

**UNIVERSITAT  
JAUME I**

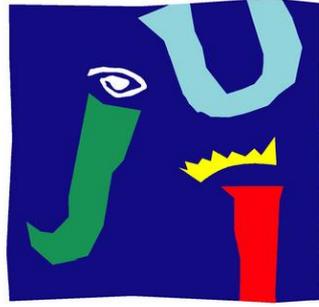
**ESTUDIO DE LA PROTECCIÓN DEL EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA POR EL  
SECRETOMA DE CÉLULAS MADRE UTERINAS EN CONDICIONES DE ESTRÉS OXIDATIVO**

Belén Vega Álvarez

Dra. Noemí Eiró Díaz

Dr. Francisco José Vizoso Piñeiro

Julio 2021



**UNIVERSITAT  
JAUME I**

**Programa de Doctorado en Ciencias de la Enfermería**

**Escuela de Doctorado de la Universitat Jaume I**

**ESTUDIO DE LA PROTECCIÓN DEL EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA POR EL  
SECRETOMA DE CÉLULAS MADRE UTERINAS EN CONDICIONES DE ESTRÉS OXIDATIVO**

**Memoria presentada por Belén Vega Álvarez para optar al grado de doctora por la  
Universitat Jaume I**

Belén Vega Álvarez

Dra. Noemí Eiró Díaz

Dr. Francisco José Vizoso Piñeiro

Castelló de la Plana, julio 2021

**Licencia CC Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada (BY-NC-ND).**



Esta investigación fue financiada en parte por el Instituto de Salud Carlos III (PI20 / 01122) y cofinanciada por la Unión Europea (FEDER / ESF, "Investing in your future") y por la ONCE (Organización Nacional de Ciegos Españoles).

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que, de una forma u otra, han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

A la Dra. Noemí Eiró, por su labor de dirección en este trabajo, pero especialmente por su apoyo incondicional, su paciencia, complicidad, ejemplo como trabajadora incansable, y por llevarme de la mano durante estos años, guiándome y animándome en los momentos difíciles.

Al Dr. Francisco J. Vizoso, por su colaboración en la dirección de este trabajo, por su cercanía, amabilidad y por haber sabido transmitirme su pasión por la investigación desde el día en que lo conocí.

A la Dra. Loreto Maciá, por estar siempre disponible y dispuesta a ayudarme en todas las circunstancias.

Al equipo de la Unidad de Investigación del Hospital de Jove y trabajadores del laboratorio, por su colaboración y trabajo diario incansable.

A mi compañera Paloma Esparza, por compartir esta experiencia vital que nunca olvidaremos y por estar siempre a mi lado, con su empuje, ánimo, paciencia y comprensión en cada circunstancia, hasta el final.

A mis padres, por darme la vida y sus vidas, y por los valores que me han transmitido.

A mi esposo e hijos, por demostrarme su generosidad, dándome aliento para seguir adelante, a pesar del tiempo que dejamos de compartir.

# ÍNDICE

RESUMEN .....	6
ABREVIATURAS.....	8
I. INTRODUCCIÓN .....	11
I.1. EL OJO COMO ÓRGANO VISUAL.....	11
I.1.1 DEFINICIÓN.....	11
I.1.2 ESTRUCTURA ANATÓMICA.....	11
I.2. EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA .....	13
I.2.1. DEFINICIÓN.....	13
I.2.2. FUNCIONES.....	14
I.2.3. ESTRÉS OXIDATIVO Y PATOLOGÍAS DERIVADAS.....	15
I.3. CÉLULAS MADRE.....	17
I.3.1. DEFINICIÓN Y TIPOS DE CÉLULAS MADRE .....	17
I.3.2. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES .....	18
I.3.3. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EN PATOLOGÍAS DE LA RETINA .....	20
I.4. CÉLULAS MADRE DEL CÉRVIX UTERINO HUMANO (hUCESCs).....	21
I.4.1. ANATOMÍA DEL CÉRVIX.....	21
I.4.2. hUCESCs .....	25
I.4.3. POTENCIALIDADES DE LAS hUCESCs Y SU SECRETOMA .....	27
I.4.3.1 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL MC-hUCESCs .....	28
I.4.3.2 EFECTO ANTITUMORAL DEL MC-hUCESCs .....	28
I.4.3.3 POTENCIAL ANTIBACTERIANO DEL MC-hUCESCs.....	28
I.4.3.4 POTENCIAL REGENERATIVO DEL MC-hUCESCs .....	29
I.4.3.4.A MODELO DE RATA.....	29
I.4.3.4.B MODELO DE CONEJO .....	31
I.4.3.5 POTENCIAL ANTIINFLAMATORIO DE LAS hUCESCs .....	33
II.HIPÓTESIS.....	35
III.OBJETIVOS .....	35
IV.MATERIAL Y MÉTODOS .....	36
IV.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS hUCESCs .....	36
IV.1.1. AISLAMIENTO DE LAS hUCESCs.....	36

IV.1.2. CARACTERIZACIÓN DE hUCESCs POR ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	37
IV.2. CULTIVO DE LAS CÉLULAS .....	40
IV.2.1. CULTIVO DE LAS hUCESCs Y CÉLULAS ARPE-19.....	40
IV.2.2. PASE DE LAS hUCESCs .....	41
IV.2.3. PRODUCCIÓN DEL MEDIO CONDICIONADO DE LAS hUCESCs .....	41
IV.3. MODELO DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	41
IV.4. ESTUDIO MOLECULAR MEDIANTE PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL.....	42
IV.4.1. EXTRACCIÓN DE ARN .....	42
IV.4.2. SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO (ADNc).....	43
IV.4.3. PCR A TIEMPO REAL .....	43
IV.5. ENSAYO DE FORMACIÓN DE TUBOS / ENSAYO DE VASCULOGÉNESIS .....	46
IV.6. ANALISIS ESTADÍSTICO .....	47
V.RESULTADOS .....	48
V.1. CARACTERIZACIÓN DE hUCESCs .....	48
V.2. EFECTO DEL MC-hUCESCs SOBRE LA LESIÓN DE LAS ARPE-19 OCASIONADA POR ESTRÉS OXIDATIVO .....	49
V.3. EFECTO DEL MC-hUCESCs SOBRE LA VASCULOGÉNESIS.....	50
V.4. EFECTO DEL MC-hUCESCs SOBRE LA FORMACIÓN DE VASOS SANGUÍNEOS .....	51
VI.DISCUSIÓN .....	53
VII.CONCLUSIONES.....	56
BIBLIOGRAFÍA.....	57

## RESUMEN

Las patologías que afectan al epitelio pigmentario de la retina provocan una importante pérdida de función visual, siendo el estrés oxidativo, una causa de disfuncionalidad del tejido. En la actualidad, las posibilidades terapéuticas para su manejo son escasas. Dentro del avance en el campo de la medicina regenerativa, las células madre mesenquimales, como las del cuello uterino humano (hUCESCs), podrían contribuir al mantenimiento de la homeostasis de la retina. Así, hemos investigado el efecto del medio condicionado de las hUCESCs (MC-hUCESCs) sobre una línea comercial de epitelio pigmentario de la retina (ARPE-19), en condiciones de estrés oxidativo. Por otro lado, estudiamos los efectos *in vitro* del MC-hUCESCs en la formación de tubos en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC). Tras incubar las ARPE-19 con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia o no de MC-hUCESCs, se analizó mediante qPCR, la expresión de factores como HO-1, gen antioxidante, y VEGFA, PDGFA y PDGFB, relacionados con la vasculogénesis. La expresión de ARNm de HO-1, VEGFA, PDGFA y PDGFB aumentó de forma significativa cuando las células ARPE-19 fueron tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de MC-hUCESCs con respecto a las células tratadas únicamente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En cuanto al ensayo de formación de tubos, las HUVEC tratadas con sobrenadante de células ARPE-19 tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + MC-hUCESCs mostraron un aumento significativo en la longitud media de los vasos, el número de uniones capilares y el área media de los vasos, en comparación con las HUVEC tratadas con sobrenadante de células ARPE-19 tratadas solo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los resultados del presente estudio muestran el potencial terapéutico del MC-hUCESCs sobre el epitelio pigmentario de la retina ante el daño ocasionado por el estrés oxidativo, como es la estimulación de un factor antioxidante y una mejoría de la vascularización.

Palabras clave: Células madre mesenquimales; hUCESCs; medio condicionado; secretoma; epitelio pigmentario de la retina; estrés oxidativo; angiogénesis.

## ABSTRACT

The pathologies that affect the retinal pigment epithelium cause a significant loss of visual function, with oxidative stress being a cause of tissue dysfunction. At present, the therapeutic possibilities for its management are scarce. Within the advance in the field of regenerative medicine, mesenchymal stem cells, such as human uterine cervical stem cells (hUCESCs), could contribute to the maintenance of the retinal homeostasis. So, we have investigated the effect of the conditioned medium of hUCESCs (MC-hUCESCs) on a commercial line of retinal pigment epithelium (ARPE-19), under conditions of oxidative stress. On the other hand, we studied the in vitro effects of MC-hUCESCs on the formation of tubes in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). After the ARPE-19 were incubated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence or absence of MC-hUCESCs, the expression of factors such as HO-1, antioxidant gene and VEGFA, PDGFA and PDGFB, related to vasculogenesis, was analyzed by qPCR. The mRNA expression of HO-1, VEGFA, PDGFA and PDGFB increased significantly when ARPE-19 cells were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence of MC-hUCESCs relative to cells treated only with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Regarding the tube formation test, HUVEC treated with supernatant from ARPE-19 cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + MC-hUCESCs showed a significant increase in average vessels length, number of capillary-like junctions and average of vessel, compared with HUVEC treated with supernatant from ARPE-19 cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> only. The results of the present study show the therapeutic potential of MC-hUCESCs on the retinal pigment epithelium in the face of damage caused by oxidative stress, such as the stimulation of an antioxidant factor and an improvement in vascularization.

Key Words: Mesenchymal stem cells; hUCESCs; conditioned medium; secretome; retinal pigment epithelium; oxidative stress; angiogenesis.

## ABREVIATURAS

ANOVA: Analysis of variance

ADN o DNA: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ARN: Ácido ribonucleico

ARNasas: Ribonucleasas

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARPE-19: Línea celular comercial de epitelio pigmentario de la retina de tejido normal

ATCC: American Type Culture Collection

CMM: Células madre mesenquimales

CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono

Cp: Crossing point

Ct: Threshold point

DMAE: Degeneración macular asociada a la edad

DMEM-F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12

dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfato

DXM: Dexametasona

EIU: Endotoxin-induced uveítis

EPR: Epitelio pigmentario de la retina

FBS: Suero fetal bovino

HIF-VEGF: Factor inducible de hipoxia-Factor de crecimiento del endotelio vascular

HLA-DR: Human Leukocyte Antigen-DR isotipo

HO-1: Hemo oxigenasa 1

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno

hUCESCs: Células madre del cérvix uterino humano

HUVEC: Human umbilical vein endothelial cells

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

iPS: Células madre pluripotentes inducidas

ISCT: International Society of Cellular Therapy

LC: Lentes de contacto

LPS: Lipopolisacáridos de Escherichia coli

MC-hUCESCs: Medio condicionado de las células madre del cérvix uterino humano

MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos 1

MIP-1 $\alpha$ : Proteína inflamatoria macrofágica 1 alfa

MSC: Mesenchymal stem cells

NaOH: Hidróxido de sodio

OCE: Orificio cervical externo

OCI: Orificio cervical interno

OMS: Organización mundial de la salud

PBS: Solución salina tamponada con fosfato

PDGFA: Subunidad A del factor de crecimiento derivado de las plaquetas

PDGFB: Subunidad B del factor de crecimiento derivado de las plaquetas

PEDF: Factor derivado del epitelio pigmentario

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SPSS: Producto de estadística y solución de servicio

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa

UFC: Unidades formadoras de colonias

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

VEGFA: Factor de crecimiento endotelial vascular A

VEGFR: Receptor para el factor de crecimiento endotelial vascular

VEGFR2: Receptor para el factor de crecimiento endotelial vascular 2

VPH: Virus del papiloma humano

## I. INTRODUCCIÓN

### I.1. EL OJO COMO ÓRGANO VISUAL

#### I.1.1 DEFINICIÓN

El ojo es el órgano del sentido de la vista, que está altamente especializado en transformar los estímulos luminosos en impulsos nerviosos. Estos impulsos nerviosos se transmiten al cerebro por el nervio óptico y a partir de ellos el cerebro construye una imagen.

#### I.1.2 ESTRUCTURA ANATÓMICA

El ojo es una cápsula esférica de unos 23 mm de diámetro, constituida por varias capas y cámaras. Se encuentra protegido por la cavidad ósea y resguardado por los pómulos y la frente (Figura 1).

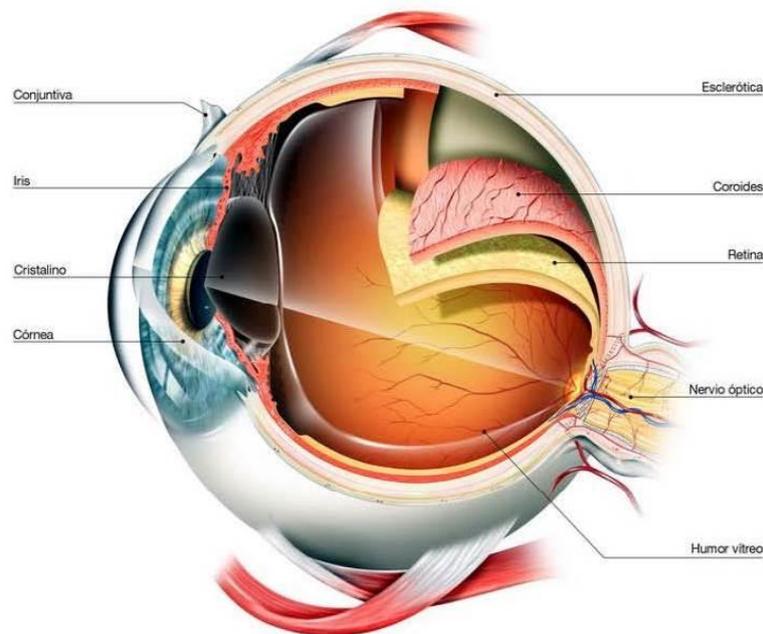


Figura 1: Anatomía del ojo.

**Las capas del ojo son tres:** esclerocórnea, úvea y retina.

La capa más externa del ojo o esclerocórnea es una estructura fibrosa formada por dos porciones esféricas adosadas: córnea (por delante) y esclerótica (por detrás). La esclerótica o esclera es la parte blanca del ojo, mantiene la forma esférica y lo protege. La parte exterior se llama conjuntiva. En la parte delantera tiene una ventana convexa y transparente que se llama córnea, que es la primera capa que atraviesa la luz.

La córnea es transparente y está hidratada y nutrida por la lágrima, por delante, y por el humor acuoso por detrás.

La úvea es la capa intermedia, vascular. Está formada por tres porciones: iris, cuerpo ciliar y coroides.

**El iris** está situado detrás de la córnea y está separado de ella por el humor acuoso. El iris regula la cantidad de luz que entra en el interior del ojo, para lo cual varía su tamaño según la intensidad de la misma. El orificio central por donde pasa la luz es la pupila, cuyo diámetro se modifica gracias a la capacidad del iris de dilatarse y contraerse, para regular la cantidad de luz que entra en el ojo. Si hay luz, se cierra y si hay poca luz, se abre. Detrás del iris, unido a los músculos ciliares, está el cristalino, que es una lente biconvexa, transparente, que varía su curvatura, y por tanto, su potencia dióptrica, para enfocar los objetos a distintas distancias. Esta función involuntaria se llama acomodación. Consiste en que cuando queremos ver de cerca, los músculos ciliares comprimen el cristalino, que se hace más grueso y aumenta su radio de curvatura, reduciendo así la distancia focal. Cuando se quiere ver de lejos, los músculos se relajan y el cristalino se hace más fino. Detrás del cristalino se encuentra la cavidad vítrea, que está rellena de un líquido viscoso llamado humor vítreo.

**El cuerpo ciliar** es el encargado de segregar el líquido que rellena la cámara anterior (humor acuoso). El músculo ciliar se encarga de variar la curvatura del cristalino para poder enfocar a diferentes distancias.

**La coroides** es la sección de úvea situada en la parte posterior. Tiene una función nutritiva y de pantalla que evita que entre luz. Es de color negro. Se trata de una malla de vasos sanguíneos que alimenta a las estructuras internas.

La capa más interna es la retina, donde se forman las imágenes que vemos. Es una membrana transparente formada por células nerviosas altamente especializadas, fotosensibles, encargadas de recibir los estímulos luminosos y transmitirlos al cerebro. Las células responsables de la sensibilidad de la retina son los conos y los bastones. Los conos realizan la discriminación más fina y la visión del color.

Cuando disminuye la luz, dejan de funcionar. Pueden ser de tres tipos, cada uno de ellos sensible a uno de los colores (rojo, azul o verde).

Estas células necesitan mucha luz para poder enviar información sobre el color que les llega, por eso, de noche, sólo se aprecian tonos grises. Los bastones abundan en los bordes externos de la retina y son los responsables de la visión periférica y visión con poca luz o nocturna.

Cuando se alteran, por ejemplo por la retinosis pigmentaria, disminuye la visión nocturna y la visión periférica. La distribución de conos y bastones es irregular.

El punto donde hay una mayor concentración de conos es en unos 25 grados centrales de la retina, donde se encuentra la mácula (responsable de la visión de los colores y la visión cuando hay luz). En su centro hay una pequeña hendidura llamada fovea, que es donde se presenta la mayor agudeza visual. En la zona posterior de la retina hay una parte ciega, la papila, donde las fibras nerviosas forman el nervio óptico, que es una zona sin visión (mancha ciega).

### ***Cámaras del ojo:***

***La cámara anterior*** es la zona comprendida entre la córnea y el iris. Está rellena de humor acuoso.

***La cámara posterior*** es la zona comprendida entre el iris y el cristalino. También está rellena de humor acuoso. Ambas cámaras se comunican a través de la pupila.

***La cámara vítrea*** es la zona entre el cristalino y la retina. Se encuentra rellena de humor vítreo, líquido viscoso que debe ser transparente para cumplir su función (1).

## **I.2. EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA**

### **I.2.1. DEFINICIÓN**

El epitelio pigmentario de la retina (EPR) es una monocapa celular polarizada, con origen embriológico en la placa neural anterior, que posee una gran actividad metabólica imprescindible para el circuito visual. En su porción apical, el EPR se encuentra enfrentado con los segmentos externos de los fotorreceptores, con los que mantiene una estrecha relación por medio de sus microvellosidades.

En su porción basal, limita con la membrana de Bruch, que lo mantiene separado del endotelio de la capa coriocapilar.

Cada célula del EPR se encuentra estrechamente unida a sus células contiguas, formando la barrera hemato-retiniana externa y, a su vez, cada célula se adhiere a la membrana de Bruch. En el citoplasma de las células del EPR, desplazado hacia su polo apical, encontramos como estructuras principales, un núcleo celular desplazado hacia el polo basal y numerosos gránulos de melanina (2).

### I.2.2. FUNCIONES

Entre las funciones principales del EPR, se encuentran el transporte de nutrientes hacia los fotorreceptores, así como de productos metabólicos finales a la sangre. Se encuentra implicado en la absorción de luz y el ciclo del retinol. Por otra parte, se encarga de la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores, y de la secreción de factores de crecimiento esenciales para la integridad estructural de la retina, como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) por su lado basal, y el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) por su lado apical (2,3) (Figura 2).

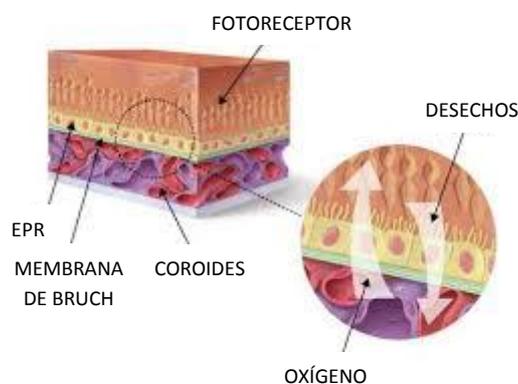


Figura 2: Epitelio Pigmentario de la retina.

A parte de estas funciones, el EPR estabiliza la concentración de iones en el espacio subretiniano, lo cual es crucial para el mantenimiento de la excitabilidad de los fotorreceptores.

El EPR está involucrado también en la función inmune del ojo, a través de la secreción de factores inmunosupresores en el interior de dicha estructura.

Así, resulta claro que el EPR es esencial para la función visual, y que alteraciones en cualquiera de sus funciones pueden conducir a la degeneración de la retina y en la disminución de la agudeza visual, pudiendo inclusive llegar a la ceguera (2,3).

### I.2.3. ESTRÉS OXIDATIVO Y PATOLOGÍAS DERIVADAS

El estrés oxidativo desempeña un importante papel en el desarrollo de varias enfermedades oculares y sistémicas, así como en el proceso de envejecimiento. Puede definirse como un desbalance entre las sustancias oxidantes (radicales libres) y antioxidantes del organismo, a favor de las primeras, que conduce a la producción de daño tisular (4).

Los radicales libres son moléculas que tienen un número impar de electrones y, por lo tanto, son sustancias muy inestables y reactivas con otras moléculas, de las cuales tratan de capturar un electrón para ganar estabilidad (5). Cuando estas moléculas pierden su electrón, se convierten a su vez en radicales libres, produciéndose una cadena de reacciones que pueden ser nocivas para diferentes componentes celulares, y que activan vías de señalización que influyen en numerosos procesos celulares, muchos de ellos ligados al desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad.

El ojo es el único órgano que se encuentra relativamente desprotegido y en constante exposición a la radiación, al oxígeno atmosférico, a los químicos medioambientales y a la abrasión física. Además, es un órgano con una gran actividad metabólica relacionada con la recepción y absorción de luz, por lo que los procesos foto-oxidativos son cruciales en el desarrollo de patología ocular.

Estos factores contribuyen a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y, por tanto, a un aumento del estrés oxidativo.

En relación a esto, se ha demostrado que el estrés oxidativo está implicado en la patogénesis de muchos trastornos oculares, incluyendo patologías corneales (ojo seco, queratocono etc.), cataratas, degeneración macular, retinopatía diabética, uveítis y retinitis pigmentaria entre otros (5).

Los problemas oculares de mayor prevalencia relacionados con el estrés oxidativo son los siguientes:

Patologías de la superficie corneal: La exposición intensa a la luz, la actividad metabólica y la alta tensión de oxígeno hacen que las células corneales sean vulnerables al daño producido por el estrés oxidativo, de modo que el aumento de ROS juega un importante papel en la propagación del daño celular, que resulta en desórdenes de la superficie anterior del ojo, como son el ojo seco, la conjuntivocalasia,

el daño del epitelio ocular inducido por tabaco o el daño inducido por radiación ultravioleta (6). Además, el estrés oxidativo está implicado en la patogénesis de enfermedades de la superficie corneal relacionadas con procesos inflamatorios, metabólicos, degenerativos o de causas iatrogénicas (7).

**Cataratas:** La opacificación del cristalino se considera la principal causa de ceguera en el mundo, representando casi la mitad de los casos de ceguera según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (8). El cristalino, debido a su elevada actividad metabólica y capacidad de filtración de la luz, es quizás uno de los tejidos con mayor estrés oxidativo en el cuerpo. Las proteínas del cristalino presentan grupos tioles que son rápidamente oxidados a puentes disulfuro (9), que se unen a las proteínas formando un aglomerado que produce opacidad, favoreciendo con ello la formación de la catarata.

Esta oxidación del cristalino está mediada por procesos relacionados con la exposición a la luz ultravioleta, la peroxidación lipídica y la carencia de antioxidantes obtenidos en la dieta.

**Glaucoma:** En los últimos años han aumentado las evidencias que sugieren que las especies reactivas de oxígeno juegan un papel clave en la patogénesis del glaucoma de ángulo abierto (10). Así, se ha observado un incremento significativo en el daño oxidativo producido en el ADN de la malla trabecular de pacientes glaucomatosos en comparación con pacientes controles. Este daño no solamente se ha encontrado a nivel de la malla trabecular, sino también alrededor de la cabeza del nervio óptico, y se ha observado cómo modifica la composición del humor vítreo y humor acuoso pudiendo producir la alteración en la malla trabecular (11).

**Degeneración macular asociada a la edad (DMAE):** La DMAE es la principal causa de ceguera en los países desarrollados según la OMS (12). La etiología de esta enfermedad es multifactorial, y entre los factores de riesgo se encuentran la edad (>60 años), la predisposición genética, el tabaco, la baja concentración de agentes antioxidantes en plasma, la hipertensión y la hipercolesterolemia (13). Estos factores producen una atrofia progresiva del epitelio pigmentario afectando a la nutrición macular como consecuencia de la alteración del sistema antioxidante interno de la retina, lo cual conduce a la muerte de los fotorreceptores y causa una ceguera progresiva.

En las enfermedades de la retina, el estrés oxidativo es responsable de la aparición de varios procesos biológicos simultáneos, como la vascularización anormal, que puede provocar ceguera por la destrucción de la estructura de la retina. Esto ocurre especialmente en la DMAE y en la retinopatía diabética, pero también en la oclusión de la vena retiniana y la uveítis. Las células de la retina tienen mecanismos de defensa para contrarrestar tanto la formación de ROS como su impacto cuando la capacidad

antioxidante es insuficiente. En circunstancias extremas, el estrés oxidativo conduce a la apoptosis a través de la inhibición de la transición de la cadena respiratoria mitocondrial y el aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial.

La enzima hemo-oxigenasa 1 (HO-1) juega un papel muy importante en la modulación de procesos inflamatorios, habiendo sido demostrado en diferentes modelos experimentales tanto en animales como humanos, en los mecanismos de defensa antioxidantes que posee el organismo ante la presencia de algún daño, y en el bloqueo de los procesos apoptóticos donde han sido involucradas distintas rutas de señalización celular (14).

Así, previene del daño oxidativo a las células endoteliales y reduce la migración leucocitaria a través de la inhibición de la síntesis y liberación de mediadores inflamatorios, dentro de los que se incluyen los radicales libres (15).

Además, el estrés oxidativo afecta a la vascularización de la retina a través de dos mecanismos principales, directamente en la vía de señalización HIF-VEGF/VEGFR2 (Factor inducible de hipoxia-Factor de crecimiento del endotelio vascular/Receptor para el factor de crecimiento endotelial vascular 2) o mediante un mecanismo independiente de VEGF. Considerado un regulador clave para la angiogénesis, el VEGF y su vía, se utilizan como objetivos primarios para la terapia antiangiogénica.

Sin embargo, el uso de anticuerpos anti-VEGF o inhibidores de VEGFR ha fracasado debido a su asociación con eventos adversos sistémicos y complicaciones oculares importantes. Además, la inhibición de la vía de VEGF puede alterar la homeostasis de la vascularización.

Por lo tanto, se requiere un enfoque más equilibrado, evitando la inhibición de la angiogénesis y regulando una angiogénesis no aberrante.

### **I.3. CÉLULAS MADRE**

#### **I.3.1. DEFINICIÓN Y TIPOS DE CÉLULAS MADRE**

Una célula madre es un tipo especial de célula capaz de dividirse indefinidamente y diferenciarse a distintos tipos de células especializadas con funciones específicas (16).

Según su potencial de diferenciación se pueden clasificar en:

- Células totipotenciales: son células embrionarias que conforman el blastómero hasta su fase de mórula (8 a 16 células), al tercero y cuarto día después de la

fecundación. En esta fase pueden generar cualquier tipo de célula y nuevos organismos.

- Células pluripotenciales: son las células embrionarias que se encuentran en la masa celular interna del blastocisto (60 a 100 células), hasta el día 14 después de la fecundación. En esta fase pueden generar cualquier tipo de célula, pero han perdido la capacidad de producir nuevos organismos.
- Células multipotenciales, son células troncales del organismo adulto que, en ciertas circunstancias y condiciones, pueden generar algunos tipos celulares (17).

Según su origen, las células madre se clasifican en embrionarias y somáticas o adultas.

- Las células madre embrionarias proceden de un grupo de células, denominado masa celular interna, en un estadio temprano del embrión (fase de blastocisto) y su principal característica es su propiedad de pluripotencialidad (18).
- Las células madre somáticas o adultas son células no diferenciadas que se encuentran en un tejido y cuyo potencial de especialización está limitado exclusivamente a uno o varios linajes celulares (19).

Las células madre adultas se han identificado en la mayoría de los tejidos, distinguiendo entre células madre hematopoyéticas, que proceden de la sangre o de la médula ósea, dando origen a todas las células sanguíneas, y células madre mesenquimales. Las células madre utilizadas actualmente en terapia celular son las células madre adultas, siendo una de las más ampliamente utilizadas las células madre mesenquimales (19).

### I.3.2. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Las células madre mesenquimales (CMM), también conocidas como células madre estromales o MSC (del inglés Mesenchymal Stem Cells o Mesenchymal Stromal Cells), son células con morfología fibroblastoide, originadas a partir de la capa germinal mesodermal, con la capacidad de diferenciarse en diversos tipos de células (20).

Para ser consideradas células madre mesenquimales han de cumplir unas características mínimas establecidas en el Congreso de la International Society of Cellular Therapy (ISCT) en el año 2006, que son las siguientes:

Las CMM deben tener capacidad de adherencia al plástico en cultivo, expresar los antígenos de superficie CD73, CD90 y CD105 en ausencia de otros antígenos hematopoyéticos del tipo CD34, CD45 y marcadores típicos de linfocitos B, monocitos y macrófagos, ser multipotentes y presentar una alta plasticidad para diferenciarse in vitro bajo condiciones estándar de cultivo a osteoblastos, adipocitos y condrocitos (20, 21).

Otras de las características, además de las propuestas por la ISCT, que pueden ayudar hoy en día a definir y clasificar una célula como CMM, es que tengan origen mesodérmico, compartan características de fibroblastos, sean capaces de autorrenovarse, para lo cual durante la división celular solo una de las dos células resultantes comenzará programas de diferenciación celular, presenten una inmunogenicidad relativamente baja y tengan capacidad de diferenciarse bajo determinadas condiciones hacia células de diferentes linajes (plasticidad clonogénica) (22, 23).

Las CMM se pueden obtener de aspirados de médula ósea, tejido adiposo, sangre del cordón umbilical, pulpa dental, músculo liso, esquelético y cardíaco, hígado, bazo, testículos, sangre menstrual, páncreas, periostio, membrana sinovial, dermis, hueso trabecular, pulmón, placenta, sangre periférica, ligamento periodontal y líquido amniótico (24-28). De todas ellas, las más relevantes son la médula ósea, el tejido adiposo y la sangre del cordón umbilical (Figura 3) (29).

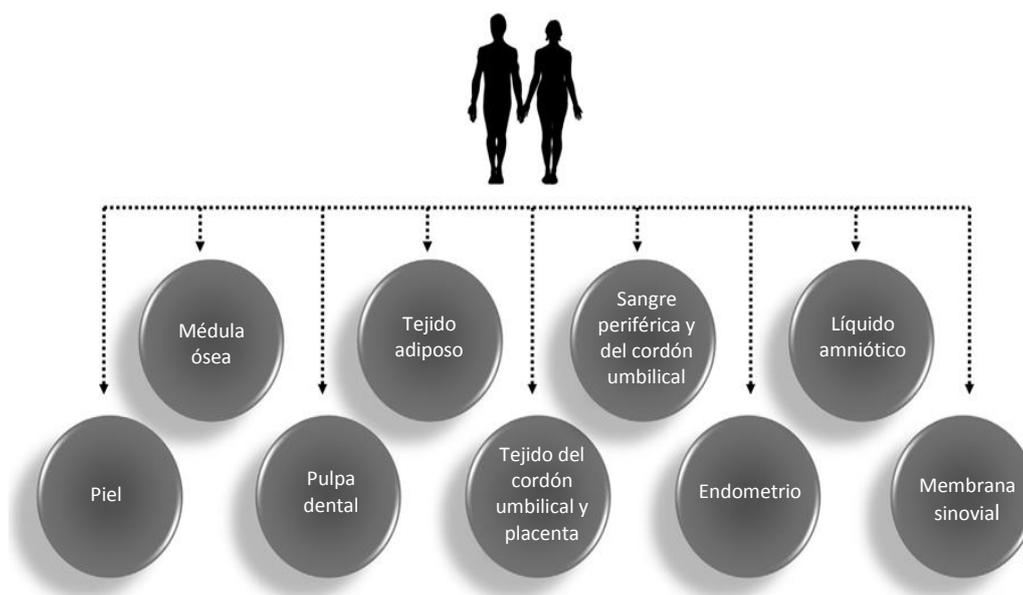


Figura 3: Principales fuentes de obtención de células madre mesenquimales humanas (19).

A pesar de presentar menor potencial proliferativo y menor plasticidad en comparación con las células madre embrionarias, las CMM son más fáciles de obtener, no crean problemas éticos para su manipulación (30) y presentan una alta capacidad de expansión “in vitro”, además de un bajo potencial para la formación de teratomas (31, 32).

Respecto al potencial terapéutico de las CMM, cabe señalar, que los resultados obtenidos a partir de los estudios preclínicos y clínicos llevados a cabo en las últimas décadas, demuestran que poseen una elevada capacidad inmunomoduladora, regenerativa y de cicatrización, además de actuar en las zonas dañadas como soporte trófico de las células lesionadas. Las CMM regulan la secreción paracrina de factores de crecimiento, citocinas y mediadores angiogénicos.

Se ha demostrado que los medios condicionados originados a partir de cultivos con células madre mesenquimales tienen un efecto reparador similar al de la implantación de las propias células, pudiendo llegar a ejercer su efecto paracrino, inmunomodulador, antiapoptótico, angiogénico, cicatrizante y quimioatrayente directamente en el tejido dañado sin necesidad de inyectar las CMM (33).

### I.3.3. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EN PATOLOGÍAS DE LA RETINA

Actualmente existe un gran número de pacientes afectados por patologías retinianas, tanto de forma adquirida en edades por encima de los 50 años generalmente, como de manera congénita en niños y jóvenes, que causan un gran impacto sobre su calidad de vida. Los tratamientos disponibles para estas enfermedades, en algunos casos no son efectivos, o no llegan a producir una completa recuperación. Esto ocurre en algunas patologías tales como la DMAE (34, 35).

Ante las escasas posibilidades terapéuticas o su baja tasa de éxito en determinadas enfermedades retinianas, surge la necesidad de investigar otras vías de tratamiento, como la terapia celular con células madre. Sin embargo, la anatomía y fisiología de la retina es compleja, ya que se encuentra formada por numerosas capas que mantienen una interrelación estrecha para lograr su completo funcionamiento; por ello, las primeras investigaciones basadas en células madre se han dirigido hacia la sustitución o reparación de una única capa celular. De esta forma, las primeras patologías susceptibles de ser tratadas podrían ser aquellas cuyo daño principal se encuentra localizado en una sola capa retiniana, como las enfermedades del EPR (36).

Entre los mecanismos fisiopatológicos que afectan a las diferentes capas retinianas se encuentran alteraciones metabólicas, mecanismos de inflamación, angiogénesis, alteración de la permeabilidad vascular etc. y que ocurren en patologías como la retinopatía diabética, oclusiones vasculares retinianas, neuroretinitis o DMAE.

Dentro de la investigación en las terapias con células madre, se encuentran en marcha ensayos clínicos en humanos para el tratamiento de la enfermedad de Stargard mediante células madre embrionarias, o para la DMAE mediante células iPS (células

madre pluripotentes inducidas), en base a estudios preclínicos donde se demostraron los efectos de estas células sobre la capacidad regenerativa del EPR.

También existen diversos estudios sobre las células madre mesenquimales procedentes de médula ósea alogénica, que se administran mediante inyección subretiniana en ratones y ratas.

En ratones, se evidenció una restauración parcial de la morfología del EPR y los fotorreceptores. En ratas, se logró revertir el proceso de deterioro de los parámetros visuales básicos (37).

Otro estudio reveló que una sola inyección intravenosa de CMM derivadas de la médula ósea en las primeras etapas de la degeneración, puede preservar los fotorreceptores, mantener la función visual y limitar los cambios vasculares patológicos en un modelo de roedor con degeneración retiniana.

Estos resultados subrayan la posible aplicación de las CMM en el tratamiento de la degeneración de la retina. Las ventajas de esta terapia no invasiva basada en la utilización de CMM son que las células se aíslan fácilmente y se pueden expandir en grandes cantidades, la naturaleza hipoinmunogénica como donantes alogénicos y de naturaleza menos controvertida que otras células madre. Por lo tanto, las CMM pueden resultar la fuente celular ideal para la terapia de degeneración de la retina y otras enfermedades vasculares oculares (38).

Así mismo, cabe destacar, que en los últimos tiempos se ha iniciado la exploración de los efectos y el manejo de los secretomas obtenidos a partir de células madre de distinto tipo. En este sentido, cada vez se están estudiando más las potencialidades terapéuticas de las células madre mesenquimales adultas, así como de productos derivados de ellas para numerosas patologías (39).

## **I.4. CÉLULAS MADRE DEL CÉRVIX UTERINO HUMANO (hUCESCs)**

### **I.4.1. ANATOMÍA DEL CÉRVIX**

El útero es un órgano intrapélvico cuya misión más importante es la de albergar el huevo fecundado durante la gestación. Se compone de dos porciones anatómica y funcionalmente distintas, el cuerpo y el cuello, separadas por una zona, el istmo, que fuera del periodo de embarazo tiene escasa importancia.

El cuello uterino o cérvix tiene forma cilíndrica. Su longitud varía entre los 2.5 y 3 cm. En su extremidad superior se continúa con el istmo y su extremidad inferior termina haciendo protrusión en la porción superior de la vagina.

Al igual que el cuerpo del útero, está tunelizado en el centro. Esta cavidad (canal endocervical) tiene forma cilíndrica y comunica la cavidad corporal con la vagina. La extremidad superior de la cavidad cervical, zona de unión con el istmo, se denomina orificio cervical interno (OCI) y la extremidad inferior orificio cervical externo (OCE) (Figura 4) (40).

Desde el punto de vista histológico el cuello uterino está constituido fundamentalmente por tejido conectivo fibroso y contiene células musculares lisas en una proporción muy inferior al cuerpo uterino (40). Se encuentra tapizado por dos tipos de epitelios totalmente distintos. La zona en contacto con la vagina, ectocérvix u OCE, está revestida por un epitelio especialmente resistente a las potenciales agresiones de un medio vaginal hostil, como son el pH ácido, la presencia de bacterias y levaduras que conviven en un equilibrio biológico fácilmente alterable, y patógenos que pueden ingresar desde el exterior. Se trata de un epitelio escamoso estratificado.

La cavidad endocervical o endocérvix, que en principio no tiene que enfrentar desafíos como el ectocérvix por estar oculto del medio externo, se encuentra revestido por una única capa de células mucho más frágiles, epitelio cilíndrico glandular altamente especializado en la producción de moco que, por un lado, actúa como tapón durante los días infértiles de la mujer o como protección si se ha producido fertilización y, por otro, como promotor del paso hacia las trompas de Falopio de espermatozoides durante los días fértiles del período femenino (41).

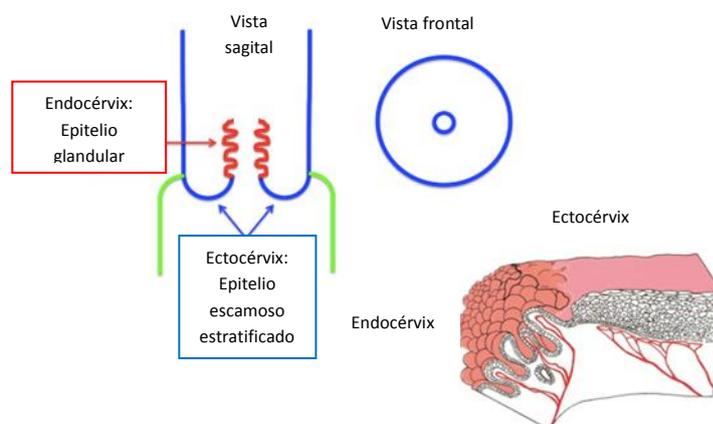


Figura 4: Anatomía del cuello uterino y la vagina humanos (41).

El límite entre el epitelio escamoso y el cilíndrico tiene lugar en la zona de transformación, que es la línea de encuentro de ambos epitelios. Sin embargo, en distintas situaciones, algunas de ellas completamente fisiológicas, como pueden ser la edad o los efectos sobre el cérvix uterino del aumento de la producción de estrógenos durante la gestación, el epitelio endocervical sobresale hacia el exterior (Figura 5). Dado que no está preparado para soportar los desafíos del ambiente vaginal hostil, es activamente transformado en epitelio escamoso estratificado mediante un proceso conocido como metaplasia escamosa (Figura 6) (41).

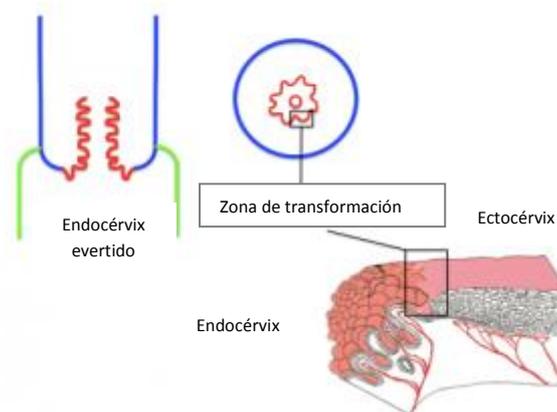


Figura 5: Epitelio endocervical evertido que sobresale en la cavidad vaginal. Existe el desarrollo de una zona de transformación, donde el epitelio glandular monocapa vulnerable se convierte en el epitelio escamoso multicapa resistente (41).

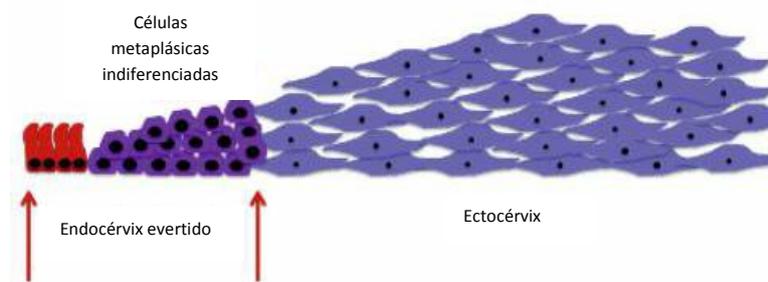


Figura 6: Conversión del epitelio endocervical vulnerable en epitelio escamoso resistente mediante metaplasia escamosa (41).

La metaplasia es el proceso por el cual un tipo de célula es convertido en otro, debido a que, como en el caso de la zona de transformación uterina, la primera es más vulnerable, en un entorno particularmente hostil, que la última.

Esa es la razón por la cual la metaplasia escamosa es bastante habitual en otras localizaciones, tales como la vejiga o distintas zonas del aparato digestivo.

Sin embargo, la metaplasia escamosa no es un proceso inmediato sino que está compuesto por una sucesión de acontecimientos, algunos de los cuales pueden presentar importantes riesgos biológicos, ya que para que la célula original sea capaz de convertirse en otra completamente diferente, primero debe sufrir un alto grado de desdiferenciación. Posteriormente, de la célula indiferenciada emerge la nueva.

En un momento dado, por lo tanto, tres tipos distintos de células conviven dentro de la zona de transformación: las originales diferenciadas, células epiteliales glandulares y escamosas, por un lado, y las metaplásicas indiferenciadas por el otro (Figura 7) (41).

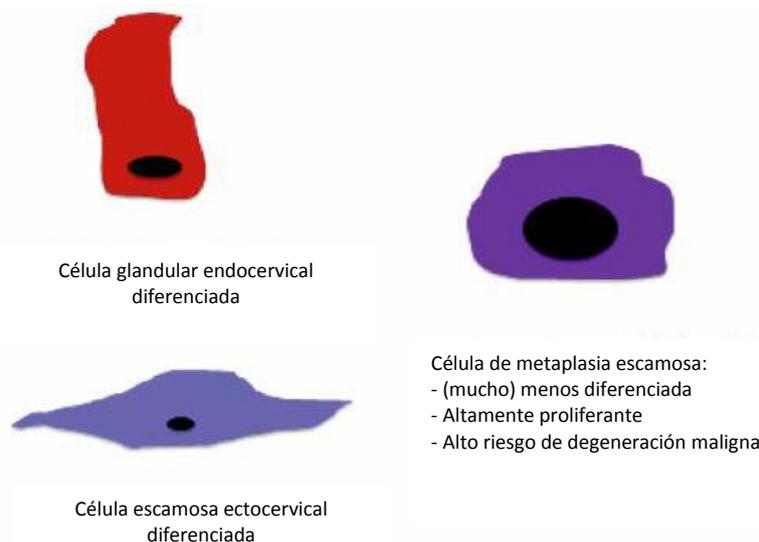


Figura 7: Presencia de tres tipos principales de células en la zona de transformación (41).

En este punto, si la célula endocervical glandular es vulnerable a las agresiones externas del ambiente vaginal, la célula metaplásica indiferenciada es igualmente vulnerable a la transformación oncogénica, tanto intrínsecamente, como también a través de la influencia externa. Por un lado, porque es altamente proliferativa, siendo la alta proliferación el primer paso en la transformación oncogénica ya que requiere, entre otras cosas, de una replicación mucho más frecuente del ADN. La replicación del ADN, además, es en sí misma arriesgada porque tanto los errores como las mutaciones espontáneas ocurren a un ritmo constante durante todo el proceso y, por otro lado, porque el ADN es más propenso a la integración de virus. En este caso particular la mayor amenaza la representa el virus del VPH.

Para que el proceso de metaplasia se complete y que el tejido vulnerable sea cubierto lo más rápidamente posible por el nuevo epitelio más resistente, es necesaria la existencia de un mecanismo protector contra todos los agresores potenciales que dañan al epitelio original, como son el pH bajo, con el consiguiente efecto de reacción inflamatoria, la presencia de bacterias, levaduras, etc. y más importante aún, de un mecanismo de protección que permita que las células se conviertan en indiferenciadas y luego proliferar por encima de los niveles normales sin llegar a niveles críticos para no sobrepasar las líneas rojas que conducen a la transformación oncogénica (41).

#### I.4.2. hUCESCs

El útero es un órgano que se presenta como una potencial fuente de CMM, considerando que fisiológicamente sufre los cambios de proliferación y remodelación más extensos conocidos en mamíferos adultos, y teniendo en cuenta, además, que debido a su localización anatómica es posible obtenerlas de una forma mínimamente invasiva y sin anestesia, en comparación, por ejemplo, con las CMM de la médula ósea o tejido adiposo (42).

Así mismo, numerosos estudios se han orientado a estudiar las CMM derivadas de los tejidos fetales y neonatales, como las membranas amnióticas humanas (43), líquido amniótico (44), cordón umbilical (45) o sangre de cordón (46). Curiosamente se ha observado que estas células, dependiendo de su fuente de origen, se pueden diferenciar *in vitro* en osteocitos, condrocitos, adipocitos y otros tipos de células como hepatocitos, células musculares o nerviosas (42).

Siguiendo esta línea y la localización uterina, existen datos que indican la presencia de poblaciones de células que presentan cualidades de células madre y que se ubican en el cuello uterino.

Especialmente parecen concentrarse en la zona distal del canal endocervical, concretamente en la zona de transformación. Estas células no proliferan durante la reepitelización endometrial, lo que sugiere que no contribuyen a la regeneración cíclica del endometrio y, por lo tanto, pertenecen a un compartimento de células madre completamente diferente (42).

El Equipo de Investigación del Hospital de Jove, dirigido por el Dr. Vizoso, ha aislado y caracterizado una nueva población de CMM del adulto procedentes del cérvix uterino, denominadas hUCESCs, del término en inglés “human Uterine Cervical Stem Cells”. Estas células presentan la ventaja de que pueden ser obtenidas utilizando un procedimiento mínimamente invasivo y doloroso a partir de frotis cervicales de rutina, Papanicolau, realizados en mujeres no menstruantes en edad fértil.

La caracterización de las hUCESCs realizada mediante inmunocitoquímica mostró que expresan vimentina y  $\beta$ -catenina y, en menor medida, citoqueratina (clon AE1/AE3), mientras que no expresan actina HHF35, actina de músculo liso, desmina ni E-cadherina. Además, muestran una intensa expresión de tres factores de transcripción característicos de las células madre embrionarias: KLF4, OCT4 y Sox2 (47).

A través de la citometría de flujo, se determinó el fenotipo de las hUCESCs, siendo positivas para CD29, CD44, CD73, CD90 y CD105, y negativas para CD34, CD45, CD133 (marcadores hematopoyéticos), CD31 (marcador endotelial), CD117, TRA-1-81 (marcador de superficie de células madre embrionarias) y HLA-DR. Este fenotipo se observó en diferentes pasajes (47).

Las hUCESCs muestran un elevado índice de duplicación, llegando a ser de 1,76 cada 24 horas (47).

Así mismo, presentan capacidad de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica, que fue evaluada agregando medios de cultivo específicos. La diferenciación adipogénica fue demostrada por tinción Oil Red. La diferenciación osteogénica fue evaluada por tinción con Alizarin Red S y, como marcador de diferenciación condrogénica, se utilizó la tinción con Alcian Blue (47).

El potencial terapéutico de las células madre puede atribuirse a tres mecanismos clave de acción. El primero es el "recorrido", mediante el cual las células madre administradas, migran al foco de la lesión aguda debido a gradientes químicos (48, 49). El segundo mecanismo es la diferenciación en múltiples tipos de células que se injertan localmente e inducen la restauración de la función, regenerando o reemplazando tejidos dañados (50,51). El tercer mecanismo es la secreción de factores bioactivos, que pueden afectar potencialmente a los procesos fisiológicos locales y sistémicos (39).

El último mecanismo sugiere, por tanto, que los efectos beneficiosos del trasplante de las CMM no son el resultado de la capacidad en sí misma de transformación en otros tipos celulares, sino que, más bien, se relacionan con su capacidad para secretar factores bioactivos que proporcionan un microambiente favorable a los tejidos lesionados, limitando así el área de daño y promoviendo la respuesta regenerativa (52). Estos factores bioactivos secretados por las CMM se pueden obtener al cultivar las mismas en el laboratorio, y se denominan genéricamente, en su conjunto, como "secretoma" o "medio condicionado".

El secretoma o medio condicionado se define como el conjunto de factores o moléculas que son secretadas por las células madre al espacio extracelular. Dentro de este producto biológico se incluyen, entre otros, factores moleculares solubles, como citoquinas y factores de crecimiento, ácidos nucleicos libres, lípidos y vesículas extracelulares (53,54).

Las hUCESCs cultivadas durante 48 horas en un medio de cultivo sin suplementación producen un medio condicionado o secretoma (MC-hUCESCs). El MC-hUCESCs, así mismo, puede ser liofilizado y almacenado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización posterior. El equipo de Investigación del Hospital de Jove ha descrito que el MC-hUCESCs presenta potentes propiedades antitumorales (55, 56), antiinflamatorias, antibióticas y mejoría de la reepitelización (57).

#### I.4.3. POTENCIALIDADES DE LAS hUCESCs Y SU SECRETOMA

Las CMM son centro de interés por sus beneficios terapéuticos. Muchos estudios demuestran sus mecanismos de acción en procesos patológicos clave asociados con funciones fisiológicas básicas, como la diferenciación y proliferación celular, la angiogénesis, la inflamación y el estrés oxidativo (52). En base a investigaciones pasadas, los efectos de las terapias con células madre mesenquimales se atribuyen a su capacidad para injertarse localmente y diferenciarse en múltiples tipos de tejidos. Sin embargo, estudios recientes han revelado que a menudo menos del 1% de las CMM trasplantadas se mantienen a largo plazo en el tejido lesionado (58), y que los beneficios de la terapia con CMM podrían deberse a la acción de la gran variedad de factores bioactivos que estas producen (52). Los factores bioactivos, secretomas o medios condicionados, pueden presentar ventajas considerables sobre las células vivas en cuanto a su obtención, almacenamiento, manipulación, vida útil del producto y su potencial como agente terapéutico biológico listo para usar.

La composición y los efectos de los secretomas difieren según el origen anatómico de las CMM. El uso de hUCESCs, presenta importantes ventajas dado su fácil aislamiento y alta tasa de proliferación, lo cual permite obtener rápidamente grandes cantidades de hUCESCs o productos derivados, como el secretoma, para investigación y uso clínico (39).

En los últimos años, el grupo de investigación del Hospital de Jove, ha profundizado a través de sus estudios en las potencialidades del MC-hUCESCs, mostrando datos “in vitro” e “in vivo” que evidencian un efecto antitumoral en el cáncer de mama, antiinflamatorio y regenerativo en modelos de experimentación animal de uveítis y de ojo seco, respectivamente, así como un efecto inmunorregulador, antimicrobiano y antifúngico, lo que las hace buenas candidatas para futuros tratamientos en el contexto de la medicina regenerativa (47).

#### I.4.3.1 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL MC-hUCESCs

La candidiasis es una causa importante de morbilidad y mortalidad humanas. Gracias a la investigación desarrollada por distintos grupos de investigación junto con el del Hospital de Jove, ha sido posible probar las propiedades del MC-hUCESCs para inhibir el crecimiento de distintas especies de *Candida*, mostrándose más eficaz contra las cepas más prevalentes en la vagina. Dado que la candidiasis sistémica es una patología potencialmente mortal y que la candidiasis vaginal recurrente afecta enormemente a la calidad de vida de la mujer, estos hallazgos podrían dar como resultado un nuevo abordaje terapéutico eficaz (59).

#### I.4.3.2 EFECTO ANTITUMORAL DEL MC-hUCESCs

Las hUCESCs tienen potentes efectos antitumorales, que son más pronunciados en tumores altamente proliferantes (55).

El grupo de investigación del Hospital de Jove, en colaboración con otros investigadores, han logrado demostrar que el MC-hUCESCs contiene altos niveles de factores implicados en la inhibición de la proliferación tumoral, de forma que, administrándolo a una línea celular de cáncer de mama altamente invasivo, se redujo la proliferación celular, además de inducir apoptosis y disminuir la invasión (55). Así mismo, en un modelo de xenoinjerto de tumor en ratón con inmunodeficiencia combinada, el tratamiento con MC-hUCESCs redujo de forma significativa el crecimiento tumoral y se demostró una mayor supervivencia global (41, 55).

#### I.4.3.3 POTENCIAL ANTIBACTERIANO DEL MC-hUCESCs

Distintos grupos investigadores han estudiado el efecto bactericida del MC-hUCESCs “in vitro” y en lentes de contacto infectadas con *Escherichia coli* y *Staphylococcus Epidermidis*. Así, se mostró que el MC-hUCESCs redujo significativamente el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en comparación con los controles ( $p < 0.0001$  e. coli,  $p < 0.05$  S. Epidermidis) (57).

Así, los resultados parecen indicar que el MC-hUCESCs tiene un efecto bactericida en ambas cepas.

Para explorar el efecto bactericida del MC-hUCESCs en lentes de contacto (LC), se infectaron dos tipos de LC comerciales con *Staphylococcus Epidermidis*. Las tratadas con MC-hUCESCs tuvieron significativamente ( $p < 0.01$ ) UFC más bajas en comparación con las tratadas con medio Luria-Bertani, control. El efecto bactericida del MC-hUCESCs concentrado (2X), fue mayor ( $p < 0.01$ ) que el del MC-hUCESCs no concentrado.

Dados los resultados obtenidos, el MC-hUCESCs podría ser utilizado como solución para lentes de contacto, y así prevenir la aparición de infecciones y daño corneal derivado de su uso diario.

#### I.4.3.4 POTENCIAL REGENERATIVO DEL MC-hUCESCs

El síndrome del ojo seco es una de las enfermedades oftálmicas más frecuentes. Se caracteriza por la ausencia de suficiente película lagrimal (60, 61). Entre las consecuencias de esta afección crónica, destacan la presencia de irritación ocular e inflamación y suele derivar en la aparición de úlceras corneales, que pueden causar ceguera a largo plazo (61). Actualmente no existe ningún tratamiento efectivo para manejo del ojo seco. Únicamente la administración tópica de lágrimas artificiales, logra un alivio temporal de los síntomas, sin embargo sus complicaciones derivadas, como las úlceras corneales graves, pueden requerir un tratamiento adicional específico, que podría conducir a efectos secundarios adversos (61).

El efecto regenerativo del MC-hUCESCs ha sido demostrado en dos modelos animales de ojo seco, de rata y conejo respectivamente.

##### I.4.3.4.A MODELO DE RATA

El síndrome de ojo seco fue inducido en ratas extirpando las glándulas lacrimales extraoculares bilateralmente. Una vez comprobada la ausencia de producción de lágrimas en todas las ratas, se produjo una úlcera alcalina en la zona central de ambos ojos y se aplicaron distintos tratamientos en cada ojo por vía tópica. Posteriormente, se midió la lesión corneal cuantitativamente. Así mismo, se seleccionó aleatoriamente una rata de cada grupo para ser sacrificada y llevar a cabo la evaluación histológica (47, 57).

Las úlceras alcalinas cubrieron entre el 85 y 95% de la superficie corneal (Figura 8).

Quince horas después de la lesión, la regeneración del epitelio corneal fue mayor en los ojos tratados con MC-hUCESCs ( $62 \pm 5\%$  de la lesión total) en comparación con los otros tratamientos (grupo tratado con medio de cultivo:  $34 \pm 15\%$ , grupo tratado con gotas oftálmicas comerciales:  $32 \pm 15\%$  y sin tratamiento:  $36 \pm 13\%$ ) (47).

Cinco días después de la realización de la úlcera alcalina, la superficie corneal estaba prácticamente regenerada en todos los grupos tratados ( $> 74\%$ ). No se encontraron diferencias significativas entre las ratas no tratadas ( $62 \pm 16\%$ ), tratadas con el medio de cultivo ( $77 \pm 15\%$ ) y tratadas con gotas oftálmicas comerciales ( $74 \pm 15\%$ ). Sin embargo, el tratamiento con MC-hUCESCs ( $92 \pm 4\%$ ) mejoró significativamente el cierre de la herida en comparación con los otros tratamientos.

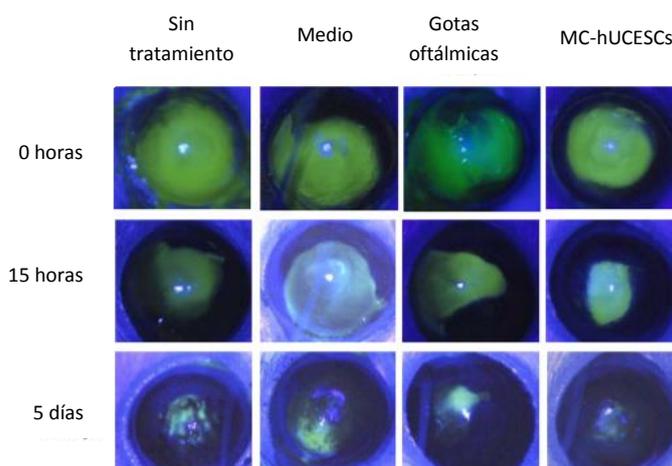


Figura 8: (A) Imágenes representativas de la tinción con fluoresceína de la córnea después de la quemadura con álcali (0 horas, 15 horas y 5 días). Cada columna representa el mismo ojo con el mismo tratamiento (57).

La evaluación histológica de las córneas mostró que en el grupo tratado con MC-hUCESCs el epitelio se había regenerado completamente. Sin embargo, en los grupos restantes (ratas no tratadas, tratadas con medio de cultivo y con gotas oftálmicas) la regeneración del epitelio no fue completa, mostrando una alteración de la capa epitelial en algún punto de la superficie (Figura 9) (47).

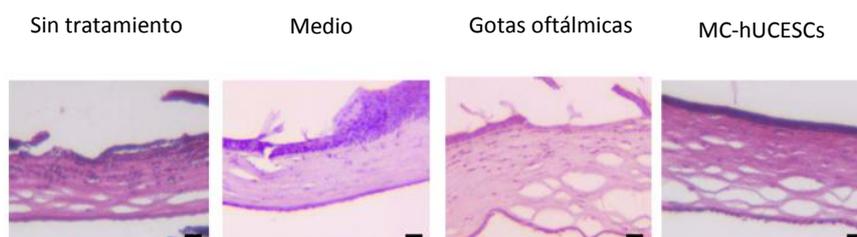


Figura 9: Imágenes representativas de tinción con hematoxilina-eosina de córneas no tratadas (sin tratamiento), tratamiento con medio de cultivo (Medio), gotas oftálmicas con hialuronato de sodio (Gotas oftálmicas) y MC-hUCESCs 5 días después de la quemadura alcalina (barra de escala: 20  $\mu$ m) (57).

Así, según los datos obtenidos, podemos concluir que el MC-hUCESCs tiene un efecto beneficioso en la curación de las heridas corneales, lo cual podría convertirlo en una alternativa terapéutica para personas con lesiones a este nivel (57).

#### I.4.3.4.B MODELO DE CONEJO

El ojo seco y las lesiones epiteliales corneales en el caso de los conejos, fueron inducidas mediante la administración tópica de sulfato de atropina e hidróxido de sodio (NaOH).

Para inducir el ojo seco se inoculó en ambos ojos, tres veces al día durante 3 días, 1% de sulfato de atropina. Posteriormente, se midió la producción de lágrimas para comprobar la presencia de ojo seco.

Después de 3 días de la administración de atropina, se provocó una quemadura alcalina en el centro de la córnea de ambos ojos de los conejos, para simular complicaciones clínicas frecuentes del ojo seco, mediante la aplicación de NaOH durante 60 segundos, bajo administración de anestésico tópico (proparacaína al 0,5%). A continuación, las córneas se enjuagaron con solución salina durante 30 segundos, se tiñeron con fluoresceína y fueron fotografiadas bajo luz azul con una cámara digital conectada a un microscopio quirúrgico. La lesión corneal se midió cuantitativamente utilizando el software ImageJ. Los tratamientos se aplicaron tópicamente en ambos ojos (1 gota) 4 veces al día, durante 60 horas.

Los conejos se dividieron en 6 grupos de 6 conejos cada uno: (1) conejos sanos; (2) conejos de ojo seco con lesiones corneales sin tratamiento; (3) conejos de ojo seco con lesiones corneales tratadas con medio de cultivo llamado Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12); (4) conejos de ojo seco con lesiones corneales tratadas con gotas oftálmicas de hialuronato de sodio; (5) conejos de ojo seco con lesiones corneales tratadas con MC-hUCESCs; y (6) conejos de ojo seco con lesiones corneales tratadas con MC-hUCESCs concentrado cuádruple. Sesenta horas después de la producción de la quemadura alcalina, los conejos fueron sacrificados y la córnea de un ojo fue utilizada para la evaluación histológica y la otra para la realización de PCR en tiempo real (61).

A las 0 h, las lesiones producidas en la córnea cubrían entre 85 y 90% de la superficie corneal (Figura 10). Después de 36 h, la regeneración epitelial fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en ojos tratados con MC-hUCESCs (1X) y (4X) ( $90.0 \pm 5.3\%$  y  $91,1 \pm 9,9\%$ , respectivamente) en comparación con el grupo no tratado ( $82.3 \pm 6.2\%$ ) y el grupo tratado con DMEM-F12 ( $79.6 \pm 4.2\%$ ).

Cuarenta y ocho horas después de la quemadura alcalina, la regeneración epitelial fue mayor ( $p < 0.05$ ) en ojos tratados con MC-hUCESCs ( $97.4 \pm 2.8\%$  (1X) y  $98.5 \pm 0.9\%$  4X), en comparación con todos los demás grupos (sin tratamiento,  $82.3 \pm 6.2\%$  y tratamientos con DMEM-F12,  $92.4 \pm 2.4\%$  y gotas oftálmicas,  $88.0 \pm 7.0\%$ ) (61).

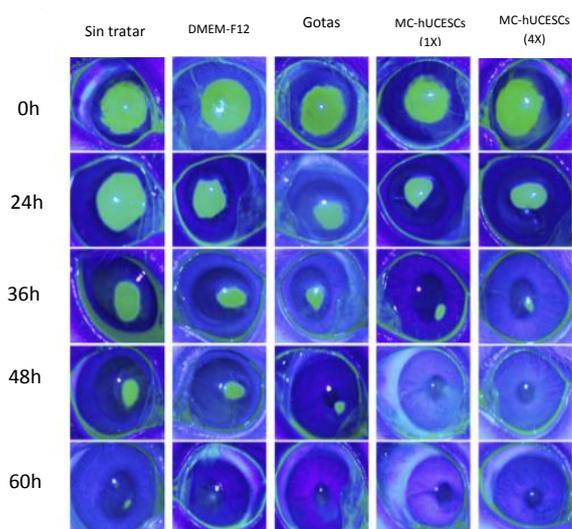


Figura 10: Imágenes representativas de tinción con fluoresceína en la córnea después de quemadura alcalina (0 h, 24 h, 36 h, 48 h y 60 h). Cada columna representa el mismo ojo tratado como se indica en la parte superior de la columna (61).

La evaluación histológica mostró un epitelio completamente regenerado en las córneas tratadas con MC-hUCESCs, tanto con MC-hUCESCs (1X) como con MC-hUCESCs (4X). El grupo no tratado y los grupos tratados con DMEM-F12 y gotas oftálmicas mostraron un epitelio alterado 60 h después de la quemadura alcalina (Figura11).

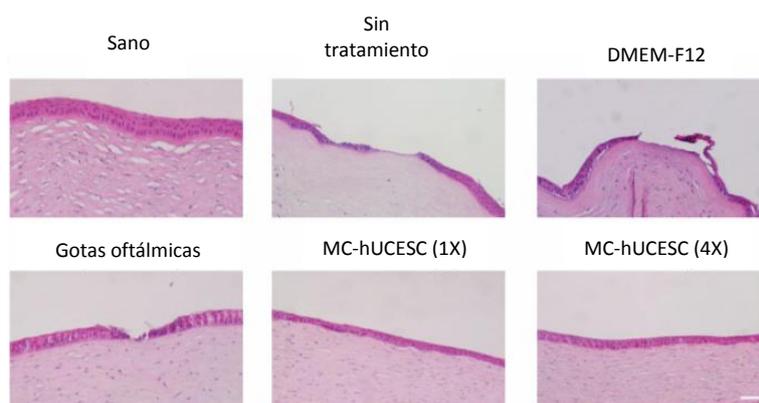


Figura 11: Imágenes representativas de tinción con hematoxilina-eosina de córneas de ojos sanos, córneas sin tratar, y tratadas con medio de cultivo (DMEM-F12), gotas oftálmicas con hialuronato de sodio y MC-hUCESCs (1X y 4X). Barra de escala: 20  $\mu$ m (61).

Para evaluar el efecto del MC-hUCESCs sobre las citoquinas proinflamatorias, se evaluó mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), la expresión de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), de la proteína inflamatoria macrofágica 1 alfa (MIP-1 $\alpha$ ) y de la interleucina 6 (IL-6), en córneas sanas, no tratadas y tratadas.

Las córneas sin tratamiento o tratadas con DMEM-F12 mostraron la expresión más alta ( $p < 0.05$ ) de ARNm en todas las citoquinas proinflamatorias probadas (61).

No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos con las gotas oftálmicas y MC-hUCESCs (1X). Sin embargo, los niveles de expresión de ARNm de TNF- $\alpha$ , MCP-1 e IL-6 en conejos tratados con MC-hUCESCs (4X) fueron similares a los conejos sanos, pero menores ( $p < 0.05$ ) que los no tratados y tratados con DMEM-F12, gotas oftálmicas y MC-hUCESCs (1X) (61).

Estos resultados apoyan firmemente que el uso del MC-hUCESCs en algunas afecciones relacionadas con la córnea, presenta propiedades regenerativas y antiinflamatorias, superándose con su uso algunos de los desafíos que presentan los tratamientos convencionales (61).

#### I.4.3.5 POTENCIAL ANTIINFLAMATORIO DE LAS hUCESCs

La uveítis es un término aplicado a una amplia gama de afecciones caracterizadas por la presencia inflamación intraocular. Se trata de una patología oftálmica que puede conducir a la aparición de cataratas, glaucoma o ceguera (62, 63).

Puede darse de forma aislada, como una complicación de una infección, o formar parte de enfermedades sistémicas, como las de tipo autoinmune (63-65). Los corticoides son la terapia de primera línea para el manejo de pacientes con uveítis, pero, dados los efectos secundarios que producen, se hace necesaria la búsqueda de nuevos enfoques terapéuticos (63, 66, 67). En los últimos años han sido desarrollados modelos animales para estudiar este proceso.

Nuestro grupo de investigación ha evaluado el efecto del MC-hUCESCs en la uveítis. Para ello se indujo uveítis en ratas, inoculando una inyección lipopolisacáridos de *Escherichia coli* (LPS). Se realizaron 5 grupos de 10 ratas cada uno: 1) ratas sanas (sin inyección de LPS) no tratadas; 2) ratas con uveítis inducida por endotoxina (EIU, del término en inglés “endotoxin-induced uveitis”) no tratadas; 3) ratas EIU tratadas con medio de cultivo DMEM-F12; 4) ratas EIU tratadas con dexametasona (DXM) y 5) ratas EIU tratadas con MC-hUCESCs producido durante 48 horas. Los tratamientos se aplicaron en cada ojo por vía tópica, 1 gota cada 3 horas, durante las primeras 12 horas después de la inyección de LPS.

Veinticuatro horas después de la inyección de LPS se realizó la evaluación histológica de las retinas y de los procesos ciliares (Figura 12). Para ello, se extirparon los globos oculares y se fijaron por inmersión en formalina tamponada neutra al 10% (47).

Las ratas sanas, a las cuales no se inyectó LPS, no presentaron infiltración de leucocitos. Sin embargo, las ratas con uveítis, tanto no tratadas como tratadas con medio de cultivo, mostraron una infiltración significativa de leucocitos tanto en la retina como en los procesos ciliares. Por el contrario, en las ratas con uveítis tratadas con DXM o MC-hUCESCs, se observó una baja infiltración, similar a la observada en ratas sanas ( $p < 0,001$ ).

Para evaluar el efecto del MC-hUCESCs sobre los factores implicados en la inflamación, se analizó la expresión de las citoquinas proinflamatorias IL-6, TNF- $\alpha$ , interleucina 8 (IL-8) y MIP-1 $\alpha$  en el tejido ocular.

Los niveles de estos factores fueron significativamente más altos en el tejido ocular de ratas con uveítis no tratadas o tratadas con medio de cultivo, que en ratas con uveítis tratadas con DXM o MC-hUCESCs (47).

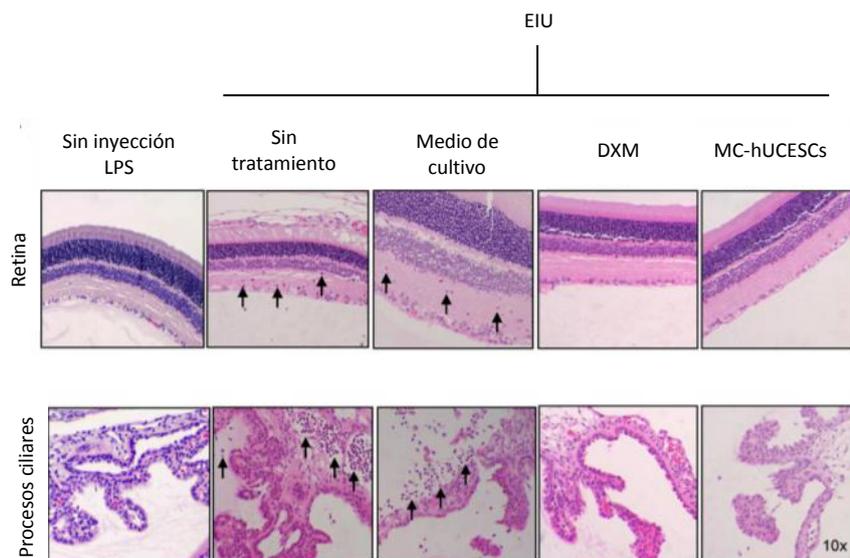


Figura 12: Tinción representativa de hematoxilina-eosina que muestra infiltrado de leucocitos (flechas) en la retina y procesos ciliares de ojos sanos (sin inyección de LPS), ojo con EIU (Sin tratamiento), ojo con EIU tratado con medio de cultivo (Medio de cultivo), dexametasona (DXM) y medio condicionado de hUCESCs (MC-hUCESCs). El estudio histológico se realizó a las 24 h de la inyección de LPS (63).

Los resultados demuestran que el tratamiento tópico con MC-hUCESCs induce una potente actividad antiinflamatoria, lo cual apunta hacia su uso como potencial agente terapéutico para afecciones inflamatorias, especialmente la uveítis (63).

## II. HIPÓTESIS

El aislamiento y caracterización de las hUCESCs como un nuevo tipo de células madre mesenquimales ha permitido demostrar que presentan una potente capacidad antiinflamatoria, así como la de inhibir la proliferación e invasión de células tumorales y estimular la apoptosis de las mismas. Además, se ha podido evidenciar el papel del medio condicionado o secretoma de las hUCESCs en el proceso de regeneración tisular de la córnea, demostrándose que éste contiene moléculas que modulan la inflamación, de forma que favorece el proceso de regeneración tisular y la inhibición del crecimiento bacteriano.

Así mismo, en estudios previos se ha podido objetivar la disminución de la expresión de los genes relacionados con la inflamación, tras la administración de MC-hUCESCs sobre la superficie ocular.

En este sentido, y continuando con la investigación sobre las potencialidades terapéuticas del MC-hUCESCs en el ámbito de la patología oftálmica, se plantea el estudio de los efectos del MC-hUCESCs en la patología retiniana, en concreto sobre el epitelio pigmentario de la retina, ante estímulos de estrés oxidativo e inflamación.

## III. OBJETIVOS

Los objetivos del presente estudio son:

1. Evaluar el efecto protector del MC-hUCESCs sobre el epitelio pigmentario de la retina en un modelo de estrés oxidativo, determinando la expresión del factor HO-1 relacionado con el estrés oxidativo.
2. Estudiar la expresión de factores relacionados con la vascularización.
3. Evaluar el efecto del MC-hUCESCs sobre la formación de vasos sanguíneos.

## IV.MATERIAL Y MÉTODOS

### IV.1 AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS hUCESCs

#### IV.1.1. AISLAMIENTO DE LAS hUCESCs

Las hUCESCs se obtienen a partir de la realización de frotis cervicales, siguiendo la técnica de Papanicolau en medio líquido, a mujeres no menstruantes en edad fértil. Para realizar la citología, el cepillo se introduce al menos tres cuartas partes en la profundidad del canal endocervical, tratando de acceder a la zona de transformación y se gira unos 15° (Figura 13). Posteriormente, el cepillo es depositado en un tubo que contiene medio de cultivo suplementado con antibiótico, y conservado a 4 °C hasta su procesamiento.

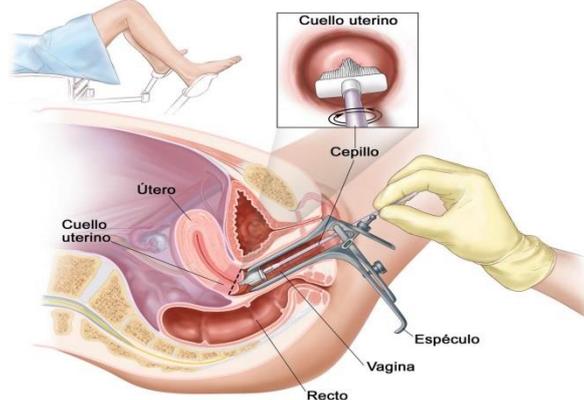


Figura 13: Técnica de papanicolau.

Para proceder al aislamiento de las hUCESCs se deposita el contenido del cepillo de citología en una placa que contiene DMEM-F12. A continuación se añade tripsina junto con DMEM-F12 y la muestra se mantiene en un incubador a 37 °C, atmósfera de aire-dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (95:5) y 90% de humedad.

Posteriormente, se añade DMEM-F12 suplementado con glutamina, penicilina y estreptomina, suero fetal bovino (FBS) al 10 %, factor de crecimiento epidérmico, hidrocortisona e insulina.

En este periodo de tiempo se revisan las placas una vez a la semana al inicio y, posteriormente, cada 48 horas con el objetivo de observar la aparición de células y proceder a los cambios de medio correspondientes.

Una vez que las células han alcanzado el 70 % de confluencia en el pocillo, y tras llevar a cabo un procedimiento de tripsinización, se pasa el contenido de la placa a una botella de cultivo o flask.

Transcurridas 72-96 horas, las células llegan a confluencia, por lo que se realiza de nuevo la tripsinización y, posteriormente, se centrifugan 5 minutos a 400g. Se retira el sobrenadante y una parte del pellet obtenido se congela. El resto se pasa a otra botella para su posterior cultivo.

#### IV.1.2. CARACTERIZACIÓN DE hUCESCs POR ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

La utilización de células y sus derivados, como puede ser el medio condicionado, requiere de la identificación inequívoca del aislamiento del tipo celular de interés.

Las células pueden identificarse por un conjunto de características específicas, como su morfología, la expresión de genes o la presencia y ausencia de determinadas proteínas en la membrana celular. Las proteínas presentes en la membrana celular pueden evaluarse mediante el uso de anticuerpos específicos que se unen a dichas proteínas y que están marcados con un fluoróforo para ser así detectados. La presencia e intensidad del marcaje pueden medirse a través de un citómetro de flujo, e indicarán la presencia y abundancia de dicha molécula en cada una de las células de la población testada.

El Comité de células madre mesenquimales y tisulares de la Sociedad Internacional de Terapia Celular estableció en 2006 las características mínimas identificadoras de células madre mesenquimales. Entre ellas se encuentra la expresión de CD105, CD73 y CD90 y la ausencia de expresión de CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a o CD19 y HLA-DR. En concreto para las hUCESCs, se han identificado los siguientes marcadores (Tabla 1).

Tabla 1: Marcadores presentes y ausentes para las hUCESCs.

<b>Presentes</b>	<b>Ausentes</b>
CD44 (glicoproteína de migración, adhesión e interacción celular)	CD31 (marcador endotelial)
CD73 (5'-nucleotidasa con acción extracelular)	CD34 (marcador hematopoyético)
CD90 (proteína de superficie de la superfamilia de las inmunoglobulinas)	CD45 (marcador hematopoyético)
CD105 (glicoproteína de membrana, parte del complejo receptor TGF- $\beta$ )	CD117 (marcador hematopoyético)

Para comprobar que las células aisladas son hUCESCs, se procede a la caracterización por citometría de flujo. La citometría de flujo utiliza luz láser para el recuento y clasificación de células en suspensión dentro de una población heterogénea según sus características morfológicas o la presencia de determinados biomarcadores. Las células suspendidas en un fluido atraviesan un tubo transparente de un calibre muy pequeño y sobre este incide un rayo de luz láser.

Al pasar éste por el pasaje de las células a través del tubo, se dispersará una luz que se recoge mediante unos detectores (Figura 14). A partir de esta información, el sistema informático genera una serie de histogramas y gráficos de dispersión que permiten hacer inferencias en cuanto al tamaño y la complejidad de las células.

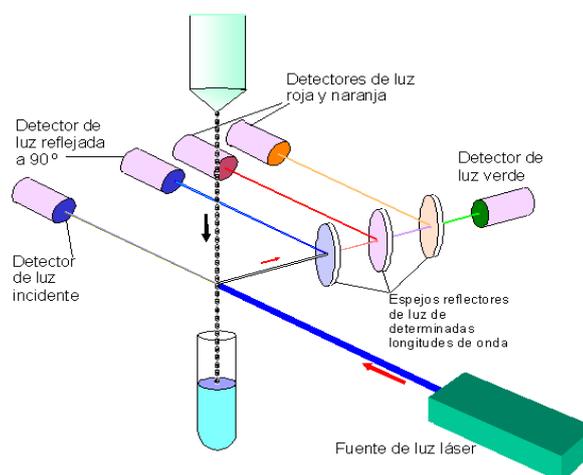


Figura 14: Fundamentos del citómetro de flujo.

La caracterización de las hUCESCs se realiza empleando anticuerpos específicos de los siguientes marcadores de superficie: CD31, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, CD117 (Tabla 2).

Tabla 2: Anticuerpos utilizados para la caracterización de las hUCESCs mediante citometría de flujo.

Anticuerpo	Referencia	Casa comercial
BD Pharmingen™ PE Mouse Anti-Human CD31 [clone WM59 (also known as WM-59)]	555446	BD Biosciences
BD Pharmingen™ PE Mouse Anti-Human CD34 [clone 581]	555822	BD Biosciences
BD Pharmingen™ PE Mouse Anti-Human CD44 [clone G44-26 (also known as C26)]	555479	BD Biosciences
BD Pharmingen™ FITC Mouse Anti-Human CD45 [clone HI30]	555482	BD Biosciences
BD Pharmingen™ PE Mouse Anti-Human CD73 [clone AD2]	550257	BD Biosciences
CD90 Antibody, anti-human, FITC, REAfinity™ [clone REA897]	130-114-859	MACS Miltenyi Biotec
CD105 Antibody, anti-human, FITC, REAfinity™ [clone REA794]	130-112-169	MACS Miltenyi Biotec
CD117 PE [clone 104D2]	332785	BD Biosciences

Estos han de conservarse a 4 °C en nevera.

Para ello, se resuspenden 100.000 células en un volumen de 100 µl de una solución salina tamponada con fosfato (PBS, Sigma Aldrich, StLouis, USA), al cual se añade el volumen correspondiente de anticuerpo y se incuba según las indicaciones mostradas en la tabla (Tabla 3).

Posteriormente, las células son lavadas con 300µl de PBS, centrifugadas a 400g durante 5min. Finalmente, se resuspende el botón celular en 300µl de PBS y se analiza en el citómetro de flujo Cytomics FC500 de Beckman.

Tabla 3: Volumen y condiciones de incubación de cada tipo de anticuerpo.

Anticuerpo	Volumen (µL)	Tiempo de incubación (min)	Temperatura (CD)
CD31	10	30	4
CD34	10	30	4
CD44	10	30	4
CD45	10	30	4
CD73	10	30	4
CD90	4	30	on ice
CD105	4	30	on ice
CD117	10	30	RT

A través de este procedimiento se puede comprobar la expresión de los marcadores CD44, CD73, CD90, CD105 y la ausencia de expresión de CD31, CD 34, CD45 y CD117.

## IV.2. CULTIVO DE LAS CÉLULAS

### IV.2.1. CULTIVO DE LAS hUCESCs Y CÉLULAS ARPE-19

Para llevar a cabo el estudio, se utiliza la línea celular comercial de epitelio pigmentario de la retina (ARPE-19) (ATCC) como modelo in vitro, que corresponde a una línea de células de EPR de tejido normal, es decir, sin patología asociada. Las células ARPE-19 y las hUCESCs son cultivadas en medio completo, DMEM-F12 suplementado con 10% de FBS y 1% de penicilina-estreptomina.

#### IV.2.2. PASE DE LAS hUCESCs

El cambio de las células obtenidas en el pocillo a la botella de cultivo o flask recibe el nombre de pase. Una vez que en la botella han crecido células hasta alcanzar una confluencia mayor al 70 %, se realiza un nuevo pase a otro flask, previo procedimiento de tripsinización. Este proceso se repite sucesivamente hasta haber llevado a cabo unos cinco pases. Es en el segundo pase cuando se lleva a cabo la citometría de flujo para proceder a la caracterización de las hUCESCs.

#### IV.2.3. PRODUCCIÓN DEL MEDIO CONDICIONADO DE LAS hUCESCs

Las hUCESCs producen un secretoma o medio condicionado que presenta propiedades similares a las propias células. La producción de medio condicionado tiene lugar entre el tercer y quinto pase de las hUCESCs, es decir, una vez que han sido caracterizadas por citometría de flujo. Las células son cultivadas en botellas de cultivo o flask de 182 cm<sup>2</sup> con 18 ml de medio de cultivo DMEM-F12 con FBS al 10%, estreptomicina 0,1 mg/ml y 100U/ml de penicilina, en atmósfera de CO<sub>2</sub>-aire (95:5), a 37 °C hasta llegar a una confluencia del 80%. Posteriormente, se retira el medio de cultivo y son lavadas tres veces con PBS para retirar los restos de FBS, factores de crecimiento y antibióticos. A continuación, se cultivan nuevamente con DMEM-F12 sin FBS durante 48h, en incubadora a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> y humedad ambiente. Transcurrido este tiempo, el medio es recogido y centrifugado 5 min a 400g. El sobrenadante (MC-hUCESCs) es recogido y puede ser utilizado inmediatamente, conservado congelado a -80 °C o liofilizado.

### IV.3. MODELO DE ESTRÉS OXIDATIVO

Las células ARPE-19 son crecidas en medio completo hasta llegar a una confluencia del 90%. Con el objetivo de inducir estrés oxidativo se cambia el medio y se incuban las células durante 4 horas en diferentes condiciones:

- Control: medio DMEM-F12
- Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>): 400 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + medio de cultivo hUCESCs: 400 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + MC-hUCESCs.

#### IV.4. ESTUDIO MOLECULAR MEDIANTE PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL

Se ha analizado la expresión del gen antioxidante HO-1 y de factores relacionados con los vasos, como el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGFA), la subunidad A del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFA) y la subunidad B de ese mismo factor (PDGFB) de las ARPE-19 en las diferentes condiciones de cultivo, mediante qPCR.

Para ello, los pasos a seguir son los siguientes:

##### IV.4.1. EXTRACCIÓN DE ARN

Tras eliminar el medio de la placa de cultivo, se procede a la tripsinización de las células. Una vez recogidas, las células son centrifugadas a 1400 revoluciones por minuto durante 5 minutos.

La extracción de ARN es realizada con el kit *RNeasy Mini* (Qiagen, 50974104) que permite la purificación de ARN total (con una longitud mayor a 200 pares de bases) a partir de muestras de cultivo celular, mediante la unión selectiva a la membrana de sílica y la velocidad de microcentrifugación.

El procedimiento se realiza siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar se lisan las células y se homogenizan con un buffer con altas concentraciones de guanidina-tiocinato, que produce la desnaturalización del ADN y proteínas, lo que inactiva las ARNasas para asegurar la purificación del ARN. A continuación, se añade etanol que confiere las condiciones apropiadas para la unión a la membrana y produce la precipitación del ARN. Posteriormente, se lava con buffers que eliminan los contaminantes unidos a la membrana y, por último, se eluye en 15  $\mu$ L de agua. Las muestras son conservadas a -80 °C hasta su uso.

Para determinar la concentración y la calidad del ARN, se utiliza un espectrofotómetro NanoDrop™ (NanoDrop Technologies, ND-1000). Las concentraciones de ARN son medidas en ng/ $\mu$ L utilizando 2  $\mu$ L de cada muestra, y la relación de absorbancias a 260/280 nm es utilizada como índice de calidad (Figura 15).

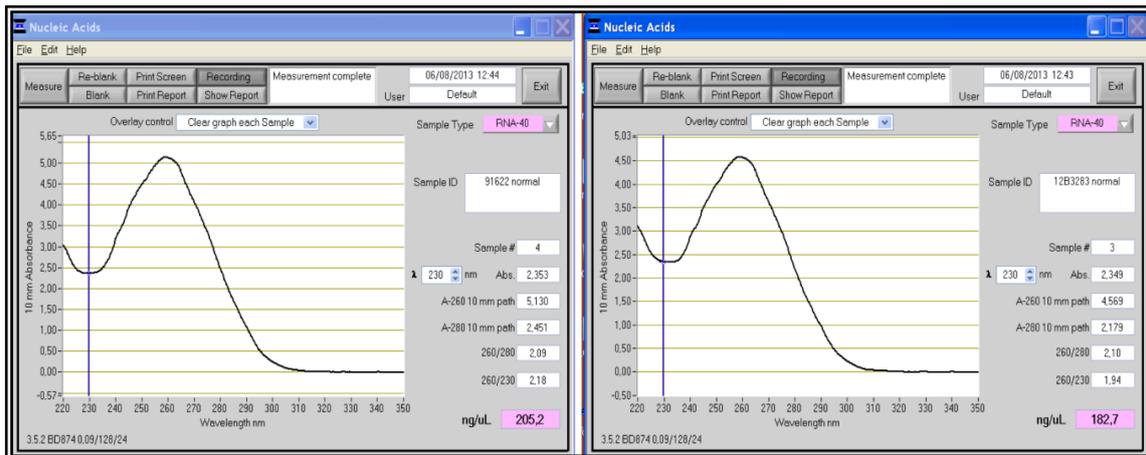


Figura 15: Captura de imagen del espectrofotómetro NanoDrop® para analizar la calidad del ARN extraído.

#### IV.4.2. SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO (ADNc)

Para la obtención del ADNc del ARN, se realiza la obteniendo ADN monocatenario complementario al ARN extraído. Para este proceso, se utiliza el kit comercial *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit* (Roche, 04896866001), siguiendo las instrucciones del fabricante.

En primer lugar, el ARN se somete a una desnaturalización junto a oligonucleótidos, a 65 °C durante 10 minutos en un termociclador (NYX Technik, ACT-401), para eliminar las estructuras secundarias, e inmediatamente se introduce en hielo para evitar la renaturalización.

A continuación, se añaden los desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), inhibidor de ARNasas y la transcriptasa reversa, y se incuba en las siguientes condiciones: 10 minutos a 25 °C, 60 minutos a 50 °C, 5 minutos a 80 °C y se desciende la temperatura hasta 4 °C. Las muestras de ADNc se conservan a -20 °C hasta su uso.

#### IV.4.3. PCR A TIEMPO REAL

Se ha analizado la expresión génica de HO-1, VEGFA, PDGFA y PDGFB en las ARPE-19 en las diferentes condiciones de cultivo, mediante qPCR.

El objetivo de la qPCR es amplificar masivamente una región presente en una muestra de ADN. Esta amplificación da lugar a millones de copias.

Distintos reactivos participan en este proceso, como son:

1. La muestra de ADN de interés con la región o target que vamos a amplificar.
2. DNA polimerasa, que cataliza la creación de una hebra monocatenaria de ADN. La más utilizada es la taq polimerasa que es característica por su termo estabilidad, ya que se obtiene del *Thermus aquaticus*, bacteria que por vivir en aguas termales no se degrada.
3. Los primers o cebadores, que son pequeñas hebras monocatenarias de ADN que se unirán a la región de interés para ser reconocidos por la polimerasa.
4. El SYBR Green, que es una molécula fluorescente, rica en anillos aromáticos que interacciona con ADN de doble cadena con el objetivo de que sea detectado a medida que se va generando durante la técnica.

Una vez unidos los primers al ADN, la polimerasa completará la secuencia de bases creando dos hebras. A medida que el ciclo se va repitiendo en el termociclador se van formando más hebras complementarias e incrementando el número de copias de ADN (Figura 16).

Ya que los nucleótidos han sido marcados para emitir fluorescencia con el SYBR Green, en cada ciclo la muestra es leída por un software específico que mide la emisión de fluorescencia, lo que creará una curva, dependiendo de la cantidad de ADN amplificado y a más ADN, más emisión de luz.

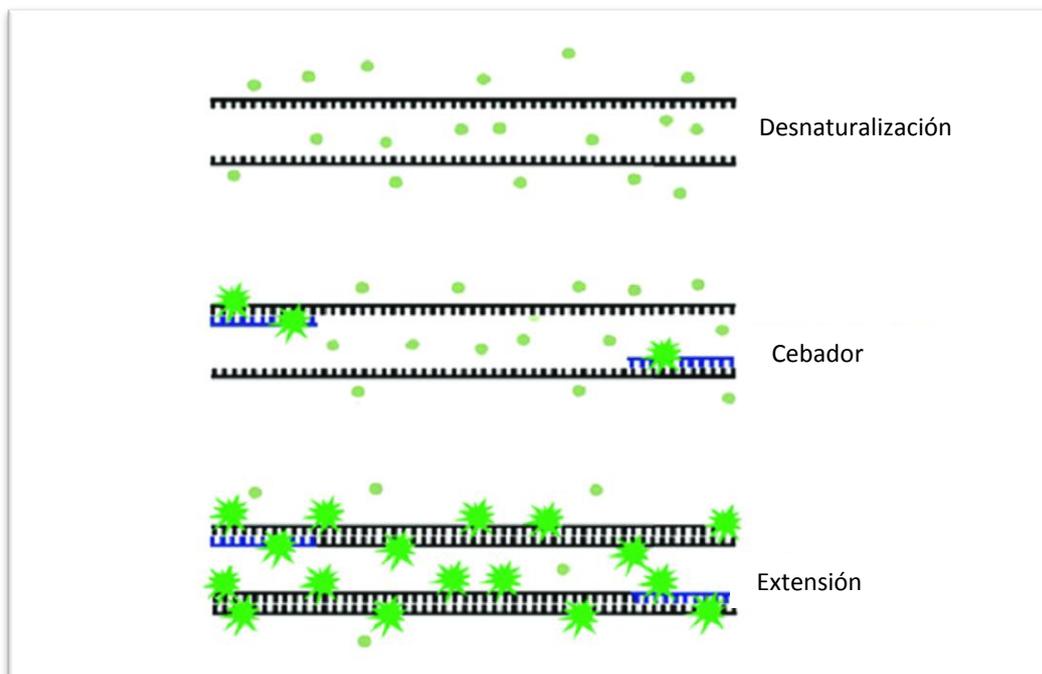


Figura 16: PCR a tiempo real.

Cada reacción es preparada en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ , utilizando 5  $\mu\text{l}$  de ADNc a una concentración final de 2  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . Las muestras se analizan por triplicado en placas de 96 pocillos en el termociclador LigthCycler 480 II (Roche) en las siguientes condiciones:

1. 1 ciclo de preincubación: 10 min a 95 °C
2. 45 ciclos de amplificación:
  - a. Desnaturalización: 10 segundos a 95 °C
  - b. Anillamiento: 30 segundos a 60 °C
  - c. Extensión: 1 segundo a 72 °C
3. 1 ciclo de enfriamiento: 30 segundos a 40 °C

Para la cuantificación de las expresiones génicas, se necesita determinar el punto en el cual la fluorescencia de la reacción sobrepasa la fluorescencia basal y, por tanto, la reacción da comienzo. Este punto se denomina Cp (Crossing point) o Ct (Threshold point o punto umbral).

La cuantificación se realiza mediante el software LightCycler (Roche), con una cuantificación relativa avanzada (E-Method), que tiene en cuenta los cambios en las eficiencias en la amplificación, por lo que permite calcular con mayor precisión la expresión relativa de genes respecto a los genes de referencia (68). La expresión relativa de cada gen es analizada en función de los dos genes de referencia empleados ( $\beta$ -actina y GAPDH) (Figura 17).

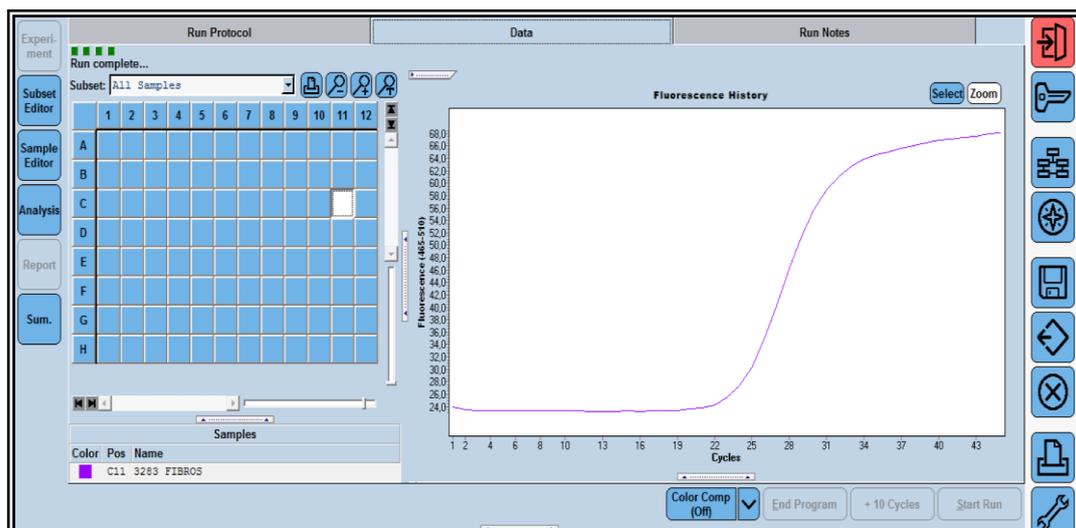


FIGURA 17. Captura de imagen del termociclador LigthCycler 480 (Roche) para analizar los resultados obtenidos por PCR semicuantitativa.

La qPCR se realizó utilizando ensayos individuales personalizados RealTime ready (Roche, Mannheim, Alemania) que contenían los cebadores y las sondas específicos para los factores estudiados y para los genes de referencia (Tabla 4).

Tabla 4: Ensayos individuales personalizados RealTime ready.

Símbolo del gen	Nombre del gen	Referencias (ID del ensayo)
HO-1	Hemo oxigenasa (deciada) 1	110977
VEGFA	Factor de crecimiento endotelial vascular A	140396
PDGFA	Polipéptido alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas	147202
PDGFB	Polipéptido beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas	110713

#### IV.5. ENSAYO DE FORMACIÓN DE TUBOS / ENSAYO DE VASCULOGÉNESIS

El ensayo de formación de tubos se realizó en Matrigel (BD Biosciences). El método consiste en la medición de la habilidad de las células endoteliales para formar estructuras tridimensionales (formación de tubos) por medio de la estrecha unión de estas.

La primera matriz de Matrigel reducida con factor de crecimiento se carga en una placa de 96 pocillos. Una vez polimerizadas, las células endoteliales de vena umbilical (HUVEC -Human Umbilical Vein Endothelial Cells, por sus siglas en inglés-) ( $4 \times 10^5$ ) se siembran y se incuban a 37 °C durante 5 horas junto con sobrenadante de cultivo celular ARPE-19 como se describió anteriormente (ARPE-19 tratado o no con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y en presencia o no de MC-hUCESCs) y usando su propio medio como control (medio Vasculife). Se utiliza DMEM-F12 (vehículo de MC-hUCESCs) como control adicional. La formación de estructuras de tipo capilar se evalúa bajo un microscopio de fluorescencia después añadir el colorante CellTracker Red CMTPX (0,5 μM; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). La cuantificación de las longitudes de los vasos y el número de uniones se realiza utilizando el software AngioTool.

#### IV.6. ANALISIS ESTADÍSTICO

Todos los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. La distribución de variables se analizó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Sobre la base de este análisis, se utilizó una prueba paramétrica, como el ANOVA (Analysis of variance) unidireccional (prueba post-hoc de Bonferroni) para la comparación entre grupos. Se utilizó el programa producto de estadística y solución de servicio (SPSS) 18.0 (PASW Statistics 18) para todos los cálculos. Se establecieron diferencias significativas en  $p \leq 0.05$ .

## V.RESULTADOS

### V.1. CARACTERIZACIÓN DE hUCESCs

El aislamiento y caracterización de las hUCESCs obtenidas mediante exfoliación del cérvix uterino siguiendo la técnica de papanicolau, se llevó a cabo mediante inmuno citoquímica, siendo positivas para vimentina y  $\beta$ -catenina. Además, las hUCESCs, por medio de la citometría de flujo, fueron positivas para CD 29, CD 44, CD73, CD90 y CD 105, mientras que fueron negativas para CD34, CD45 y CD133 (Marcadores hematopoyéticos), CD31 (marcador endotelial), CD117, TRA-1-81 (marcador de superficie de células madre embrionarias) y HLA-DR.



Figura 18: Cultivo de hUCESCs.

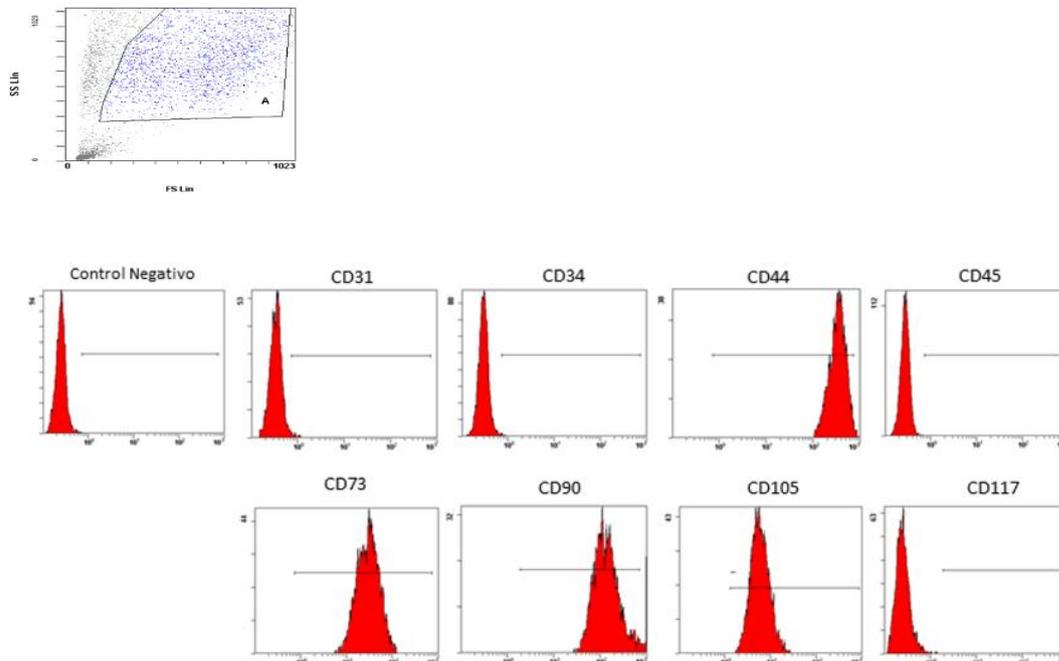


Figura 19: Caracterización de hUCESCs.

## V.2. EFECTO DEL MC-hUCESCs SOBRE LA LESIÓN DE LAS ARPE-19 OCASIONADA POR ESTRÉS OXIDATIVO

Con el fin de estudiar el efecto del MC-hUCESCs sobre la expresión de un gen antioxidante en condiciones de estrés oxidativo, comparamos los niveles de expresión de HO-1 después del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia o no del MC-hUCESCs, mediante qPCR. Como se muestra en la Figura 20, la expresión de ARNm de HO-1 aumentó significativamente en las células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + MC-hUCESCs en comparación con las células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solamente ( $p < 0,0001$ ).

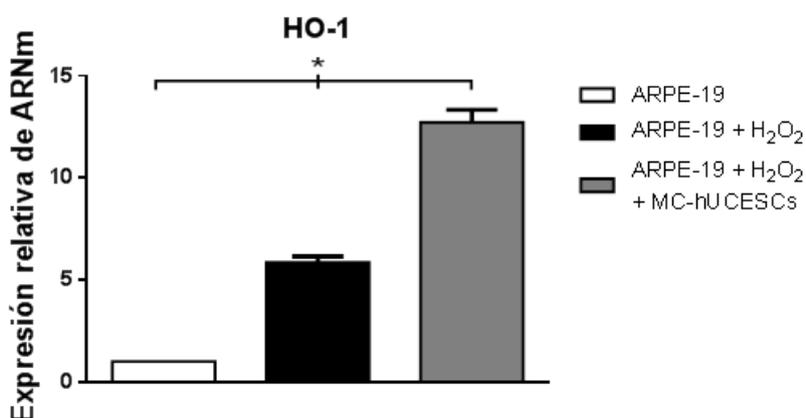


Figura 20: Niveles de expresión de HO-1 después del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia o no del MC-hUCESCs.

Se ha podido evidenciar que los niveles basales de HO-1 en las células ARPE sin tratamiento son relativamente bajos. Sin embargo, estos aumentan cuando se provoca estrés oxidativo, por la necesidad que las propias células tienen de protegerse frente al daño.

Cuando las células ARPE están sometidas a estrés oxidativo, pero, además, son tratadas con MC-hUCESCs se observa un aumento muy significativo de la expresión de HO-1, lo que traduciría una mayor protección de estas células, por lo tanto del epitelio pigmentario de la retina frente a ese daño.

### V.3. EFECTO DEL MC-hUCESCs SOBRE LA VASCULOGÉNESIS

Debido a la importancia de la vasculogénesis en la homeostasis del epitelio pigmentario de la retina, estudiamos el efecto del MC-hUCESCs sobre la expresión de factores relacionados con los vasos, como VEGFA, PDGFA y PDGFB. Como se muestra en la Figura 21, la expresión de los tres factores aumentó significativamente en las células ARPE-19 tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + MC-hUCESCs en comparación con las células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solamente (p <0,05).

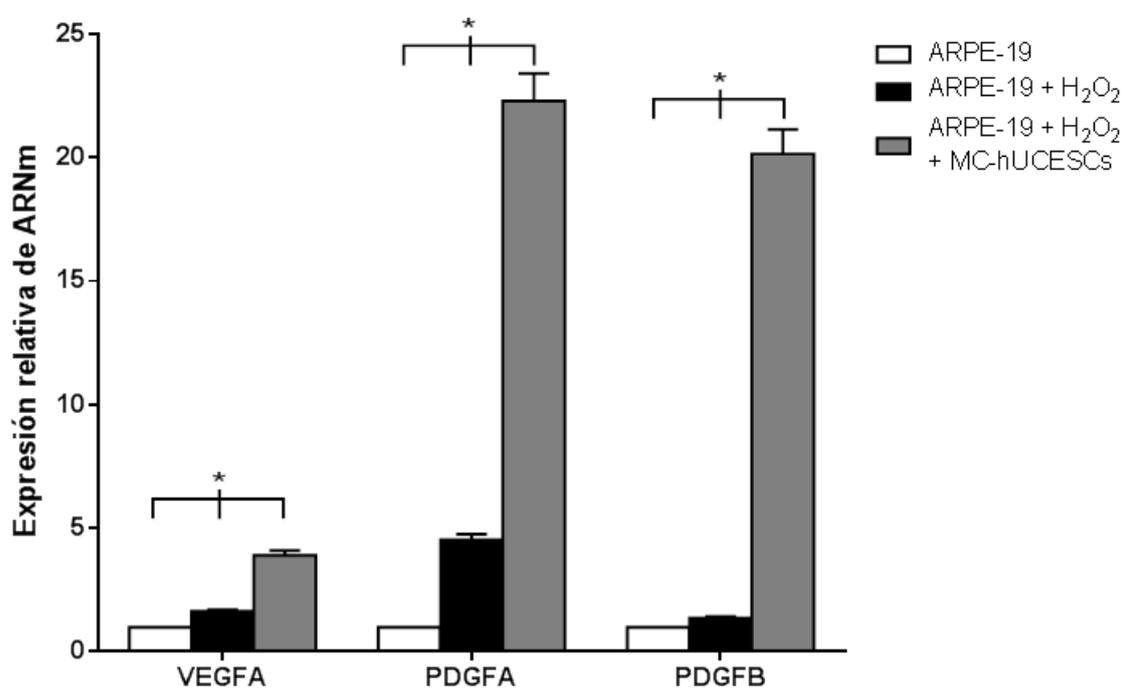


Figura 21: Expresión de VEGFA, PDGFA y PDGFB en células ARPE-19 tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia o no de MC-hUCESCs.

#### V.4. EFECTO DEL MC-hUCESCs SOBRE LA FORMACIÓN DE VASOS SANGUÍNEOS

Debido al aumento de expresión de factores angiogénicos en células ARPE-19 tratadas con MC-hUCESCs, procedimos a estudiar el efecto sobre las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC). Los componentes de los sobrenadantes pueden acelerar o inhibir la formación de tubos por las HUVEC.

Las HUVEC tratadas con medio VascuLife pueden formar tubos que se materializan como nuevos vasos sanguíneos al final del proceso (Figura 22 a). El tratamiento de las HUVEC con DMEM-F12 (Figura 22 b) muestra una formación de tubos visualmente peor que el tratamiento con medio VascuLife.

Después de 5 h en cultivo, las HUVEC tratadas con sobrenadante de células ARPE-19 tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + MC-hUCESCs forman tubos con pared delgada más similares a vasos sanos (Figura 22 c) que las HUVEC tratadas con sobrenadante de células ARPE-19 tratadas únicamente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 22 d).

Además, se mostró un aumento significativo en la longitud promedio de los vasos de las HUVEC, en el número de uniones capilares ( $p = 0,003$ ), así como un aumento en el promedio del área de los vasos ( $p = 0,04$ ) cuando se incubaron en el sobrenadante de ARPE-19 tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + MC-hUCESCs ( $p = 0,007$ ), comparado con las HUVEC incubadas en el sobrenadante de ARPE-19 tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solamente (Figura 22 e-f). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre las HUVEC incubadas en medio VascuLife o DMEM-F12 y HUVEC incubadas en sobrenadante de ARPE-19 tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + MC-hUCESCs y HUVEC incubadas en el medio de control (medio VascuLife).

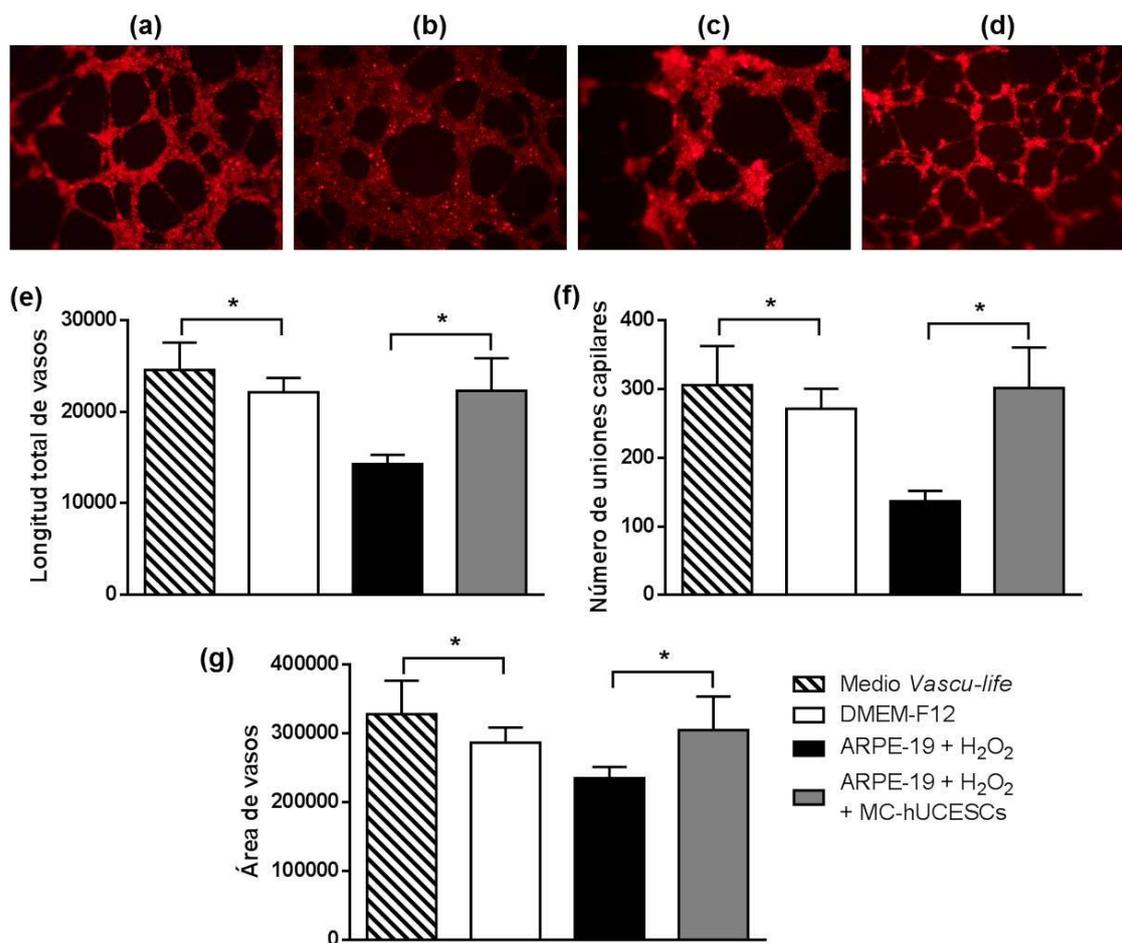


Figura 22. Ensayo de formación de tubos de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC). Imágenes representativas de HUVEC cultivadas durante 5 h con (a) medio Vasculife (control), (b) medio DMEM-F12, (c) sobrenadante de cultivo celular ARPE-19 tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y (d) sobrenadante de cultivo celular ARPE-19 tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de medio condicionado hUCESCs (MC-hUCESCs) después de lo cual se midieron (e) la longitud total de los vasos, (f) el número total de uniones y (g) las áreas de los vasos usando el software Angiotool. Los datos representan la media ± DE de tres experimentos independientes (\* p ≤ 0,05).

## VI.DISCUSIÓN

En el presente estudio, utilizamos células ARPE-19 ya que, en un estudio anterior, demostramos el efecto antiinflamatorio del MC-hUCESCs en esta línea celular (63). Este estudio muestra que el tratamiento de células ARPE-19 bajo condiciones de estrés oxidativo con MC-hUCESCs, mejora la expresión génica del gen antioxidante HO-1. Además, el MC-hUCESCs mostró propiedades angiogénicas fisiológicas sobre HUVEC. Así, todos nuestros datos sugieren que el MC-hUCESCs podría ser de gran interés para el tratamiento de enfermedades oculares asociadas al estrés oxidativo y/o trastornos vasculares.

La retina es un tejido neural complejo que presenta múltiples capas, y su degeneración es una de las principales causas de ceguera. El EPR es una capa unicelular ubicada entre los fotorreceptores y la capa vascular coroidea (2). La localización anatómica del EPR lo expone a daños potenciales relacionados con el estrés oxidativo, que compromete el equilibrio entre la señalización pro y antioxidante, e induce una desregulación de las redes funcionales que resulta en una discapacidad visual (69).

En el presente estudio, mostramos que el MC-hUCESCs regula al alza la expresión de una enzima de defensa contra el estrés oxidativo, como es HO-1. HO-1 cataliza la descomposición del hemo para liberar, entre otros, biliverdina que se reduce a bilirrubina, un potente eliminador de radicales. La expresión de HO-1 se ha establecido como un mecanismo de defensa contra el daño por estrés oxidativo y debido a sus efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antiapoptóticos, HO-1 proporciona una amplia protección tisular. En la retina, la mejora de la actividad de HO-1 ejerce efectos beneficiosos al proteger a las células del estrés oxidativo, promoviendo así la supervivencia celular (70). En este sentido, se está investigando cada vez más el papel de la enzima HO-1 en las enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares y en el trasplante de órganos, entre otras patologías (71).

Curiosamente, HO-1 es un gen diana de Nrf2 (72), que se conoce como un importante regulador de las respuestas oxidativas. La regulación de la vía Nrf2/HO-1 está implicada en muchos procesos que incluyen enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson o el accidente cerebrovascular isquémico (73) y, por lo tanto, se propone como una opción terapéutica para retardar la progresión y mejorar los síntomas de los trastornos neurodegenerativos o la neuroinflamación. Puede haber otros mecanismos, no estudiados en el presente trabajo, que estén involucrados en dicha protección, lo cual es una limitación de esta investigación.

La acumulación de agentes tóxicos, como ROS, rompe la homeostasis retiniana que puede derivar en ceguera. En este sentido, los dos lechos vasculares (redes capilares retinianas y coroideas), son responsables de la eliminación de desechos contribuyendo, entonces, a la eliminación de agentes tóxicos y al mantenimiento de la homeostasis del EPR. El mantenimiento correcto de la red vascular es esencial para la homeostasis del EPR; sin embargo, se producen cambios por envejecimiento en los vasos sanguíneos retinianos y coroideos. Las alteraciones relacionadas con la edad en la perfusión de los capilares, o en el intercambio de factores entre capilares y tejidos, podrían contribuir a la pérdida de funciones retinianas, incluida la pérdida de neuronas de las capas internas de la retina. Estos cambios incluyen una disminución del número de vasos alrededor de la fóvea, el engrosamiento y la hialinización de las paredes de los vasos, probablemente debido a la pérdida de celularidad en la pared del vaso (74). El aumento de grosor durante la senescencia puede perjudicar el intercambio de factores entre las luces capilares y los tejidos a los que sirven. Estos cambios están relacionados con la enfermedad vascular retiniana, como la oclusión de una rama de la vena retiniana y la retinopatía hipertensiva, así como con la isquemia retiniana externa secundaria a la insuficiencia vascular coroidea (74). En este sentido, las HUVEC tratadas con sobrenadante de células ARPE-19 tratadas con  $H_2O_2$  + MC-hUCESCs realizaron tubos de pared fina en comparación con el tratamiento sin MC-hUCESCs. Esto sugiere que el MC-hUCESCs podría contribuir a un mejor intercambio de factores, favoreciendo la protección de los tejidos en condición de estrés oxidativo. No se encontraron diferencias significativas entre HUVEC incubadas en medio de control (medio Vasculife) o incubadas en sobrenadante de ARPE-19 tratado con  $H_2O_2$  + MC-hUCESCs, lo que indica que el MC-hUCESCs, incluso después del daño oxidativo en el EPR, estableció condiciones para proteger el endotelio celular y por tanto, mantener una vascularización normal, similar a las condiciones fisiológicas. Además, el aumento en la longitud media de los vasos, en el número de uniones capilares y en el área media de los vasos cuando se incubaron HUVEC en sobrenadante de ARPE-19 tratado con  $H_2O_2$  + MC-hUCESCs, podría contrarrestar los cambios en los vasos asociados con el envejecimiento y condiciones patológicas relacionadas con el estrés oxidativo. En este sentido, el MC-hUCESCs induce una regulación positiva de VEGFA, PDGFA y PDGFB en células ARPE-19 en condiciones de estrés oxidativo, lo que permite la modulación de la angiogénesis. Los datos deben evaluarse en modelos animales correspondientes a cada enfermedad ocular, pero es de destacar que no se informó de vascularización anormal *in vivo* en ojos de ratas o conejos después de la administración de MC-hUCESCs (61,63). El medio condicionado está compuesto por un conjunto de moléculas secretadas por las CMM, que permite mantener o favorecer el restablecimiento de las condiciones fisiológicas, por lo que un solo factor o un pequeño conjunto de ellos no es el único responsable de sus efectos. Por todo ello, se acepta que el medio

condicionado es un fármaco en su conjunto, como se ha observado en varios ensayos clínicos, incluso en patologías oculares ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

En conclusión, nuestros resultados nos llevan a considerar que el MC-hUCESCs podría ser un buen candidato para futuros estudios en oftalmología basados en la terapia libre de células.

Es bien sabido que la inflamación y el estrés oxidativo juegan papeles esenciales durante la progresión de las enfermedades y se reconoce que la inflamación persistente y el estrés oxidativo son la base de varias enfermedades crónicas. Esto es relevante en la población que envejece, que pueden presentar enfermedades neurodegenerativas, glaucoma, uveítis y retinopatía diabética, entre otras, o en población joven, donde la enfermedad de Stargardt o la retinopatía del prematuro, son patologías que requieren intervenciones farmacológicas dirigidas a múltiples vías implicadas en estas enfermedades. El MC-hUCESCs ha demostrado tener diversos efectos terapéuticos como inmunorregulador, regenerativo, y ahora protector frente a la lesión por estrés oxidativo. Por tanto, consideramos que el presente trabajo abre la posibilidad de nuevos estudios en modelos animales para explorar el potencial interés del MC-hUCESCs en enfermedades neurodegenerativas, debido a su capacidad para proteger del daño por estrés oxidativo, para estimular genes antioxidantes y permitir una mejor vascularización.

## VII.CONCLUSIONES

1. El MC-hUCESCs aumenta la expresión de hemo oxigenasa-1, conocido por ser un importante regulador de las respuestas oxidativas y protector tisular.
2. La expresión de factores relacionados con la vascularización en las células ARPE-19, como el factor de crecimiento endotelial vascular A, la subunidad A del factor de crecimiento derivado de las plaquetas y la subunidad B de ese mismo factor, es aumentada en presencia del MC-hUCESCs en condiciones de estrés oxidativo.
3. El MC-hUCESCs induce un aumento en la longitud de los vasos, en el número de uniones capilares y en el área de los vasos en las HUVEC tratadas con el sobrenadante de ARPE-19 tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + MC-hUCESCs.

## BIBLIOGRAFÍA

1. [http://www.ite.educacion.es/formacion/materiales/129/cd/pdf/m1\\_dv.pdf](http://www.ite.educacion.es/formacion/materiales/129/cd/pdf/m1_dv.pdf)
2. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol. Rev.* 2005;85: 845-881.
3. Strauss O. Die Rolle des retinalen Pigmentepithels im Rahmen visueller Funktionen. *Der Ophthalmologe.* 2009;106:299-304.
4. Jensen SJK. Oxidative stress and free radicals. *J Mol Struct.* 2003;666-667:387-392.
5. Oduntant OA, Mashige KP. A review of the role of oxidative stress in the pathogenesis of eye disease. *South Africa Optometry.* 2011;70(4):191-199.
6. Dogru M, Wakamatsu T, Kojima T, Matsumoto Y, Kawatika T, Schnider CCO, Tsubota K. The role of oxidative stress and inflammation in dry eye disease. *Cornea.* 2009;28:S70-S74.
7. Shoham A, Hadziahmetovic M, Dunaief JL, Mydlarski MB, Schipper HM. Oxidative stress in the disease of the cornea. *Free Rad Biol Med.* 2008;45:1047-1055.
8. Kaur A, Gupta V, Christopher AF, Malik MA, Bansal P. Nutraceuticals in prevention of cataracts - an evidence based approach. *Saudi J Ophthalmol.* 2017;31(1):30-37.
9. Lou MF. Thiol regulation in the lens. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2000;16:137-148.
10. Izzotti A, Bagnis A, Saccà SC. The role of oxidative stress in glaucoma. *Mutat Res.* 2006;612:105-114.
11. Saccà SC, Izzotti A. Oxidative stress and glaucoma: injury in the anterior segment of the eye. *Prog Brain Res.* 2008;173:385-407.
12. Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bulletin of the World Health Organization.* 2004;82(11):884-851.
13. Carneiro A, Andrade JP. Nutritional and lifestyle interventions for Age-Related Macular Degeneration. *Oxidative medicine and cellular longevity.* 2017;2017:6469138.
14. Sánchez C, Rodeiro I, Garrido G, Delgado R. Hemo-Oxigenasa 1: Un Promisorio Blanco Terapéutico. *Acta Farm. Bonaerense.* 2005;24(4):619-626.
15. Alcaraz MJ, Fernández P, Guillén MI. Anti-inflammatory actions of the heme oxigenase-1 pathway. *Curr Pharm Des.* 2003;9(30):2541-2551.
16. Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:387-403.
17. Mejía O. La investigación con células troncales humanas embrionarias y adultas. El nacimiento de la medicina regenerativa. *Perspectivas científicas, implicaciones epistemológicas y dilemas bioéticos.* *Acta Med Colomb.* 2007;32:231-244.
18. Hernández P, Dorticós E. Medicina regenerativa: Células madre embrionarias y adultas. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 2004;20(3).

19. Guadix JA, Zugaza JL, Gálvez-Martín P. Características, aplicaciones y perspectivas de las células madre mesenquimales en terapia celular. *Med Clin*. 2017;148(9):408-414.
20. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315-317.
21. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-147.
22. Lakshminpathy U, Verfaillie C. Stem cell plasticity. *Blood Rev*. 2005;19:29-38.
23. Wei X, Yang X, Han ZP, Qu FF, Shao L, Shi YF. Mesenchymal stem cells: A new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin*. 2013;34:747-754.
24. Baks D, Song L, Tun RS. Adult mesenchymal stem cells: Characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cel Mol Med*. 2004;8:301-316.
25. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006;24:1294-1301.
26. Chamberlain G, Fox J, Asthon B, Middelton J. Concise review: Mesenchymal stem cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007;25 Suppl 11:2739-2749.
27. Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashammakhi N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen*. 2008;2:169-183.
28. Pojda Z, Machaj E, Zurzyk A, Mazur S, Debski T, Gilewicz J, et al. Mesenchymal stem cells. *Postepy Biochem*. 2013;59:187-197.
29. Menard C, Pacelli L, Bassi G, Dulong J, Bifari F, Bezier I, et al. Clinical-grade mesenchymal stromal cells produced under various good manufacturing practice processes differ in their immunomodulatory properties: Standardization of immune quality controls. *Stem Cells Dev*. 2013;22:1789-1801.
30. Trounson A, McDonald C. Stem cell therapies in clinical trials: Progress and challenges. *Cell Stem Cell*. 2015;17:11-s22.
31. Bieback K, Brinkmann I. Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy. *World J Stem Cells*. 2010;2:81-92.
32. Gálvez P, Clares B, Hmadcha A, Ruiz MA, Soria B. Development of a cell-based medicinal product: Regulatory structures in the European Union. *Br Med Bull*. 2013;105:85-105.
33. Meirelles L da S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009;20:419-427.

34. Jonas JB. Global prevalence of age-related macular degeneration. *Lancet Glob Health*. 2014;2(2):e65-66.
35. Klein R, Klein B, Jensen SC, Cruickshanks KJ. The relationship of ocular factors to the incidence and progression of age-related maculopathy. *Arch Ophthalmol*. 1998;116(4):506-513.
36. Chaves-Samaniego MJ, González-Andrades M. La terapia con células madre en la degeneración del epitelio pigmentario de la retina. *Actual. Med*. 2015;100(795):88-93.
37. Ramsden CM, Powner MB, Carr AJ, Smart M, da Cruz L, Coffery PJ. Stem cells in retinal regeneration: past, present and future. *Development*. 2013;140:2576-2585.
38. Wang S, Lu B, Girman S, Duan J, McFarland T, Zhang QS et al. Non-invasive stem cell therapy in a rat model for retinal degeneration and vascular pathology. *PLoS One*. 2010;5(2):e9200.
39. Vizoso FJ, Eiró N, Cid S, Schneider J, Pérez-Fernández R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci*. 2017;18(9):1852.
40. González-Merlo J. Recuerdo anatómico e histológico del aparato genital. En: González-Merlo J, González J, González E. *Ginecología*. 8ª edición. Barcelona: Masson; 2003. p.19-36.
41. Schneider J, Eiró N, Pérez-Fernández R, Martínez-Ordóñez A, Vizoso F. Human uterine cervical stromal stem cells (hUCESCs): why and how they exert their antitumor activity. *Cancer Genomics Proteomics*. 2016;13:331-337.
42. Eiró N, Fraile M, Schneider J, Vizoso FJ. Non pregnant human uterus as source of mesenchymal stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2018;13(6):423-431.
43. Mukhtar RA, Nseyo O, Campbell MJ, Esserman LJ. Tumor-associated macrophages in breast cancer as potential biomarkers for new treatments and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*. 2011;11:91-100.
44. Eiró N, Pidal I, Fernandez-Garcia B, Junquera S, Lamelas ML, del Casar JM et al. Impact of CD68/(CD3+CD20) ratio at the invasive front of primary tumors on distant metastasis development in breast cancer. *PLoS One*. 2012;7:e52796.
45. Pasero C, Barbarat B, Just-Landi S, Bernard A, Aurran-Schleinitz T, Rey J et al. A role for HVEM, but not lymphotoxin-beta receptor, in LIGHT-induced tumor cell death and chemokine production. *Eur J Immunol*. 2009;39:2502-2514.
46. Silver DF, Hempling RE, Piver MS, Repasky EA. Flt-3 ligand inhibits growth of human ovarian tumors engrafted in severe combined immunodeficient mice. *Gynecol Oncol*. 2000;77:377-382.

47. Eiró N, Saa J, Sendón-Lago J, Bermúdez MA, Cid S, Fraile M et al. Secretoma de las células madre mesenquimales del cérvix uterino: propiedades antitumorales, antiinflamatorias y regenerativas. "E-notas de Evaluación - Consejería de Sanidad del Principado de Asturias - Revista digital de divulgación y discusión científica. Recuperado 26 de enero de 2020, de <https://www.enotas.es/?resena-investigación=secretoma-de-las-celulas-madre-mesenquimales-del-cervix-uterino-propiedades-anti-tumorales-antiinflamatorias-y-regenerativas>.
48. Docheva D, Popov C, Mutschler W, Schieker M. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: Surface characteristics and the integrin system. *J. Cell. Mol. Med.* 2007;11:21-38.
49. Ruster B, Gottig S, Ludwig RJ, Bistrrian R, Muller S, Seifried E et al. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood.* 2006;108:3938-3944.
50. Jiang W, Ma A, Wang T, Han K, Liu Y, Zhang Y et al. Intravenous transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac performance after acute myocardial ischemia in female rats. *Transpl. Int.* 2006;19:570-580.
51. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Exp. Hematol.* 2000;28:875-884.
52. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol.* 2007;213(2):341-347.
53. Beer L, Mildner M, Ankersmit HJ. Cell secretome based drug substances in regenerative medicine: When regulatory affairs meet basic science. *Ann. Transl. Med.* 2017;5:170.
54. Vizoso FJ, Eiró N, Costa LA, Esparza P, Landin M, Díaz-Rodríguez P et al. Mesenchymal Stem Cells in Homeostasis and Systemic Diseases: Hypothesis, Evidences and Therapeutic Opportunities. *Int J Mol Sci.* 2019;20(15):3738.
55. Eiró N, Sendón-Lago J, Seoane S, Bermúdez MA, Lamelas ML, García-Caballero T et al. Potential therapeutic effect of the secretome from human uterine cervical stem cells against both cancer and stromal cells compared with adipose tissue stem cells. *Oncotarget.* 2014;5:10692-10708.
56. Marcos-Arias C, Mateo-Alesanco E, Eiró N, Vizoso F, Pérez-Fernández R, Eraso E et al. Antifungal activity of the human uterine cervical stem cells conditioned medium against medically important species of *Candida*. *Mycoses.* 2015;58:205-206.
57. Bermúdez MA, Sendón-Lago J, Eiró N, Treviño M, González F, Yebra-Pimentel E et al. Corneal epithelial wound healing and bactericidal effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56:983-992.
58. Yeo RW, Lai RC, Zhang B, Tan SS, Yin Y, Teh BJ et al. Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65:336-341.

59. Schneider J, Mateo E, Marcos-Arias C, Eiró N, Vizoso F, Pérez-Fernández R et al. Antifungal Activity of the Human Uterine Cervical Stem Cells Conditioned Medium (hUCESC-CM) Against *Candida albicans* and Other Medically Relevant Species of *Candida*. *Front Microbiol.* 2018;9:2818.
60. Javadi MA, Feizi S. Dry eye Syndrome. *J Ophthalmic Vis Res.* 2011;6(3):192-198.
61. Sendón-Lago J, Seoane S, Martínez-Ordóñez A, Eiró N, Saa J, Vizoso FJ et al. Corneal regeneration by conditioned medium of human uterine cervical stem cells is mediated by TIMP-1 and TIMP-2. *Exp Eye Res.* 2019;180:110-121.
62. Rothova A, van Veenendaal WG, Linssen A, Glasius E, Kijlstra A, de Jong PT. Clinical features of acute anterior uveitis. *Am J Ophthalmol.* 1987;103(2):137-145.
63. Bermúdez MA, Sendón-Lago J, Seoane S, Eiró N, González F, Saa J et al. Anti-inflammatory effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells in uveitis. *Exp Eye Res.* 2016;149: 84-92.
64. Lee RW, Dick AD. Current concepts and future directions in the pathogenesis and treatment of non-infectious intraocular inflammation. *Eye (Lond).* 2012;26(1):17-28.
65. Srivastava A, Rajappa M, Kaur J. Uveitis: mechanisms and recent advances in therapy. *Clin Chim Acta.* 2010;411:1165-1171.
66. Larson T, Nussenblatt RB, Sen HN. Emerging drugs for uveitis. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2011;16:309-322.
67. Rosenbaum JT, McDevitt HO, Guss RB, Egbert PR. Endotoxin-induced uveitis in rats as a model for human disease. *Nature.* 1980;286:611-613.
68. Tellman G. The E-Method: a highly accurate technique for gene-expression analysis. *Nature Methods.* 2006;3(7):i-ii.
69. Nishimura Y, Hara H, Kondo M, Hong S, Matsugi T. Oxidative Stress in Retinal Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:4076518.
70. Pittala V, Fidilio A, Lazzara F, Platania CBM, Salerno L, Foresti R et al. Effects of Novel Nitric Oxide-Releasing Molecules against Oxidative Stress on Retinal Pigmented Epithelial Cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:1420892.
71. Araujo JA, Zhang M, Yin F. Heme oxygenase-1, oxidation, inflammation, and atherosclerosis. *Front Pharmacol.* 2012;3:119.
72. Gu Z, Jiang J, Tan W, Xia Y, Cao H, Meng Y et al. p53/p21 pathway involved in mediating cellular senescence of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from systemic lupus erythematosus patients. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:134243.
73. Dinkova-Kostova AT, Kostov RV, Kazantsev AG. The role of Nrf2 signaling in counteracting neurodegenerative diseases. *FEBS J.* 2018;285(19):3576-3590.
74. Grossniklaus HE, Nickerson JM, Edelhauser HF, Bergman LA, Berglin L. Anatomic alterations in aging and age-related diseases of the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(14):ORSF23-27.