autoimmunity Reviews*. 13, 909-916.
- Passeri, S. Nocchi, F. Lamanna, R. Lapi, S. Miragliotta, V. Giannesi, E. Abramo, F. Stornelli, M.R. Matarazzo, M. Plenteda, D. Urciuoli, P. Scatena, F. & Coli, A. Isolation and expansion of equine umbilical cord-derived matrix cells (EUCMCs). *Cell Biology International*. 33, 100-1005.
- Penny, J. Harris, P. Shakesheff, K. & Mobasher, Ali. (2012) The biology of equine mesenchymal stem cells: phenotype characterization, cell surface markers and multilineage differentiation. *Frontiers in Bioscience*. 17, 892-908.
- Pérez, E.E.D (2018) Evaluación Artroscópica de la Respuesta de Lesiones Experimentales en Cartílago Articular al Tratamiento con Células Mesenquimales diferenciadas Sembradas en un Polímero de PGA en el Equino. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Regan, D.P. Aarnio, M.C. Davis, W.S. Carmichael, K.P. Vandenplas, M.L. Lauderdale, J.D. & Moore, P.A. (2012) CHaracterization of cytokines

- associated with Th17 cells in the eyes of horses with recurrent uveitis. *Veterinary Ophthalmology*. 15 (3), 145-152.
- Rohrbach, B.W. Ward, D.A. Hendrix, D.V.H. Cawrse-Foss, M. & Moyers, T.D. (2005) Effect of vaccination against leptospirosis on the frequency, days to recurrence and progression of disease in horses with equine recurrent uveitis. *Veterinary Ophthalmology*. 8 (3), 171-179.
 - Saldinger, L.K. Nelson, S.G. Bellone, R.R. Lassaline, M. Mack, M. Walker, N.J. & Borjesson, D.L. (2019) Horses with equine recurrent uveitis have an activated CD4+ T-cell phenotype that can be modulated by mesenchymal stem cells in vitro. *Veterinary Ophthalmology*. 23, 160-170.
 - Secco, M. Zucconi, E. Vieira, N.M. Fogaca, L.L.Q. Cerqueira, A. Carvalho, M.D.F. Jazedje, T. Okamoto, O.K. Muotri, A.R. & Zatz, M. (2008) Multipotent Stem Cells from Umbilical Cord: Cord Is Richer than Blood. *Stem Cells*. 26, 146-150.
 - Sgrignoli, M.R. Silva, D.A. Nascimento, F.F. Sgrignoli, D.A.M. Nai, G.A. da Silva, M.G. De Barros, M.A. Bittencourt, M.K.W. de Moraes, B.P. Dinallo, H.R. Foglia, B.T.D. Cabrera, W.B. Fares, E.C. & Andrade, S.F. (2019) Reduction in the inflammatory markers CD4, IL-1, IL-6 and TNF α in dogs with keratoconjunctivitis sicca treated topically with mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research*. 39, 1-7.
 - Shukla, S. Mittal, S.K. Foulsham, W. Elbasiony, E. Singhania, D. Sahu, S.K. & Chauhan, S.K. (2019) Therapeutic efficacy of different routes of mesenchymal stem cell administration in corneal injury. *The Ocular Surface*. 17, 729-736.
 - Simeonova, G.P. Krastev, S.Z. & Simeonov R.S. (2016) Immunological and pathological investigations in equine experimental uveitis. *Veterinary Research Communications*. 40, 107-115.
 - Strubbe, D.T. Brooks, D.E. Schultz, G.S. Willis-Goulet, H. Gelatt, K.N. Andrew, S.E. Kallberg, M.E. Mackay, E.O. & Collante, W.R. (2000) Evaluation

- of tear film proteinases in horses with ulcerative keratitis. *Veterinary Ophthalmology*. 3, 111- 119.
- Tessier, L. Bienzle, D. Williams, L.B. & Koch, T.G. (2015) Phenotypic and immunomodulatory properties of equine cord blood-derived mesenchymal stromal cells. *Plos one*. 10 (4), 2-19.
 - Villatoro, A.J. Claros, S. Fernández, V. Alcoholado, C. Fariñas, F. Moreno, A. Becerra, J. & Andrades, J.A. (2018) Safety and efficacy of the mesenchymal stem cell in feline eosinophilic keratitis treatment. *BMC Veterinary Research*. 14 (116), 1-13.
 - Witowski, L. Cywinska, A. Paschalis-Trela, K. Crisman, M. & Kita, J. (2016) Multiple etiologies of equine recurrent uveitis – A natural model for human autoimmune uveitis: A brief review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 44, 14-20.
 - Yao, L. Li, Z-r. Su, W-r. Li, Y-p. Lin, M-l. Zhang, W-x. Liu, Y. Wan, Q. & Liang, D. Role of mesenchymal stem cells on cornea wound healing induced by acute alkali burn. *Plos One*. 7 (2), 1-7.
 - Zakirova, E.Y. Valeeva, A.N. Aimaletdinov, A.M. Nefedovskaya, L.V. Akhmetshin, R.F. Rutland, C.S. & Rizvanov, A.A. (2019) Potential therapeutic application of mesenchymal stem cells in ophthalmology. *Experimental Eye Research*. 189, 1-6.
 - Zhang, L. Zheng, H. Shao, H. Nian, H. Zhang, Y. Bai, L. Su, C. Liu, X. Dong, Li, X. & Zhang, X. (2014) Long-term therapeutic effects of mesenchymal stem cells compared to dexamethasone on recurrent experimental autoimmune uveitis of rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 55, 5561-5571.
 - Zhao, P.T. Zhang, L.J. Shao, H. Bai, L.L. Yu, B. Su, C. Dong, L.J. Liu, X. Li, X.R. & Zhang X.M. (2016) Therapeutic effects of mesenchymal stem cells administered at later phase of recurrent experimental autoimmune uveitis. *International Journal of Ophthalmology*. 9 (10), 1381-1389.