

Uso de células estromales mesenquimales derivadas de la gelatina de Wharton para el tratamiento de uveítis recurrente equina: estudio piloto

María Masri-Daba ^{a,*}

Montserrat Erandi Camacho-Flores ^b

Ninnet Gómez-Romero ^{c,d}

Francisco Javier Basurto Alcántara ^c

^a Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Medicina, Cirugía y Zootecnia para Équidos. Ciudad de México, México.

^b Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. Ciudad de México, México.

^c Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Microbiología e Inmunología. Ciudad de México, México.

^d Comisión México-Estados Unidos para la prevención de fiebre Aftosa y otras enfermedades exóticas de los animales. Ciudad de México, México.

*Autor de correspondencia: masri@unam.mx

Resumen:

La uveítis recurrente equina (URE) es una enfermedad que afecta del 2 al 25 % de los equinos a nivel mundial, de los cuales el 56 % se quedan ciegos; por lo tanto, es considerada la causa más común de ceguera en caballos. La URE es un padecimiento espontáneo inmunomediado caracterizado por eventos recurrentes de inflamación intraocular. Actualmente, no existe tratamiento para los caballos con esta enfermedad. Las células estromales mesenquimales (CEM) derivadas de diversos tejidos, como la gelatina de Wharton (GW), han demostrado su capacidad de modular la respuesta inmune al regular negativamente el proceso inflamatorio. El objetivo del presente estudio piloto fue el evaluar el efecto del uso de CEM

derivadas de GW como tratamiento para la URE. La GW se obtuvo y procesó con base en metodologías previamente descritas para la obtención de CEM. Los caballos involucrados en este estudio recibieron una dosis de 5×10^6 CEM en la zona subpalpebral. Se evaluó la concentración de interleucinas (IL) (IL-1 α , IL-2, IL-10, IFN- γ y TNF α) en muestras de lágrima obtenidas antes de la inoculación del tratamiento, 30 min después y 7 días post inoculación. No se observaron cambios significativos en la concentración de IL que sugieran la disminución de IL proinflamatorias. Sin embargo, los caballos con URE tratados con CEM mostraron una respuesta positiva a la terapia, evidenciada por la disminución en la signología de la URE. Los resultados obtenidos sugieren que el tratamiento de la URE con CEM derivadas de GW es una alternativa segura con resultados prometedores.

Palabras clave: Gelatina de Wharton, Células estromales mesenquimales, Uveítis recurrente equina, Terapéutica.

Recibido: 27/06/2022

Aceptado: 01/08/2022

Introducción

Las células estromales mesenquimales (CEM) se caracterizan por su capacidad de diferenciación en diversos linajes celulares; por lo tanto, pueden estar involucradas en la regeneración de tejidos dañados. Otra característica importante de las CEM es que tienen propiedades antiinflamatorias y regulan la respuesta inmune al producir un conjunto de factores inmunomoduladores como la interleucina 6 (IL-6), prostaglandina E2 (PEG2) y óxido nítrico^(1,2). La secreción de estos factores inhibe la proliferación de linfocitos T activados, disminuye la secreción de citocinas proinflamatorias e incrementan la población de linfocitos T reguladores (LT_{reg})^(2,3,4).

En equinos, las CEM pueden obtenerse a partir de médula ósea, tejido adiposo, membrana amniótica, sangre de cordón umbilical y tejido de cordón umbilical de potro conocido como gelatina de Wharton (GW)⁽⁵⁾. La GW es el tejido conjuntivo mucoso primitivo del cordón umbilical que se encuentra entre el epitelio amniótico y los vasos umbilicales; consiste en una sustancia con base en ácido hialurónico y sulfato de condroitina con una alta concentración de CEM⁽⁶⁾. Debido a sus características moleculares, como la ausencia en la expresión de moléculas de histocompatibilidad I y II, estas células tienen una ventaja única para su aplicación de forma autóloga y alogénica⁽⁷⁾. Particularmente, la GW es considerada una fuente importante de CEM, tanto en humanos como en otras especies, con gran potencial

en la terapéutica de diversas condiciones inflamatorias e inmunomediadas, como la uveítis recurrente equina (URE).

La URE, también conocida como ceguera lunar, es una enfermedad reconocida como la principal causa de ceguera en caballos. Se ha reportado una prevalencia en EUA que va del 2 al 25 % de los equinos⁽⁸⁾. Se caracteriza por episodios recurrentes de inflamación intraocular o niveles bajos de inflamación persistente, que predomina en el iris, cuerpo ciliar y coroides⁽⁹⁾. Esta enfermedad tiene una presentación aguda que incluye signos como miosis, presión intraocular disminuida y adherencias en el iris; mientras que la presentación crónica deriva en el desarrollo de cataratas, glaucoma y ceguera.

Los factores desencadenantes o etiológicos de la URE permanecen desconocidos; sin embargo, se ha reportado que componentes genéticos, así como infecciones por *Leptospira interrogans* podrían estar implicados en el desarrollo de dicha condición^(8,10). De manera subsecuente, los signos que se presentan en la URE son el resultado de la activación de linfocitos T, específicamente Th1 y Th17, causando destrucción del tracto uveal del ojo^(11,12,13). Actualmente, no existe cura para la URE; por consiguiente, el tratamiento se enfoca en disminuir la inflamación con el objetivo de preservar la visión, limitar la recurrencia de episodios y reducir el dolor utilizando antiinflamatorios y midriáticos⁽¹⁴⁾.

Se ha demostrado que el uso de CEM en enfermedades inmunitarias de perros, gatos y caballos puede inducir el cambio de subconjuntos de linfocitos T proinflamatorios a linfocitos T reguladores^(15,16,17). Por lo tanto, el uso de CEM derivadas de la GW en el tratamiento de la URE es una alternativa prometedora. Este artículo describe la obtención, cultivo, caracterización y diferenciación de CEM derivadas de la GW del cordón umbilical de potros al parto y su utilización preliminar en caballos con URE.

Material y métodos

Obtención y cultivo de CEM

Se recolectaron CEM de GW a partir de 26 partos en pradera de yeguas pura sangre inglés (PSI) de entre 5 a 20 años. La toma de cordones umbilicales se realizó hasta la expulsión de la placenta. El manejo y procesamiento de los cordones umbilicales se realizó bajo condiciones de esterilidad en la Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa de Instituto Nacional de Rehabilitación.

Brevemente, se realizó la toma de un fragmento de 15 a 20 cm de cada cordón aún envuelto en amnios, posteriormente se realizaron dos lavados con solución yodada intercalados con lavados de solución salina fisiológica (SSF) esterilizada. Después se realizaron cortes de 5

cm aproximadamente y se conservaron a 4 °C en solución bufferada de fosfatos (PBS) con penicilina (10,000 U/ml) anfotericina B (25 µg/ml) y estreptomycin (10,000 µg/ml) para su procesamiento en el laboratorio. De manera subsecuente, se separó la GW del tejido del cordón umbilical y se depositó en una caja de Petri con PBS en donde se realizaron cortes para facilitar la digestión enzimática. Esta última se llevó a cabo en 10 ml de solución de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con colagenasa (0.8 mg/ml) en incubación a 37 °C por 1 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las células se centrifugaron a 700 xg por 7 min a 37 °C, se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y 1% de penicilina, anfotericina B y estreptomycin (10,000 U/ml; 25 µg/ml; 10,000 µg/ml). El cultivo primario se mantuvo en botellas de cultivo celular de 25cm² incubadas con CO₂ al 5% a 37 °C y se realizaron tres pases una vez que se alcanzó una confluencia del 80 %.

Caracterización de CEM

Las células obtenidas antes del tercer pase se sometieron a evaluación de fenotipo de superficie para corroborar su perfil mesenquimal por medio de citometría de flujo. Se utilizaron 2.5x10⁵ células contenidas en tubos de poliestireno de fondo redondo resuspendidas en 1 ml de PBS. Para el marcaje de las células, éstas se incubaron por 1h con anticuerpos primarios específicos para detección de CD90 (FITC Mouse Anti-Human CD90 Clone 5E10 555595), CD73 (*APC Mouse Anti-Human CD73 Clone AD2560847*), CD105 (*PE Mouse Anti-Human CD105 Clone 266 560839*), CD45 (FITC Mouse Anti-Human CD45 Clone G44-26 555478), CD34 (*PE Mouse Anti-Human CD166 Clone 34 559263*), CD14 (*PerCP Mouse Anti-Human CD14 Clone MφP9 340585*) y MHC-II (*APC Mouse Anti-Human HLA-DR Clone G46-6 559866*). Posteriormente, las células se sometieron a dos lavados y se analizaron utilizando el citómetro de flujo FACS Calibur Becton and Dickinson.

Diferenciación de CEM

Se cultivaron CEM de GW en placas de 12 pozos a una densidad de 5x10⁴ utilizando DMEM suplementado con 5% de SFB y 1% de antibiótico, bajo las mismas condiciones de cultivo que se mencionaron previamente. Después de 48 h el medio de cultivo se reemplazó por medio adipogénico, osteoblástico y condrogénico como se describe a continuación.

Para la inducción del linaje adiposo, después de 48 h de incubación el medio de cultivo celular se reemplazó por medio de diferenciación formulado con DMEM suplementado con 0.5% de SFB, dexametasona (1 mM), 3-isobutil-metilxantina (0.5 mM), insulina (10%), indometacina (50 mM) y penicilina (10,000 U/ml) anfotericina B (25 µg/ml) y estreptomycin (10,000 µg/ml). Se realizaron cambios de medio cada tercer día por 21 días. Finalmente, se evaluó la diferenciación de las células utilizando la tinción rojo Nilo.

La diferenciación de las CEM a linaje osteoblástico se realizó mediante el uso de medio de cultivo DMEM suplementado con SFB 1%, y adicionado con dexametasona (100 nM), ácido ascórbico (0.05 mM), 10 mM/L de β -glicerofosfato y BMP-7 (10 ng/ml). De la misma forma, se realizaron cambios de medio de cultivo cada tercer día por 21 días y la diferenciación osteogénica se evaluó por medio de la tinción Von Kossa.

El linaje condrogénico se obtuvo al utilizar medio de cultivo DMEM adicionado con insulina (10 %), ácido ascórbico (1 mg/ml), factor transformante de crecimiento β (TGF- β) (10 ng/ml), piruvato de sodio (1%) y proteína morfogénica ósea 2 (BMP-2) (100 ng/ml). La evaluación de diferenciación se llevó a cabo con la tinción azul de Alcian.

Caballos

Para este estudio se incluyeron un total de 15 caballos PSI de 2 a 7 años. Como grupo testigo se utilizaron 12 caballos clínicamente sanos. Como parte del grupo experimental se consideraron 3 caballos con al menos un episodio de URE con signos característicos como: miosis, hiperpigmentación del iris, blefaroespasmos, edema corneal, flama acuosa, hipopión, hifema, epífora, fotofobia, fibrina en la cámara anterior, hiperemia conjuntival e inyección escleral. Los caballos utilizados en este estudio se sometieron a un examen físico general y oftalmológico completo estricto que consistió en la evaluación de reflejo de amenaza, respuesta pupilar, reflejo consensual, prueba de Schirmer, sensibilidad corneal, tinción de fluoresceína, prueba Jones, tinción rosa de bengala y observación de fondo de ojo.

Toma de muestra lagrimal e inoculación CEM

Una vez que se conformaron los grupos testigo y experimentales se realizó la sedación de los caballos utilizando xilacina intravenosa a una dosis de 0.3 a 0.5 mg/kg. Posteriormente, se llevó a cabo la toma de 100 μ l de lágrima, realizando la toma con capilar estéril sin aditivos; la muestra se depositó en viales estériles y se conservaron a temperatura de ultracongelación a -80 °C hasta su uso.

Utilizando una jeringa de insulina se realizó la colecta del inóculo, PBS y 5×10^6 CEM para seis caballos del grupo testigo, así como para los tres caballos con URE del grupo experimental; ambos, en un volumen de hasta 200 μ l. Esta parte del procedimiento se llevó a cabo en condiciones de esterilidad.

Previo a la aplicación del inóculo se realizó la asepsia del área con alcohol, evitando el contacto directo con el ojo. Se introdujo una aguja 25G en la zona subpalpebral para posteriormente conectar la jeringa y realizar la inoculación del contenido. La toma de la

segunda y tercera muestra de lágrima se realizaron 30 min y una semana post inoculación respectivamente.

Evaluación de interleucinas en muestras de lágrima

Se realizó la evaluación de las interleucinas IL-1 α , IL-2, IL-10, IFN- γ y TNF α en las muestras de lágrima obtenidas antes y después de la aplicación del tratamiento, por medio de inmunoensayo enzimático (ELISA) de tipo multiplex, con la finalidad de determinar si hay cambios en el patrón de interleucinas detectadas.

Para la prueba de ELISA multiplex se utilizó el kit Milliplex MAP Kit: *Equine Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel*, siguiendo las indicaciones del fabricante en el equipo Luminex (Bio-Plex 200, Bio-Rad Laboratories, EU). Brevemente, se adicionaron 200 μ l de buffer de lavado a cada uno de los 96 pozos de la placa, se cubrió la placa y se incubó en agitación por 10 min a 20 °C; al concluir este tiempo se desechó el contenido de los pozos quitando el excedente al voltear la placa realizando pequeños golpes sobre una cama de toallas absorbentes. Después se adicionaron 25 μ l del estándar y testigos en los pozos correspondientes. A los pozos de las muestras se les agregaron 25 μ l de “*Assay buffer*”. Posteriormente se agregaron 25 μ l de solución matriz a todos los pozos y 25 μ l de la muestra de lágrima a los pozos correspondientes. Por último, se agregaron 25 μ l de la mezcla de perlas a cada uno de los pozos de la placa, la cual se incubó por 18 h en agitación a 4 °C cubierta con papel aluminio.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se desechó el contenido total de la placa y se realizaron tres lavados de ésta. Posteriormente, se adicionaron 25 μ l de anticuerpos de detección de interleucinas en todos los pozos, se selló la placa e incubó en agitación a temperatura ambiente por 1 h. Después se agregaron 25 μ l de estreptavidina-ficoeritrina a todos los pozos, se selló la placa e incubó en agitación a temperatura ambiente por 30 min. Una vez finalizado este paso, se decantó nuevamente el contenido y se hicieron tres lavados. A cada uno de los pozos se adicionaron 150 μ l de “*Seath Fluid*” y por 5 min se mantuvo en agitación a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó la lectura de la placa para la estimación de concentración de las interleucinas detectadas en las muestras de lágrima correspondiente a los tres tiempos de toma de muestra.

Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados de la concentración de interleucinas, 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 CEM) en el grupo control. Posteriormente, se retomó esta prueba para comparar la concentración de citocinas entre el grupo testigo 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 en los diferentes tiempos evaluados (basal, 30 min y 7 días) en ambos grupos. En todos los casos se consideró un valor de $P < 0.05$ como significativo.

Resultados

Obtención y cultivo de CEM

Los cultivos primarios de CEM obtenidos a partir de GW inicialmente mostraban una morfología redondeada y se agruparon en cúmulos de hasta 100 μm . Una vez adheridas, a partir de 120 h adquirieron la morfología fibroblastoide (Figura 1).

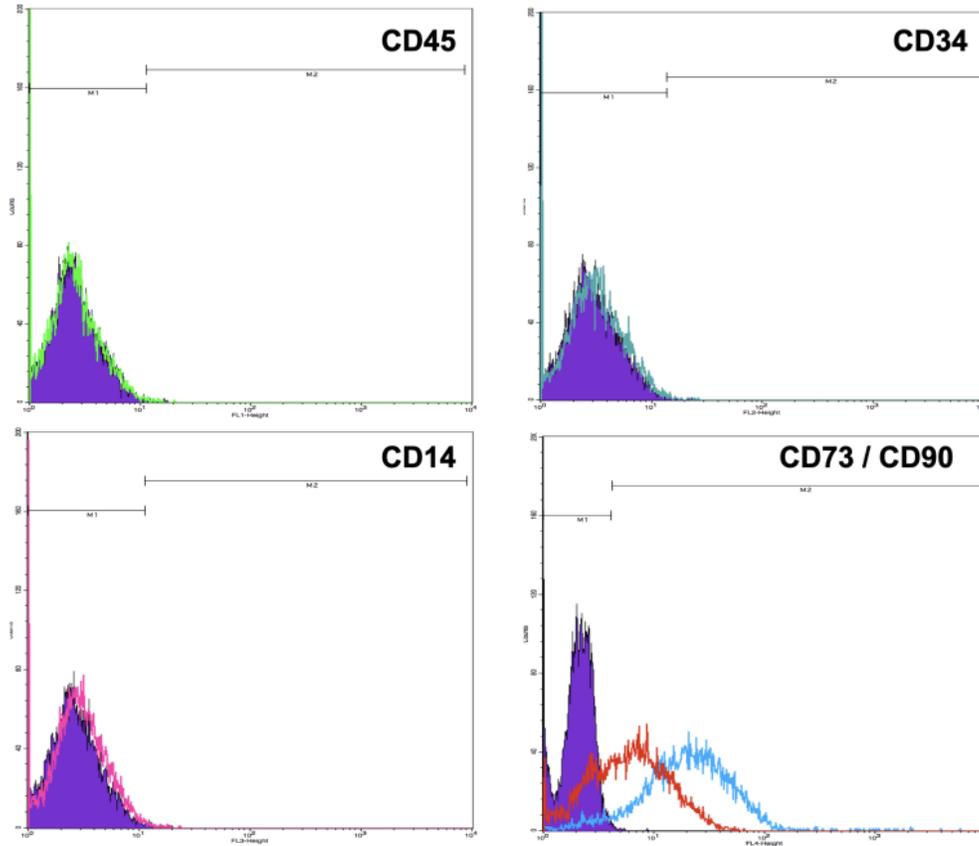
Figura 1: Cultivo primario de células estromales mesenquimales obtenidas a partir de la gelatina de Wharton



a) Se observa la morfología redondeada (flecha blanca) de las CEM y la formación de cúmulos celulares (flecha negra); b) adherencia y obtención de morfología fibroblastoide de CEM (flecha negra); c) confluencia de 80% del monoestrato de CEM con morfología característica.

Caracterización de CEM

Por medio de citometría de flujo se llevó a cabo la identificación de marcadores positivos de superficie de CEM. Se deben de expresar los marcadores CD90, CD73 y CD105, mientras que los marcadores negativos son CD14, CD34, CD45 y MHC-II. En la Figura 2 se muestra la caracterización del fenotipo de las CEM obtenidas a partir de GW. Se muestra la falta de expresión de marcadores CD45, CD34 y CD14; mientras que se evidenció la expresión de los marcadores positivos CD73 y CD90. Por otro lado, las muestras de CEM evaluadas mostraron expresión disminuida del marcador CD105.

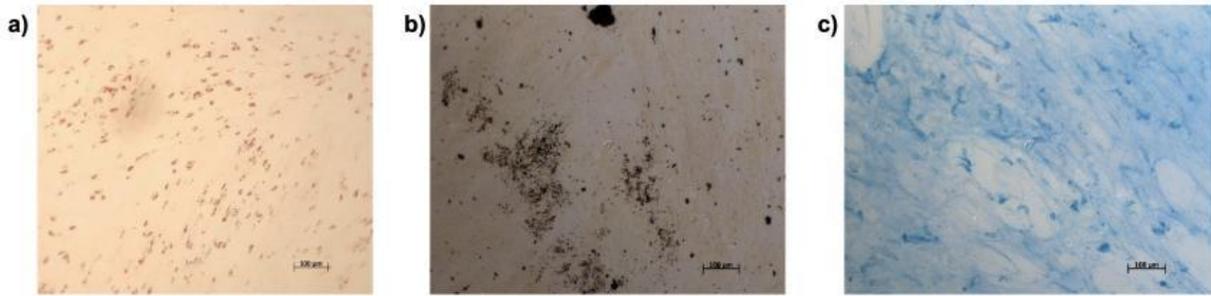
Figura 2: Fenotipo de CEM cultivadas

Análisis de citometría de flujo de expresión de proteínas de cultivo de CEM derivada de GW marcadas con anticuerpos anti CD45 (verde), CD34 (turquesa), CD14 (rosa), CD73 (rojo) y CD90 (azul). El histograma en color morado indica la intensidad de la fluorescencia de las CEM marcadas con el anticuerpo testigo. Los histogramas abiertos indican reactividad positiva con el anticuerpo indicado.

Diferenciación de CEM

Las CEM fueron tratadas con tres formulaciones de medio de cultivo para evaluar su diferenciación a linaje celular adiposo, osteoblástico y condrogénico. La diferenciación se evaluó por medio de tinciones celulares (Figura 3); se muestra imágenes representativas de: a) adipocitos teñidos con rojo Nilo para detectar vacuolas de ácidos grasos dentro de las células; b) osteoblastos teñidos con Von Kossa para identificar depósitos de calcio; c) condrocitos detectados con la tinción azul de Alcian, se visualiza la tinción de mucopolisacáridos en la matriz extracelular de dicho tejido.

Figura 3: Diferenciación de CEM a linaje a) adiposo, b) osteoblástico y c) condrogénico

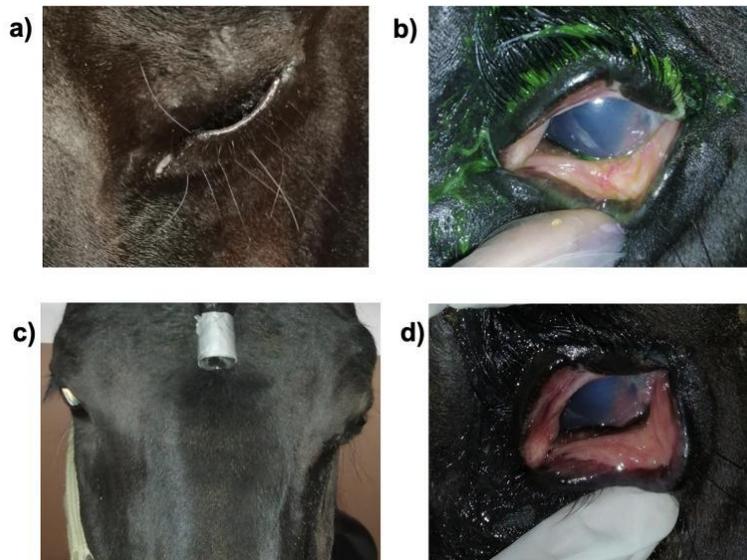


Evaluación de caballos con URE

Caballo 1. Warmblood, retinto macho castrado de 12 años. Presentó signos de uveítis e inició tratamiento con betametasona, ciclosporina A y lágrima artificial. Posteriormente inició el protocolo de tratamiento con CEM y se inyectó únicamente el ojo izquierdo, a lo largo de la semana, no se observaron cambios clínicos.

Caballo 2. Frisón, macho entero de 15 años. Presentó un cuadro agudo de uveítis en el ojo izquierdo, contaba con tratamiento previo de prednisolona y ciclosporina A. Mostró signos como dolor, edema, vascularización, epífora y blefaroespasmus. (Figura 4). Una semana post tratamiento con CEM, clínicamente presentó mejora, todos los signos anteriores disminuyeron ligeramente y mostraba mejor estado anímico.

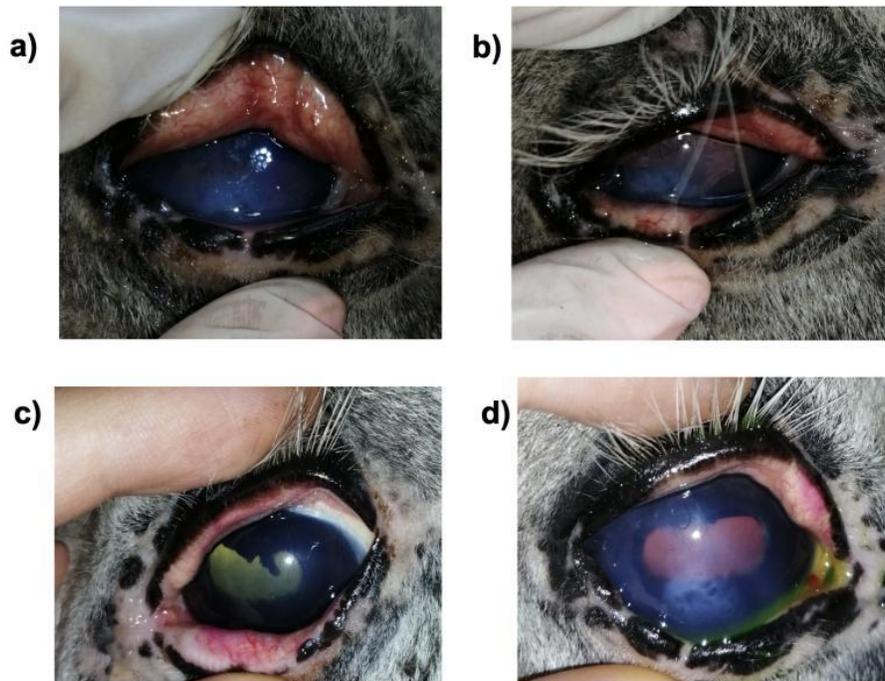
Figura 4: Caballo 2



a) Se muestra el blefaroespasmus y epífora, b) se muestra el edema y vascularización; los márgenes palpebrales se ven verdes debido a la tinción previa con fluoresceína. c) Se muestra disminución en blefaroespasmus del ojo izquierdo d) Se muestra disminución del edema.

Caballo 3. Apaloosa, macho entero, de 21 años. Presentó un cuadro agudo, pero no recibió tratamiento alguno. Ambos ojos presentaban miosis, epífora, edema y neovascularización corneal, inyección escleral y conjuntival, ambos ojos fueron tratados con CEM y se mantuvo por una semana con un midriático tópico. A los siete días 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 observó mucho más cómodo (Figura 5).

Figura 5: Caballo 3



a) y b) se muestra cuadro con signos agudos de uveitis de ambos ojos, observándose edema, neovascularización e hiperemia conjuntival. c) y d) Se muestra disminución del edema e hiperemia.

Evaluación de interleucinas en muestras de lágrima

La comparación entre los medios empleados (PBS y CEM) para el grupo testigo no mostró diferencias en ninguna de las interleucinas medidas. No obstante, al comparar la concentración de éstas en diferente tiempo (basal, 30 min 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 (Cuadro 1).

Debido a que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos medios aplicados al grupo testigo, las mediciones se consideraron dentro de un solo grupo y se contrastaron con los datos obtenidos en el grupo experimental. Al respecto, no se

encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de IL's en cualquiera de los tres tiempos utilizados, al comparar el grupo testigo con el grupo experimental tratado.

Discusión

En el campo de la medicina regenerativa el interés en investigaciones sobre las CEM ha incrementado durante la última década. Estas células, también conocidas como células mesenquimales progenitoras, tienen la capacidad de promover regeneración tisular, modular la respuesta inmunitaria y regular el proceso inflamatorio⁽¹⁸⁾. Asimismo, son consideradas como poblaciones celulares con la habilidad de auto renovarse y diferenciarse en diversos tipos de células de tejido conectivo⁽¹⁹⁾. En consecuencia, tienen el potencial de actuar en sitios de inflamación al sintetizar interleucinas involucradas en la modulación de este proceso⁽²⁰⁾. De manera específica, estudios previos han descrito el efecto inmunomodulador de las CEM en caballos; adicionalmente, se ha demostrado que las CEM derivadas de equinos, en comparación con las de otras especies, poseen mayor capacidad de inhibir la proliferación de linfocitos T activados y disminuir la producción de IFN- γ y TNF α ^(1,3). Así mismo, se ha reportado que el uso de CEM equinas como tratamiento, induce apoptosis de linfocitos y disminuye la expresión del receptor de IL-2 (CD25) en linfocitos T CD4⁺.

Actualmente, en medicina equina son principalmente utilizadas para tratamientos de enfermedades del aparato locomotor, heridas en piel, síndrome metabólico equino, asma, laminitis, problemas neurológicos y oftalmológicos⁽²¹⁾. Dentro de estos últimos, la URE es considerada la principal causa de ceguera en equinos y se describe como una enfermedad inflamatoria autoinmune con características similares a la uveítis humana⁽²²⁾. Los caballos que padecen URE se caracterizan por un fenotipo inflamatorio de linfocitos Th1 (CD4⁺ IFN- γ); por lo tanto, los datos descritos sugieren que el uso de CEM es una alternativa adecuada en el tratamiento de la URE, así como de otras enfermedades inmunomediadas⁽²³⁾. De manera conjunta, se han documentado beneficios terapéuticos a nivel ocular en equinos y otras especies^(24,25,26).

Particularmente, se ha comprobado que la aplicación de CEM en conejos con daño en superficie corneal, acelera el proceso de cicatrización en la córnea, disminuye el estrés oxidativo y suprime la producción de interleucinas proinflamatorias; lo anterior, resulta en disminución en la opacidad de la córnea y neovascularización de la zona afectada⁽²⁷⁾. En ratas, el uso de CEM en el tratamiento de quemaduras corneales y reconstrucción de la superficie corneal ha dado resultados positivos⁽²⁵⁾.

Por otro lado, su uso en equinos como tratamiento de queratitis inmunomediada ha dado resultados promisorios, en donde se observó que 3 de 4 caballos sometidos a esta terapia

tuvieron resultados positivos evidenciados por la disminución en la opacidad, irregularidad y vascularización en la superficie corneal; además de mantener la enfermedad corneal estable hasta por un año después del tratamiento con CEM. Por lo tanto, es considerada como una nueva alternativa de terapia inmunomoduladora para este padecimiento⁽²⁴⁾. De la misma forma, en otro estudio sobre queratitis inmunomediada equina, se reportó una respuesta satisfactoria a la inoculación de CEM en la arteria oftálmica y aplicación tópica subconjuntival tres veces al día por tres semanas⁽²⁸⁾.

En el presente estudio se evaluaron parámetros que indicaran los beneficios en el tratamiento de URE al administrar por vía subpalpebral de CEM. Una vez que se aplicó el tratamiento con CEM derivadas de GW en caballos con URE, se analizaron muestras de lágrimas para evaluar el patrón de interleucinas presentes en dicha muestra antes y después del tratamiento (30 min y 7 días posteriores). Sin embargo, no se mostraron cambios significativos a nivel de concentración de interleucinas en los diferentes tiempos evaluados, en donde se esperaba una disminución de interleucinas proinflamatorias y aumento de interleucinas antiinflamatorias. Ya que se ha descrito que en caballos con URE mantienen una concentración alta de IL-10, IL-1 α , IFN- γ , IL-6 e IL-17 en lágrima⁽²³⁾.

Estos resultados, pueden estar asociados a la vía de administración; en donde la inoculación de CEM por vía subpalpebral muestra una menor eficacia para la resolución del padecimiento, probablemente al llegar de manera desproporcionada al sitio de acción (ojo), y por consiguiente una baja capacidad de afectar el proceso inflamatorio a dicho nivel, dosis inadecuada, frecuencia en la aplicación del tratamiento y etapa de la enfermedad, ya que la mayoría de los reportes indican una mejoría significativa al aplicar el tratamiento en la fase aguda de la enfermedad⁽²³⁾. Por otro lado, la ausencia de detección de IL proinflamatorias en las muestras de lágrima puede deberse a que el pico de concentración se da en periodos de la enfermedad diferentes a los evaluados en este estudio.

Estos hallazgos son útiles al momento de elegir la vía de administración para el tratamiento con CEM. Si bien, se han descrito casos de éxito al utilizar la vía subconjuntival, es necesario llevar a cabo la evaluación y comparación de vías de administración adicionales que puedan proporcionar mejores resultados en términos de eficacia a corto y largo plazo. En contraste, se ha descrito que la administración de CEM por vía intravenosa es completamente segura sin embargo, se desconoce si se obtienen mejores resultados⁽²⁹⁾. Por consiguiente, es necesario realizar más estudios que permitan establecer las condiciones necesarias para el tratamiento de la URE, y así, su resolución.

De manera subsecuente, en los tres pacientes con URE que formaron parte del presente estudio piloto, se evaluó el efecto del tratamiento con CEM administradas por vía subpalpebral. El caballo 1 no se observaron cambios clínicos que indicaran mejoría. En contraste, el caballo 2 mostró mejoría de los signos clínicos presentados (dolor, edema,

vascularización, epífora y blefaroespasma), incluso mejora en el estado de ánimo a los 7 días de la post aplicación del tratamiento. En el caso del caballo 3, hubo mejoría de algunos signos clínicos como menor epífora, disminución del edema e inyección conjuntival y escleral, así como mejoría en su estado de ánimo.

Dos de los tres caballos tratados mostraron mejoría y disminución de los signos clínicos de URE 7 días post tratamiento. El obtener resultados positivos al aplicar CEM de GW de origen equino resalta la importancia de hacer más estudios que permitan establecer un tratamiento uniforme y el desarrollo de un protocolo de aplicación de CEM eficiente que favorezcan la obtención de mejores resultados. Por ejemplo, opciones del tratamiento que promuevan una respuesta longeva y que la eficacia del tratamiento se potencialice al realizar varias o un número específico de aplicaciones con una dosis de CEM estandarizada, así como su coaplicación con terapia inmunosupresiva a nivel local⁽³⁰⁾.

Conclusiones e implicaciones

En este estudio piloto se describe el uso CEM derivadas de GW de forma experimental para el tratamiento de URE; si bien, se presentaron algunas limitaciones como el número de animales analizados que nos permitan llegar a conclusiones firmes, la obtención de resultados positivos en las respectivas presentaciones clínicas sin generar efectos adversos, reafirma el uso de CEM como una alternativa viable al tratamiento de URE. A pesar de obtener resultados prometedores, se requiere hacer estudios controlados del tratamiento con CEM que permitan demostrar y confirmar los beneficios que proporciona para la URE.

Financiamiento

El financiamiento del estudio fue otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación tecnológica (PAPIIT) Proyecto No. IN228919 “Uso de células troncales alógenas para el tratamiento de uveítis recurrente equina” de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-Universidad Nacional Autónoma de México.

Conflictos de interés

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de interés con respecto a la publicación del presente artículo.

Cuadro 1: Medición de interleucinas por técnica mediana y rango (<Nivel de cuantificación)

| | 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 | 28.3 | 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 | 0.781 | 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 |

Se muestra que IL-1 α (*) detectada 7 días pos-tratamiento mostró una disminución significativa en comparación con la medición basal ($P=0.0356$). Los valores son reportados en pg/ml.

Literatura citada:

1. Carrade DD, Lame MW, Kent MS, Clark KC, Walker NJ, Borjesson DL. Comparative analysis of the immunomodulatory properties of equine adult-derived mesenchymal stem cells. *Cell Med* 2012;4(1):1-11. doi: 10.3727/215517912X647217.
2. Martínez-Montiel MDP, Gómez-Gómez GJ, Flores AI. Therapy with stem cells in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2014;20:1211-1227.
3. Carrade Holt DD, Wood JA, Granick JL, Walker NJ, Clark KC, Borjesson DL. Equine mesenchymal stem cells inhibit T cell proliferation through different mechanisms depending on tissue source. *Stem Cells Dev* 2014;23:1258-1265.
4. Le Blanc K, Davies LC. Mesenchymal stromal cells and the innate immune response. *Immunol Lett* 2015;168:140-146.
5. Iacono E, Rossi B, Merlo B. Stem cells from foetal adnexa and fluid in domestic animals: an update on their features and clinical application. *Reprod Dom Anim* 2015; 50:353–64. doi: 10.1111/rda.12499.
6. Weiss ML, Troyer DL. Stem cells in the umbilical cord. *Stem Cell Rev* 2016;2:155–162.
7. Iacono E, Pascucci L, Rossi B, Bazzucchi C, Lanci A, Ceccoli M, *et al.* Ultrastructural characteristics and immune profile of equine MSCs from fetal adnexa. *Reproduction* 2017;154:509–519. doi: 10.1530/REP-17-0032.
8. Gilger BC, Hollingsworth SR. Diseases of the uvea, uveitis, and recurrent uveitis. In: Gilger BC, editor. *Equine ophthalmology*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc. 2016: 369–415. doi: 10.1002/9781119047919.ch8.
9. Gilger BC, Deeg C. Chapter 8-Equine recurrent uveitis. Gilger BC editor. *Equine Ophthalmology*, 2nd ed. Saint Louis, MO: W.B. Saunders; 2011:317-349.
10. Sauvage AC, Monclin SJ, Elansary M, Hansen P, Grauwels MF. Detection of intraocular *Leptospira* spp. by real-time polymerase chain reaction in horses with recurrent uveitis in Belgium. *Equine Vet J* 2019;51:299–303.
11. Deeg CA. Ocular immunology in equine recurrent uveitis. *Vet Ophthalmol* 2008;11(Suppl 1):61-65.
12. Deeg CA, Ehrenhofer M, Thurau SR, Reese S, Wildner G, Kaspers B. Immunopathology of recurrent uveitis in spontaneously diseased horses. *Exp Eye Res* 2002;75:127-133.

13. Gilger BC, Malok E, Cutter KV, Stewart T, Horohov DW, Allen JB. Characterization of T-lymphocytes in the anterior uvea of eyes with chronic equine recurrent uveitis. *Vet Immunol Immunopathol* 1999;71:17-28.
14. Gilger BC, Michau TM. Equine recurrent uveitis: new methods of management. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2004;20:417–27. doi: 10.1016/j.cveq.2004.04.010.
15. Kol A, Walker NJ, Nordstrom M, Borjesson DL. Th17 pathway as a target for multipotent stromal cell therapy in dogs: Implications for translational research. *PLoS One* 2016;11:e0148568.
16. Arzi B, Mills-Ko E, Verstraete FJM, Kol A, Walker NJ, Badgley MR, *et al.* Therapeutic efficacy of fresh, autologous mesenchymal stem cells for severe refractory gingivostomatitis in cats. *Stem Cells Transl Med* 2016;5:75–86.
17. Holt DDC, Wood JA, Granick JL, Walker NJ, Clark KC, Borjesson DL. Equine mesenchymal stem cells inhibit T cell proliferation through different mechanisms depending on tissue source. *Stem Cells Dev* 2014;23:1258–1265.
18. Stewart MC, Stewart AA. Mesenchymal stem cells: characteristics, sources, and mechanisms of action. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2011;27(2):243-61. doi: 10.1016/j.cveq.2011.06.004.
19. Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J Transl Med* 2014;12:260.
20. Meirelles LS, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009;20(5-6):419-27. doi: 10.1016/j.cytogfr.2009.10.002.
21. Cequier A, Sanz C, Rodellar C, Barrachina L. The usefulness of mesenchymal stem cells beyond the musculoskeletal system in horses. *Animals (Basel)*. 2021;11(4):931. doi:10.3390/ani11040931.
22. Malalana F, Stylianides A, McGowan C. Equine recurrent uveitis: Human and equine perspectives. *Vet J* 2015;206(1):222-9. doi: 10.1016/j.tvjl.2015.06.017.
23. Saldinger LK, Nelson SG, Bellone RR, Lassaline M, Mack M, Walker NJ, Borjesson DL. Horses with equine recurrent uveitis have an activated CD4+ T-cell phenotype that can be modulated by mesenchymal stem cells *in vitro*. *Vet Ophthalmol* 2020;23(1):160-170. doi: 10.1111/vop.12704.

24. Davis AB, Schnabel LV, Gilger BC. Subconjunctival bone marrow-derived mesenchymal stem cell therapy as a novel treatment alternative for equine immune-mediated keratitis: A case series. *Vet Ophthalmol* 2019;22(5):674-682. doi: 10.1111/vop.12641.
25. Jiang TS, Cai L, Ji WY, Hui YN, Wang YS, Hu D, Zhu J. Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats. *Mol Vis* 2010;14;16:1304-16.
26. Dodi PL. Immune-mediated keratoconjunctivitis sicca in dogs: current perspectives on management. *Vet Med (Auckl)* 2015;30;6:341-347. doi: 10.2147/VMRR.S66705.
27. Cejkova J, Trosan P, Cejka C, Lencova A, Zajicova A, Javorkova E, Kubinova S, Sykova E, Holan V. Suppression of alkali-induced oxidative injury in the cornea by mesenchymal stem cells growing on nanofiber scaffolds and transferred onto the damaged corneal surface. *Exp Eye Res* 2013;116:312-23. doi: 10.1016/j.exer.2013.10.002.
28. Marfe G, Massaro-Giordano M, Ranalli M, Cozzoli E, Di Stefano C, Malafoglia V, Poletini M, Gambacurta A. Blood derived stem cells: an ameliorative therapy in veterinary ophthalmology. *J Cell Physiol* 2012;227(3):1250-1256. doi: 10.1002/jcp.22953.
29. Kol A, Wood JA, Carrade HDD, Gillette JA, Bohannon-Worsley LK, Puchalski SM, *et al.* 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 Res Ther* 2015;6(1):73. doi: 10.1186/s13287-015-0050-0.
30. Zhang J, Huang X, Wang H, Liu X, Zhang T, Wang Y, Hu D. The challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based therapy. *Stem Cell Res Ther* 2015;6:234. doi: 10.1186/s13287-015-0240-9.