



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

Grado en Óptica y Optometría

MEMORIA TRABAJO FIN DE GRADO TITULADO

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD
NEUROPROTECTORA DE LAS CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES SOBRE NEURORRETINA**

Presentado por: Virginia Andrés Álvarez
Tutelado por: Prof. José Carlos Pastor Jimeno
Dr. Ricardo Usategui Martín
Tipo de TFG: Investigación

En Valladolid a, 24/05/2019

ÍNDICE

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. JUSTIFICACIÓN	1
1.2. HIPÓTESIS	1
1.3. OBJETIVOS	1
2. RETINA.....	2
2.1. ESTRUCTURA MACROSCÓPICA DE LA RETINA.....	2
2.2. ESTRUCTURA MICROSCÓPICA DE LA RETINA	3
2.3. PRINCIPALES ENFERMEDADES DE LA RETINA QUE CURSAN CON DEGENERACIÓN DE LOS FOTORRECEPTORES	5
2.3.1. DMAE	5
2.3.1.1. DMAE TEMPRANA.....	5
2.3.1.2. DMAE TARDÍA.....	5
2.3.2. RETINOSIS PIGMENTARIA	6
2.4. TERAPIAS AVANZADAS.....	7
2.4.1. TERAPIA CELULAR.....	7
2.5. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.....	7
2.5.1. PROPIEDADES PARACRINAS	8
3. MATERIAL Y MÉTODOS	9
3.1. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSV).....	9
3.2. CULTIVO ORGANOTÍPICO DE RETINA DE CERDO. PREPARACIÓN DE LOS EXPLANTES DE NEURORRETINAS PORCINAS Y PLACAS DE CULTIVO.....	9
3.3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	12
3.3.1. PROTOCOLO DE INCLUSIÓN EN PARAFINA	12
3.3.2. PROTOCOLO DE TINCIÓN CON H - E (HEMATOXILINA - EOSINA) EN EXPLANTES RETINIANOS INCLUIDOS EN PARAFINA	12
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	13
4. RESULTADOS.....	14
5. DISCUSIÓN	16
6. CONCLUSIONES.....	18
7. BIBLIOGRAFÍA	19

RESUMEN

Las enfermedades retinianas constituyen un grupo de patologías de gran impacto en la sociedad actual. En este momento no existe tratamiento para ellas, y las opciones de las que se disponen no suelen ser efectivas o no llegan a producir la completa recuperación. Una de las nuevas opciones terapéuticas es la terapia celular la cual podría permitir la sustitución de las células dañadas o la neuroprotección del tejido retiniano a partir de la secreción de factores paracrinicos con efecto protector.

El Grupo de Retina del Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA) de la Universidad de Valladolid ha desarrollado un modelo ex-vivo de neurodegeneración retiniana a partir de un cultivo organotípico de retina porcina para estudiar patologías neurodegenerativas de la retina.

Todo ello nos permitió establecer el objetivo, en el presente TFG, de evaluar la capacidad neuroprotectora que tienen las células madre mesenquimales sobre la capa de fotorreceptores (FR) de la neurorretina (NR) en degeneración.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. JUSTIFICACIÓN

Actualmente existe un gran número de personas afectadas por patologías degenerativas de la retina que cursan con degeneración de los FR como son la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) o la retinitis pigmentosa. Los tratamientos de los que se disponen no están siendo tan efectivos como se espera (1). Por este motivo surge la necesidad de investigar con otras vías de tratamiento, siendo una opción la terapia celular con células madre mesenquimales (MSC). Las propiedades regenerativas que presentan sobre modelos de degeneración retinal ex-vivo, su capacidad de secreción de sustancias paracrinas, su comprobada bioseguridad en la aplicación sobre modelos animales in-vivo, y su naturaleza libre de dilemas éticos, hacen de ellas una avanzada alternativa en la terapéutica de enfermedades degenerativas retinianas (1).

Por todo ello en el presente trabajo se planteó el objetivo de comprobar la capacidad neuroprotectora de las MSC sobre la capa de FR de la retina.

1.2. HIPÓTESIS

Las MSC secretan factores paracrinicos con propiedades neuroprotectoras que podrían retrasar la degeneración de los FR de NR porcinas en degeneración.

1.3. OBJETIVOS

Se plantea desarrollar un modelo de cultivo organotípico de NR porcina para profundizar en los procesos de degeneración retiniana que ocurren en ciertas patologías que cursan con degeneración de los FR

El objetivo general es evaluar y calificar in vitro el potencial neuroprotector que tienen las MSC sobre los FR, observando las modificaciones celulares y estructurales que ocurren en ellos.

Objetivos específicos:

Comparar los cambios morfológicos que se producen en los FR de los cultivos celulares de NR porcinas en presencia y ausencia de MSC.

2. RETINA

La retina humana es un tejido ocular fotosensorial muy complejo cuya estructura está altamente organizada, a su vez, por medio del sistema óptico recibe la imagen visual, convirtiendo así la energía luminosa captada en señal eléctrica para después transmitirse a través del nervio óptico a la corteza visual, lugar donde se distinguen las propiedades estructurales (contraste, forma y color) y espaciales (movimiento, posición y profundidad) (2).

Se caracteriza por ser una lámina delgada, semitransparente que está en contacto con la cara interna de la coroides y con el humor vítreo, tiene diferentes capas de tejido neural interconectadas mediante sinapsis, que cubre la cara interna de dos tercios de la pared posterior del globo ocular (3).

Según la anatomía del ojo, el globo ocular se puede diferenciar en dos partes. El segmento anterior que es la tercera parte frontal del globo ocular, formada por la cámara anterior (conjuntiva, esclera, córnea, humor acuoso, iris y pupila) y la cámara posterior (cuerpo ciliar, cristalino y ligamento suspensorio del cristalino) (4) y el segmento posterior parte de la retina que recibe los impulsos luminosos y los transforma en impulsos nerviosos, formada por el humor vítreo, la coroides, la papila o nervio óptico, la mácula y la fovea (figura 1) (5).

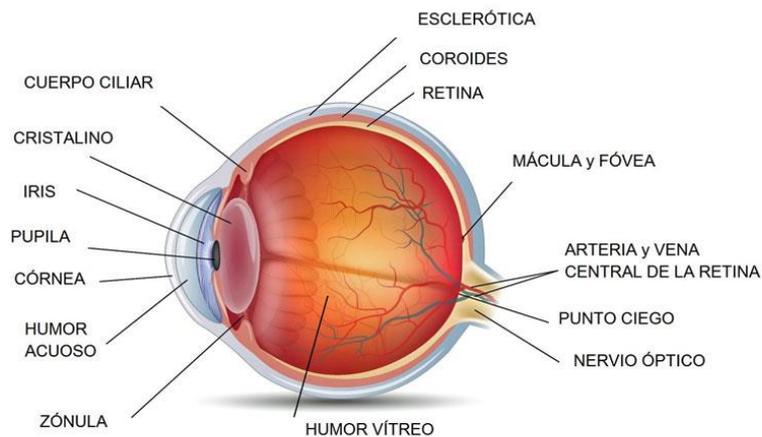


Figura 1. Estructura del globo ocular. <https://www.vissum.com/macula-zona-vital-retina/>

2.1. ESTRUCTURA MACROSCÓPICA DE LA RETINA

Es la parte del ojo sensible a la luz, encargada de la función receptora e integradora de las imágenes que recibe (figura 2). Su distribución en el fondo de ojo es la siguiente: (1)

Papila o disco óptico: cabeza del nervio óptico, situado unos 3-4 mm de la mácula, lugar de salida de los cuerpos neuronales de las neuronas hacia el cerebro. No posee ningún FR (ni conos, ni bastones) por lo que carece de

Andrés V. Evaluación de la capacidad neuroprotectora de las células madre mesenquimales sobre neuroretina

sensibilidad a los estímulos luminosos, ello causa una zona ciega dentro del campo visual que se conoce como punto ciego (figura 2) (5)(6).

Mácula: zona central de la retina encargada de la visión central, caracterizada por ser una visión fina de los detalles de las cosas. Únicamente existen un tipo de FR en esta zona, los conos, hay ausencia de bastones (figura 2) (7).

Fóvea: se encuentra en el centro de la mácula de color más oscuro debido a la ausencia de vascularización, proporciona la visión de más alta resolución cromática y precisión debido a su elevada concentración de conos y ausencia de bastones al igual que en la mácula, pero su concentración aumenta hacia la periférica de la retina (figura 2) (5)(8).

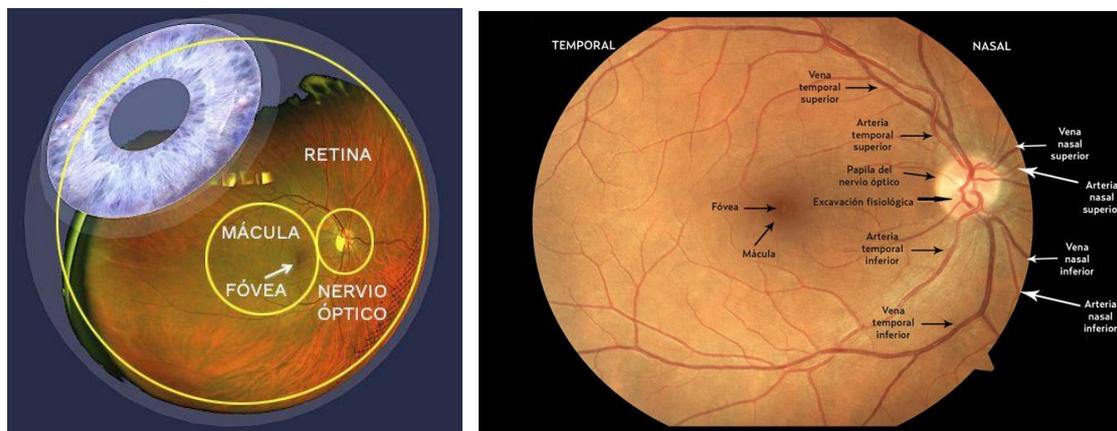


Figura 2. Estructura macroscópica de la retina. <http://www.doctordiegoruizcasas.com/anatomia-globo-ocular/retina.html> Fondo de ojo (OD) http://amf-semfyc.com/web/article_ver.php?id=1016

2.2. ESTRUCTURA MICROSCÓPICA DE LA RETINA

La retina es una fina capa de aproximadamente 250 μm que se divide en diez capas, estando todas conectadas mediante sinapsis para que se produzca la visión (7). A continuación se resumen las capas de la retina (figura 3).

Epitelio pigmentario (EPR): monocapa de células hexagonales pigmentadas (gránulos de melanina que absorben la energía de la luz que llega a la retina) unido a la membrana de Bruch que permite separar la coroides de retina neurosensorial (9).

Capa de los FR: se encuentran los conos y los bastones, células encargadas de realizar la conversión de la luz en impulsos nerviosos para que el cerebro lo transforme en imágenes (10). Los conos son los encargados de los detalles finos, de la visión diurna y del color, los bastones son los encargados del movimiento, las formas y de la visión en condiciones de baja luminosidad (11)(12).

Andrés V. Evaluación de la capacidad neuroprotectora de las células madre mesenquimales sobre neuroretina

Capa limitante externa: región de zonas adherentes entre las células de Müller y los FR (13).

Capa nuclear externa (ONL): capa donde se localizan los núcleos celulares de los FR (13).

Capa plexiforme externa (OPL): región de conexión sináptica entre los FR y las células bipolares y las horizontales. Se detectan contrastes débiles o cambios en intensidad de la luz (14).

Capa nuclear interna (INL): capa donde se localizan los núcleos de las células bipolares, horizontales, amacrinas, interplexiformes y de Müller (13).

Capa plexiforme interna (IPL): capa donde hacen sinapsis las células bipolares con las células ganglionares y amacrinas (15).

Capa de células ganglionares (GCL): capa donde se localizan los núcleos de las células ganglionares y amacrinas, su función es distinguir y seleccionar la información visual que se transmite al cerebro (16).

Capa de las fibras nerviosas: compuesta por los axones de las células ganglionares y astrocitos que forman el nervio óptico (13).

Membrana limitante interna: membrana muy fina encargada de separar las fibras nerviosas del humor vítreo (13).

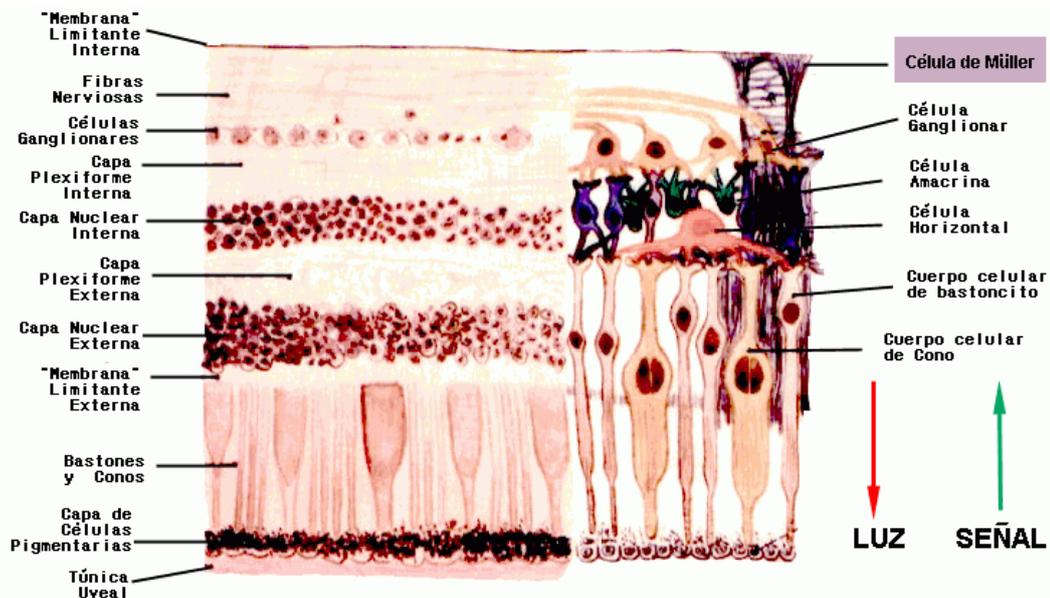


Figura 3. Estructura microscópica de la retina

<http://glia.freeshell.org/medicina/celulas/muller.php>

2.3. PRINCIPALES ENFERMEDADES DE LA RETINA QUE CURSAN CON DEGENERACIÓN DE LOS FOTORRECEPTORES

2.3.1. DMAE

Causa principal de ceguera irreversible en el mundo desarrollado afectando a personas de más de 55 años de edad. Es una enfermedad progresiva multifactorial compleja, que se caracteriza por una pérdida progresiva de la visión central que conlleva a la ceguera, consecuencia de la atrofia de la mácula, provocada por la degeneración de las distintas capas de la NR con la muerte y pérdida de los FR y atrofia del EPR (17).

Existe una predisposición genética, factores ambientales (tabaco, luz ultravioleta...), factores nutricionales (baja cantidad de antioxidantes) y factores oculares (colores de iris claros y cirugías de cataratas) para esta patología (17).

La DMAE se puede clasificar en temprana y tardía. Esta última, se subdivide en atrofia geográfica o DMAE seca; y en enfermedad neovascular o DMAE húmeda o exudativa (17).

2.3.1.1. DMAE TEMPRANA

Se caracteriza por presentar gránulos, cambios pigmentarios o atrofia del epitelio pigmentado retiniano. Los gránulos o drusas, son depósitos extracelulares de color amarillo y de tamaño medio-grande localizados en la interfase entre el EPR y la membrana de Bruch. Las drusas se generan debido al mal funcionamiento del EPR, que no es capaz de eliminar el material tras la fagocitosis de los FR (17).

2.3.1.2. DMAE TARDÍA

Se subdivide en dos tipos:

DMAE SECA O ATRÓFICA: forma más frecuente, supone el 90% de casos de DMAE. Es de evolución lenta y bilateral, se manifiesta con atrofia y pérdida del EPR y de los FR, que permiten visualización directa de los vasos coroidales subsuperficiales. Las drusas que aparecen debidas al mal funcionamiento del EPR son de reducido tamaño, de color amarillo y se encuentran bien separadas unas de otras (figura 6A) (17).

DMAE HÚMEDA O EXUDATIVA: supone solamente el 10% de casos de DMAE. Aparece de forma brusca, dando lugar a una pérdida repentina de la visión. Se caracteriza por el desarrollo de neovascularización coroidal o desprendimiento del epitelio pigmentado retiniano seroso desarrollándose debajo de la mácula produciendo hemorragias. Estos vasos sanguíneos pierden líquido y sangre, causando una cicatrización de la mácula, destruyendo las estructuras que la componen produciendo un escotoma absoluto (figura 6B) (17).

Andrés V. Evaluación de la capacidad neuroprotectora de las células madre mesenquimales sobre neuroretina

Actualmente no existe tratamiento para la DMAE seca, solamente hay tratamiento para la DMAE húmeda consistente en la terapia fotodinámica y en el uso de fármacos antiangiogénicos.



Figura 6. A) DMAE seca, se observan drusas. **B)** DMAE húmeda, se observan drusas y hemorragias. <http://genteconvista.extranet.dsicom.es/ficha.aspx?id=8>

2.3.2. RETINOSIS PIGMENTARIA

La retinosis pigmentaria o distrofia de conos y bastones, es una patología hereditaria degenerativa bilateral y simétrica caracterizada por la pérdida lenta y progresiva de la visión por la destrucción gradual de los FR. Principalmente afecta a los bastones, el problema es que éstos generan señales que son necesarios para la supervivencia de los conos, por lo que finalmente se daña todo el EPR y la retina (figura 7) (7).

Afecta aproximadamente a 1 de cada 4.000 nacidos vivos, y comienza entre la primera y tercera década de la vida, siendo más frecuente en varones (60%) que en mujeres (40%) (18). Los modos de herencia pueden ser autosómico dominante, autosómico recesivo o recesiva ligada al cromosoma X. Actualmente no existe tratamiento para la retinosis pigmentaria (17).

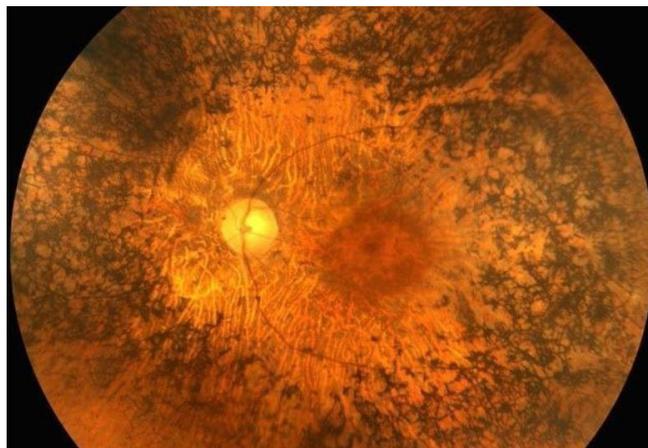


Figura 7. Distrofia de los FR a nivel de la periferia.

<http://www.centrooftalmologicocarballino.com/noticias/36/retinosis-pigmentaria-rp>

2.4. TERAPIAS AVANZADAS

Según la definición de la European Medicines Agency (EMA), las terapias avanzadas son medicamentos para uso humano basados en genes, tejidos o células, los cuales constituyen nuevas estrategias terapéuticas ofrecen oportunidades para algunas enfermedades que hasta el momento carecen de tratamientos eficaces (19).

Se pueden clasificar en tres tipos diferentes.

Medicamentos de terapia génica: ácido nucleico recombinante, utilizado en seres humanos para tratar varias enfermedades a partir de un efecto terapéutico, profiláctico o diagnóstico (19).

Medicamentos de terapia celular: células o tejidos que se han manipulado cambiando sus características biológicas, o células o tejidos que no están destinados a realizar las mismas funciones esenciales en el cuerpo del receptor y del donante. Su finalidad es tratar, prevenir o diagnosticar una enfermedad mediante fármacos, inmunología o metabolismo de estas células (19).

Medicamentos de ingeniería tisular: células o tejidos que sean manipulado para que puedan usarse para reparar, regenerar o reemplazar tejido humano (19).

Las principales terapias avanzadas que se están utilizando para tratar enfermedades degenerativas de la retina en la actualidad, son la terapia celular y la ingeniería tisular, fundamentalmente mediante la utilización de MSC (20).

2.4.1. TERAPIA CELULAR

Se fundamenta en la utilización de células somáticas vivas en seres humanos, pueden ser autólogas (procedentes del propio paciente), alogénicas (de otro ser humano) o xenogénicas (de animales). Las características biológicas de estas células han sido manipuladas para obtener un efecto terapéutico, diagnóstico o preventivo, para hacer uso de ellos por medios metabólicos, farmacológicos o inmunológicos (21).

Una de las terapias avanzadas que está siendo muy utilizado en áreas de investigación son las terapias con MSC.

2.5. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Las MSC se definen como células multipotenciales y adultas con capacidad de autorenovación y con morfología fibroblastoide y docilidad hacia diversos linajes celulares como condrocitos, osteocitos y adipocitos entre otros. Se pueden obtener aisladas principalmente de médula ósea, sangre de cordón umbilical y tejido adiposo de donde se han logrado establecer cultivos los cuales han permitido estudiar sus propiedades funcionales y fenotípicas (22).

Andrés V. Evaluación de la capacidad neuroprotectora de las células madre mesenquimales sobre neurorretina

A su vez las MSC ejercen un efecto inhibitorio tanto in vivo como in vitro sobre la proliferación de los linfocitos T, y muestran efectos similares sobre las células B, las células dendríticas y las células natural killer (23)(24).

Las MSC presentan dos propiedades de importancia clínica en la terapéutica neurorregenerativa: la capacidad de reemplazar células dañadas y la neuroprotección por sus propiedades paracrinas (22).

2.5.1. PROPIEDADES PARACRINAS

Las MSC secretan factores como las citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, y factores neurotróficos, los cuales tienen gran potencial terapéutico y de neuroprotección (25).

Estos factores juegan un papel muy importante en la regeneración y la reparación de tejidos, inhibición de fibrosis y apoptosis, fomento de la angiogénesis, estimulación endógena de reclutamiento de células madre y proliferación (25).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSV)

Las MSC que se utilizaron en este proyecto de investigación son las MSV (Mesenchymal Stem from Valladolid). Son células madre mesenquimales que proceden de médula ósea de donantes humanos, criopreservadas y reexpandidas estando aprobadas por la AEMPS bajo el número de PEI 15-007 para su uso autólogo y alogénico.

El proceso de producción de MSV se realizó por especialistas altamente cualificados en cultivos celulares en las instalaciones de la Unidad de Producción Celular (UPC) del IBGM, realizándose pruebas para garantizar la asepsia del proceso. Estos controles de calidad confirman la ausencia de contaminación.

El Instituto de Biología y Genética Molecular de la UVa (IBGM) proporcionó células MSV frescas 1×10^6 cels/ml, siendo utilizadas de la siguiente manera:

Se recibieron 1×10^6 cels contenidas en 1ml de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco®, Paysley, Reino Unido) suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina y 10% de SFB.

Se procedió a su contaje y se determinó su viabilidad mediante el empleo del ensayo del Tripán Azul (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU).

Bajo una campana de flujo laminar (Faster-BHN, 2004, Cultek, Madrid, España) se resuspendieron las células en 10 ml de medio DMEM suplementado con 1% de antibiótico y 10% de SFB.

Finalmente se sembraron 30.000 células contenidas en 1,5 ml de medio, en cada pocillo de las placas de cultivo Transwell® y se mantuvieron en incubadora a 37°C y 5% de CO₂ durante 72 horas antes de iniciar el co-cultivo con las NR.

3.2. CULTIVO ORGANOTÍPICO DE RETINA DE CERDO. PREPARACIÓN DE LOS EXPLANTES DE NEURORRETINAS PORCINAS Y PLACAS DE CULTIVO

Para poder desarrollar y evaluar esta investigación, se utilizó un cultivo organotípico de retina porcina. Se procedió a utilizar tres globos oculares extraídos de cerdos, comprendidos entre 6 y 8 meses de edad, procedentes del matadero Justino Gutiérrez S.L. localizado en la localidad de Laguna de Duero, Valladolid (España).

Los ojos se recogieron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco®, Paysley, Reino Unido) suplementado con 10% de antibióticos/antimicóticos (100 U/ml de Penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 2,5 µg/ml de anfotericina B, Gibco®, Invitrogen, Paisley, UK), todo ello para reducir el riesgo de contaminación.

Andrés V. Evaluación de la capacidad neuroprotectora de las células madre mesenquimales sobre neuroretina

Los ojos fueron trasladados al laboratorio de cultivos celulares del IOBA siguiendo el mantenimiento de refrigeración, donde se procedió con el protocolo de extracción de los explantes de NR y la preparación del cultivo. El tiempo transcurrido entre la muerte del animal/enucleación de los ojos hasta su procesamiento en el laboratorio no debe superar las 2 horas, con la finalidad de reducir la degeneración precoz de las células retinianas.

Para aislar la NR se procedió de la siguiente manera:

Se colocó el globo ocular en una placa de Petri (90 mm; Corning, NY, EE. UU.) con Betadine® (MEDA Pharma S.A., Madrid, España) y se desecharon los restos de tejidos extraoculares que no son necesarios para dicho procedimiento como los párpados, la conjuntiva, la capsula de Tenon, los músculos oculares y la grasa orbitaria (figura 8).

Bajo una campana de flujo laminar (Faster-BHN, 2004, Cultek, Madrid, España) se limpió cada globo ocular en Betadine® durante 2 minutos, etanol 70% durante 2 min y DMEM suplementado con 10% de antibiótico/antimicótico con tres lavados de 5 minutos.

Se dispuso el globo ocular en una placa de Petri con medio DMEM suplementado con un 10% de antibiótico/antimicótico y se perforó el globo ocular con una aguja estéril de 22G, a través de la esclera y al nivel de la ora serrata, para realizar un ojal por el que se puedan introducir unas tijeras corneales para permitir la disección del globo ocular en segmento anterior y segmento posterior (figura 8).

Se retiró el segmento anterior por el método de tracción, arrastrando con él al vítreo. En algunos casos puede ser necesaria la ayuda de un bastoncillo de algodón estéril para eliminar los restos de vítreo fuertemente adheridos a la retina periférica (figura 8).

Se colocó el segmento posterior en una placa de Petri con medio DMEM suplementado con 10% de antibiótico/antimicótico limpios.

Se procedió a realizar un desprendimiento mecánico de la retina neural con la ayuda de un pincel y mediante el paso de medio de cultivo DMEM entre la NR y el EPR, con el fin de reducir el posible daño mecánico por la manipulación directa de la retina y los tiempos de manipulación retiniana (figura 8).

Se identificó el área centralis y recortamos dos explantes cuadrados y adyacentes de 5x5 mm, aproximadamente 1 mm por encima del nervio óptico, para evitar la presencia de vasos visibles y de bordes irregulares (figura 8). Para ello, se emplean unas tijeras de Vannas (John Weiss International, Milton Keynes, Reino Unido) unos pinceles y una espátula metálica de bordes romos de 4x4 mm.

Depositamos los explantes sobre la espátula metálica, con ayuda de unos pinceles, y los colocamos sobre la membrana de los pocillos de las placas

Andrés V. Evaluación de la capacidad neuroprotectora de las células madre mesenquimales sobre neurorretina

de cultivo Transwell® (Pore polycarbonate membrane insert, 0.4 µm de poro, 24 mm de diámetro; Corning Inc., Corning, NY, EE.UU.) (figura 8) para que la capa de FR quede en contacto con ésta y no se formen pliegues en los explantes, con el fin de conseguir un contacto apropiado con la membrana.

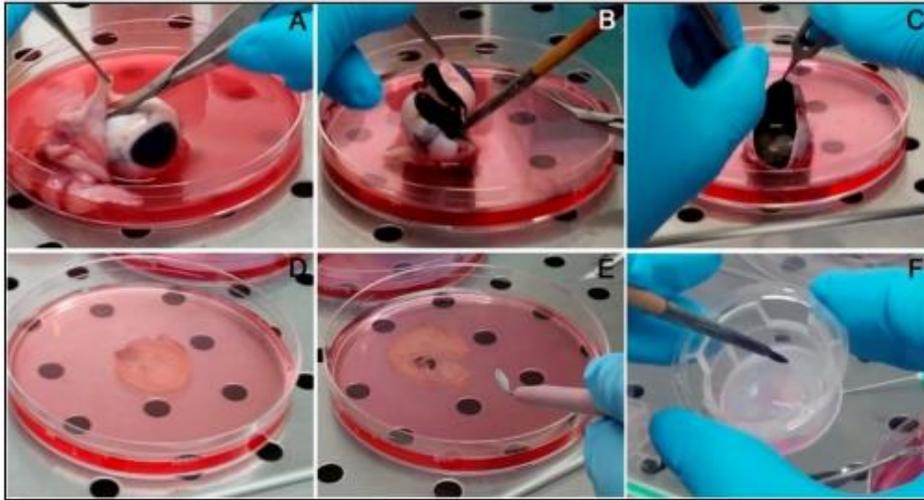


Figura 8. Preparación de los explantes de NR porcina. A) Deshecho de los restos de tejidos extraoculares. B) Separación de segmento anterior del segmento posterior y separación del vítreo. C) Separación de la NR con ayuda de un pincel. D) Retina completamente desprendida. E) Área centralis y corte de los explantes de NR F) Colocación de los explantes sobre la membrana Transwell®.

Se utilizaron 2 placas Transwell® distribuidas como se muestra en la figura 9.

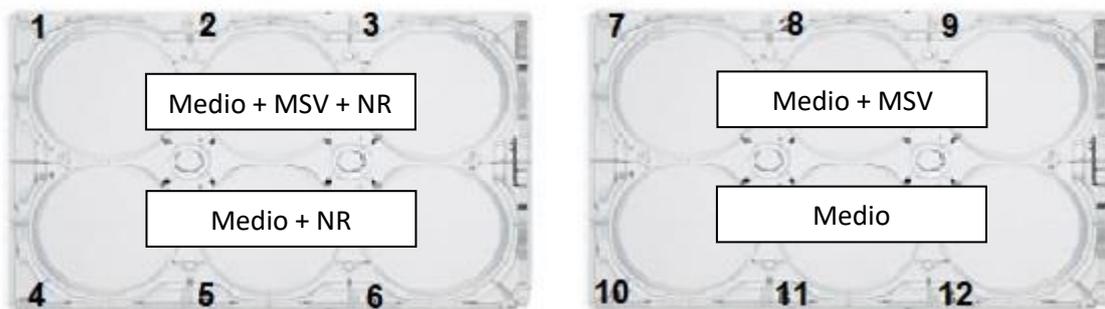


Figura 9. Organización de los explantes en las placas de cultivo transwell®. (NR: Neurorretina; MSV: Mesenchymal stem from Valladolid).

Finalmente, los explantes retinianos co-cultivados con MSV en los pocillos 1, 2 y 3 se definieron como NR experimento y los explantes retinianos cultivados sin MSV en los pocillos 4, 5 y 6 se definieron como NR control.

3.3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Una vez finalizado el experimento se retiraron los pocillos de cultivo y el explante de NR adherido a la membrana, y se recortó la membrana delimitando así el explante.

Seguidamente, los explantes de retina fueron procesados en inclusión en parafina, y posteriormente se evaluó mediante tinción de hematoxilina-eosina. El procedimiento es el siguiente:

3.3.1 PROTOCOLO DE INCLUSIÓN EN PARAFINA

Se introdujo el explante en un tubo de 1,5 ml (Eppendorf, Corning, NY, EE. UU.) con paraformaldehído al 4% (PF; PANREAC Química S.A.U., Barcelona, España) durante 2 horas a 4°C.

Se retiró el paraformaldehído y se lavó 2 veces con 1,5 ml de Phosphate Buffer Saline (PBS, Gibco, Invitrogen, Paisley, UK), después se realizó la inclusión de las muestras en parafina (Paraplast Plus®, Leica Biosystems, Nussloch, Alemania), durante 90 minutos en un procesador de tejidos (ASP300; LEICA, Nussloch, Alemania).

Se realizó el bloque de parafina en un sistema de consolas (TISSUE TEK®Olympus Iberia, Barcelona, España).

Finalmente, se realizaron en el bloque cortes no seriados de 4µm en un microtomo (RM2145; LEICA, Minnesota, EE.UU.).

3.3.2. PROTOCOLO DE TINCIÓN CON H - E (HEMATOXILINA - EOSINA) EN EXPLANTES RETINIANOS INCLUIDOS EN PARAFINA

Para poder realizar un correcto estudio histológico y evaluar las modificaciones de los explantes de NR tras la finalización del experimento, se llevó a cabo la tinción con h-e mediante el siguiente protocolo:

Primero, se desparafinaron los cortes retinianos con Xilol (Sigma-Aldrich) 3 veces/5 minutos y después se hidrataron con concentraciones decrecientes de alcohol 100°, 96° y 80° durante 5 minutos cada uno y agua destilada 2 veces/5 minutos.

Seguidamente, se tiñeron los portas con Hematoxilina de Mayer durante 5 minutos (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU) y se lavaron con agua durante 5 minutos.

A continuación, se tiñeron los portas con Eosina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU) durante 5 minutos, se lavaron con agua durante 5 minutos, y se deshidrataron con concentraciones crecientes de alcohol 80° y 96° durante 2 minutos, y alcohol 100° durante 5 minutos.

Finalmente, se aclararon con xilol 3 veces/5 minutos y se cubrieron con un cubreobjetos.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos obtenidos se recogieron en un cuaderno de laboratorio en papel y fueron trasladados a una hoja Excel (Microsoft Excel 2018®). Los datos representados en esta parte del trabajo corresponden con la media de los resultados obtenidos en los diferentes experimentos realizados \pm la desviación estándar y fueron analizados con el programa SPSS (versión 24.0, SPSS, Inc., Chicago, IL, EE.UU.). Los valores $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

4. RESULTADOS

Los resultados obtenidos se recogen en la figura 10. En el panel superior de la figura 10 se muestran las fotos de las muestras de NR teñidas con h-e en las diferentes condiciones experimentales. En el panel inferior de la figura 10 se muestra tanto la cuantificación del grosor como del número de núcleos de cada una de las capas retinianas.

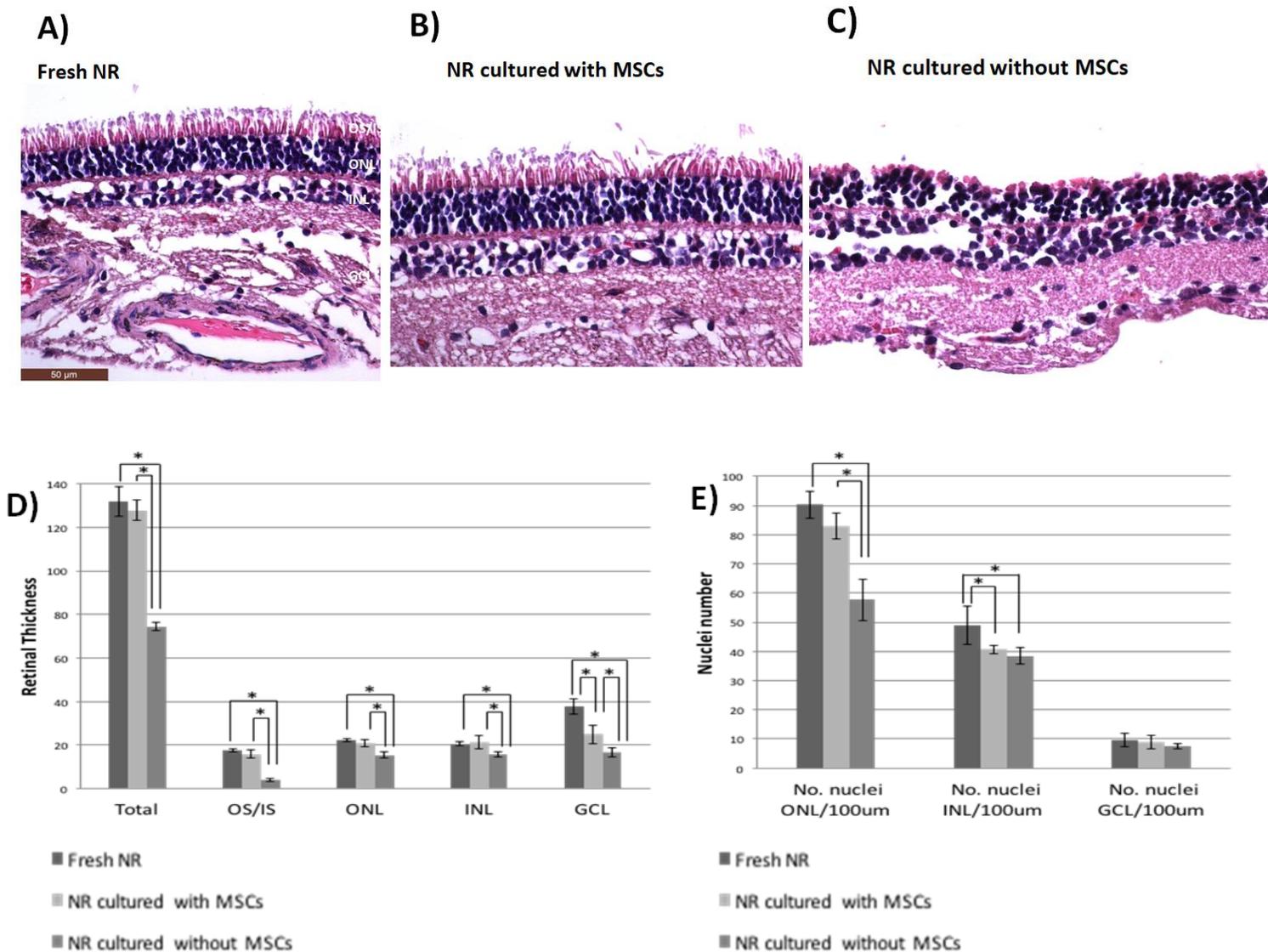


Figura 10. **A.** Explante retiniano en fresco donde se observan las capas y el grosor retiniano previo al inicio del cultivo. **B.** Explante retiniano control donde se observa una conservación de la mayor parte de los IS y OS de los FR, **C.** Explante retiniano cultivado sin MSV, se observa degeneración retiniana y pérdida de los IS y OS de los FR. Barra de escala: 50µm. **D.** Grosor retiniano total y por capas retinianas de los explantes retinianos control, experimento (co-cultivo con MSV) y NR cultivada sin MSV. **E.** Número de núcleos celulares/100 µm en las capas ONL, INL y GCL.

Nuestros resultados mostraron como las NR frescas presentaban una correcta preservación de la estructura retiniana (figura 10.A), por lo que se observó una adecuada conservación de los OS e IS de los FR, se diferenciaron las capas neuroretinianas ONL, OPL, INL, IPL y GCL. Se anotó que las muestras frescas de NR tenían un grosor retiniano total de 130 μm (Figura 10.D).

Por otra parte, se observó como las muestras de NR porcina mantenidas en cultivo durante 3 días con células MSV presentaron una preservación de la mayor parte de la estructura retiniana y, se observó una adecuada conservación de los OS e IS de los FR, aunque algo menor que en la muestra fresca de NR (figura 10.B). Se observó que el grosor retiniano total fue menor comparándolo con el observado en las muestras frescas de NR, siendo de 125 μm . Sin haber diferencias estadísticamente significativas respecto a la retina control (la NR fresca).

Finalmente, el estudio de las NR que estuvieron en cultivo durante 3 días sin células madre nos mostró una degeneración de la estructura retiniana, con una degradación de los FR, tanto del OS como del IS (figura 10C). Se observó un gran deterioro en el grosor retiniano total comparado con las muestras frescas de NR y las muestras co-cultivadas con MSV, presentando un grosor de 75 μm (figura 10D). También se observó que había mayor espesor de la ONL en NR fresca que en NR cultivada sin MSV, 22 μm frente 16 μm , y mayor espesor en NR co-cultivada con MSV que en NR cultivada sin MSV, 20 μm frente 16 μm (figura 10D).

Respecto a la INL se observó una disminución del su espesor en NR cultivada sin MSV comparada con NR frescas, 16 μm frente 19 μm , y un mayor espesor en NR co-cultivada con MSV que en NR cultivada sin MSV, 21 μm frente 16 μm (figura 10D).

Se observó a su vez la GCL, donde estadísticamente hay una gran disminución de su espesor en NR cultivada sin MSV comparado con NR frescas y NR co-cultivadas con MSV, 17 μm frente 48 μm y 23 μm respectivamente (figura 10D).

Al observar la cantidad de núcleos celulares que hay por cada 100 μm en las capas nuclear externa, nuclear interna y capa de las células ganglionares se encontraron las diferencias que se detallan a continuación.

En la ONL se observó una gran diferencia entre las muestras de NR frescas y las muestras de NR cultivadas sin MSV, siendo de 90 núcleos celulares/100 μm frente a 56 núcleos celulares/100 μm respectivamente, y de 82 núcleos celulares/100 μm contados en NR co-cultivada con MSV frente a la cantidad menor de las muestras de NR cultivada sin MSV (figura 10E).

En la INL se observó disparidad entre las muestras de NR frescas y las muestras de NR cultivadas sin MSV, siendo de 59 núcleos celulares/100 μm frente a 38 núcleos celulares/100 μm respectivamente.

5. DISCUSIÓN

Las patologías retinianas degenerativas como la DMAE o la retinosis pigmentaria, son patologías con una prevalencia en aumento y que a día de hoy no tienen tratamientos efectivos. Por ello es necesario profundizar en los mecanismos fisiopatológicos de estos procesos con el objetivo de alcanzar tratamientos que sean realmente efectivos y así mejorar la calidad de vida de los pacientes (26)(27). En este sentido una de las opciones terapéuticas más prometedoras es la terapia celular, la cual se define como el proceso de restauración de un tejido dañado a partir de nuevas células para poder tratar una patología.

Por esta razón, nos planteamos el objetivo de estudiar si el co-cultivo de células madre mesenquimales (MSV, PEI 15-007) con NR porcinas, podría ralentizar la degeneración de la capa de FR. Para ello nos basamos en un cultivo organotípico de retina porcina. Los cultivos organotípicos permiten manipular los comportamientos celulares mediante la adición de sustancia externas (fármacos, factores de crecimiento...), aunque pierden las interacciones celulares que caracterizan a la retina, es decir, no son capaces de simular los procesos celulares que suceden in vivo. Si no que son modelos de degeneración retiniana (28)(29).

Es decir, los cultivos organotípicos de retina tienen la ventaja de ser una herramienta útil para reproducir las dinámicas fisiológicas y patológicas de las células de la retina en degeneración (29).

Por todo ello se decidió realizar el estudio con un cultivo organotípico de NR como modelo experimental in-vitro. Se optó como modelo de este trabajo los ojos porcinos puesto que son muy similares a los del ser humano (tamaño del globo ocular, grosor, rigidez escleral y estructura retiniana). En la retina de cerdo no existe una verdadera mácula, pero si es posible identificar un área horizontal con una elevada densidad de FR, que atraviesa la retina y se localiza superiormente al nervio óptico, se denomina área centralis. Por esta razón, los explantes de NR se obtuvieron de dicha zona (28).

Respecto a los resultados del estudio histológico de las NR porcinas, se pudo observar que los hallazgos más notables fueron la pérdida de la mayor parte de los OS/IS de los FR, y la disminución del grosor de las ONL/INL en los explantes de las muestras cultivadas sin MSV frente a los explantes de las muestras co-cultivadas con MSV.

Actualmente, los cultivos organotípicos de retina se están utilizando en diversos estudios para ampliar los conocimientos sobre las patologías retinianas. El grupo de Retina del IOBA-Uva empleó este modelo para estudiar procesos inflamatorios, procesos de cicatrización retiniana, para estudiar la toxicidad de los perfluoro-octanos, entre otras aplicaciones (30)(31)(32).

Se han publicado numerosos trabajos en revistas internacionales de impacto donde se destaca el uso de los modelos organotípicos de retina para evaluar la degeneración de las RGC (Retinal Gaglian Cells) (33), puesto que los explantes de retina requieren de una axotomía completa de las RGC, siendo un proceso que conlleva a la muerte de estas células por la degeneración retrógrada en modelos in vivo (34). De esta forma, como hay una pérdida progresiva de las RGC en los explantes de retina, se utiliza como

Andrés V. Evaluación de la capacidad neuroprotectora de las células madre mesenquimales sobre neuroretina

modelo in-vitro para evaluar cambios que suceden en otras enfermedades degenerativas como son la neuropatía óptica anterior no arterítica (NOIANA), traumatismos o glaucoma. (33)

A partir de los resultados de estos estudios se han podido describir varios factores neurotróficos secretados por las MSC cuando están en contacto con las NR. Factores neurotróficos que están implicados en procesos de migración neuronal, diferenciación y supervivencia, así como con el crecimiento de las fibras nerviosas (35). Algunos de los factores neuroprotectores que se han descrito han sido el BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) que es una proteína que actúa como factor de crecimiento, la cual es codificada por el gen BDNF (36)(37).

También se ha descrito el CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor) que pertenece a la familia de las citoquinas neuropoyéticas, ha demostrado un aumento de la supervivencia de las RGC en modelos murinos de degeneración retiniana mediante la transducción y la activación de la vía de la transcriptasa 3 (STAT3), y ha promovido la regeneración de los OS de los conos (38)(39).

Nuestro experimento consistió en realizar un estudio a partir de un cultivo organotípico de NR porcina co-cultivado con MSV. Los resultados obtenidos nos mostraron una conservación de la capa de los FR, lo cual puede ser consecuencia del efecto de la capacidad neuroprotectora que tienen las células madre debido a la segregación de factores, neuroprotectores como el BDNF y el CNTF. Todo ello sienta las bases para futuras opciones terapéuticas basadas en la terapia celular.

Cómo perspectivas futuras se debería seguir llevando a cabo experimentos para evaluar en qué medida las células madre son responsables de la neuroprotección observada en la capa de FR para que, en un futuro, se pueda tener la opción de llevar a cabo una traslación a la clínica.

6. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio sostienen la hipótesis que la acción de las MSC podría secretar factores paracrinos con propiedades neuroprotectoras que retrasan la degeneración de los FR de NR porcinas. Lo cual sienta las bases para que la terapia celular con MSC pudiera ser una opción terapéutica para patologías retinianas que cursan con degeneración de la capa de FR.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Stem cell therapy in degeneration of the retinal pigment epithelium. Actualidad médica. 31 de agosto de 2015;100 (795):88-93.
2. Paul riordan, eva. Emmett t. Cunningham jr. Vaughan y asbury oftalmología general. 18.^a ed. Mc graw hill; 533 p.
3. Emily c. Fletcher, mbchb, mrcophth; n. H. Victor chong, mphil, do, frcs, frcophth;james j. Augsburger, md; zélia m. Corrêa, md, phd. Capítulo 10: retina. En: paul riordan, e. Emmett t. Cunningham jr. Vaughan y asbury oftalmología general. Mc graw hill. Pag. 197-198.
4. «segmento anterior», vallmedicvision (blog), accedido 3 de mayo de 2019, <https://vallmedicvision.com/oftalmologia/anatomia/segmento-anterior/>.
5. víctor ponce garcía, «título: “papel del óptico optometrista en la detección precoz de las patologías asociadas a la mácula”», s. F.
6. «disco óptico; papila», imaios, accedido 7 de mayo de 2019, <https://www.imaio.com/es/e-anatomy/estructuras-anatomicas/disco-optico-papila>.
7. «retina», ocumed (blog), accedido 7 de mayo de 2019, <https://ocumed.es/patologias/retina/>.
8. «anatomía ocular», admira visión, accedido 7 de mayo de 2019, <https://www.admiravision.es/es/articulos/divulgacion/articulo/anatomia-ocular>.
9. Emily c. Fletcher, mbchb, mrcophth; n. H. Victor chong, mphil, do, frcs, frcophth;james j. Augsburger, md; zélia m. Corrêa, md, phd. Capítulo 1: anatomía y embriología del ojo en: paul riordan, e. Emmett t. Cunningham jr. Vaughan y asbury oftalmología general. Mc graw hill. Pag. 12-13.
10. Nicolás cuenca navarro, «los fotorreceptores, esas fascinantes células» (sociedad española de bioquímica y biología molecular (sebbm), 1 de noviembre de 2009), https://doi.org/10.18567/sebbmdiv_rpc.2009.11.1.
11. Accedido 8 de mayo de 2019, <http://www.retinalmicroscopy.com/Photoreceptor%20varieties.html>.
12. «Fotorreceptores de Helga Kolb - Webvision», accedido 8 de mayo de 2019, <https://webvision.med.utah.edu/book/part-ii-anatomy-and-physiology-of-the-retina/photoreceptors/>.
13. Por SOCV|febrero 18th y 2014|Retina y vítreo|0 comentarios, «La retina», SOCV - Sociedad Oftalmológica de la Comunidad Valenciana (blog), 18 de febrero de 2014, <http://www.socv.org/la-retina/>.
14. «Outer Plexiform Layer by Helga Kolb – Webvision», accedido 8 de mayo de 2019, <https://webvision.med.utah.edu/book/part-ii-anatomy-and-physiology-of-the-retina/outer-plexiform/>.
15. «Inner Plexiform Layer by Helga Kolb – Webvision», accedido 8 de mayo de 2019, <https://webvision.med.utah.edu/book/part-ii-anatomy-and-physiology-of-the-retina/inner-plexiform-layer/>.
16. «Ganglion Cell Physiology by Ralph Nelson – Webvision», accedido 8 de mayo de 2019, <https://webvision.med.utah.edu/book/part-ii-anatomy-and-physiology-of-the-retina/ganglion-cell-physiology/>.
17. Emily C. Fletcher, MBChB, MRCOphth; N. H. Victor Chong, MPhil, DO, FRCS, FRCOphth; James J. Augsburger, MD; Zélia M. Corrêa, MD, PhD. Capítulo 10: Retina. En: Paul Riordan, E. Emmett T. Cunningham Jr. VAUGHAN Y ASBURY Oftalmología general. Mc Graw Hill. Pag. 198-200.
18. «Retina»
19. European Medicines Agency (EMA). Advanced Therapies. 2013. http://www.emea.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000294.jsp&mid=WC0b01ac05800241e0. 17 de septiembre de 2018
20. Alison MR, Poulosom R, Forbes S, et al. An introduction to stem cells. J Pathol. 2002;197:419-23.
21. «Real Decreto 1345/2007, de 11 de octubre, por el que se regula el procedimiento de autorización, registro y condiciones de dispensación de los medicamentos de uso humano fabricados industrialmente. Boletín Oficial del Estado, n.º 267».
22. Arévalo Romero, J., Páez Guerrero, D., & Rodríguez Pardo, V. (2007), «Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas.», NOVA 5, n.º 8 <https://doi.org/10.22490/24629448.387>.

Andrés V. Evaluación de la capacidad neuroprotectora de las células madre mesenquimales sobre neuroretina

23. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* ;25:2739-2749.
24. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007;110:3499-3506., s. f.
25. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007;25:2739-2749.
26. «Epidemiología de la degeneración macular asociada con la edad. Situación en España | Atención Primaria», accedido 20 de mayo de 2019, <https://www.elsevier.es/es-revista-atencion-primaria-27-articulo-epidemiologia-degeneracion-macular-asociada-con-13090016>.
27. «Retinitis pigmentosa Revisión bibliográfica › Patricia Flores-Rodríguez1 O.C. 21.060 › Elena Loma Serrano O.C. 19.415 › Pablo Gili Oftalmólogo › Gonzalo Carracedo O.C. 11.344 1 Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.», s. f.
28. «Agrawal RN, He S, Spee C, Cui JZ, Ryan SJ, Hinton DR. In vivo models of proliferative vitreoretinopathy. *Nature protocols*. 2007;2(1):67-77. PubMed PMID: 17401340. Epub 2007/04/03. eng», s. f.
29. «Kobuch K, Herrmann WA, Framme C, Sachs HG, Gabel VP, Hillenkamp J. Maintenance of adult porcine retina and retinal pigment epithelium in perfusion culture: characterisation of an organotypic in vitro model. *Experimental eye research*. 2008 Apr; 86(4):661-8. PubMed PMID: 18295758. Epub 2008/02/26. eng.», s. f.
30. «Fernandez-Bueno I, Pastor JC, Gayoso MJ, Alcalde I, Garcia MT. Muller and macrophage-like cell interactions in an organotypic culture of porcine neuroretina. *Mol Vis* 2008;14:2148-2156.», s. f.
31. «Fernandez-Bueno I, Garcia-Gutierrez MT, Srivastava GK, Gayoso MJ, Gonzalo-Orden JM, Pastor JC. Adalimumab (tumor necrosis factor-blocker) reduces the expression of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity increased by exogenous tumor necrosis factor alpha in an organotypic culture of porcine neuroretina. *Mol Vis* 2013;19:894-903.», s. f.
32. «Di Lauro S, Rodriguez-Crespo D, Gayoso MJ, et al. A novel coculture model of porcine central neuroretina explants and retinal pigment epithelium cells. *Mol Vis* 2016;22:243-253.», s. f.
33. «Osborne A, Hopes M, Wright P, Broadway DC, Sanderson J. Human organotypic retinal cultures (HORCs) as a chronic experimental model for investigation of retinal ganglion cell degeneration. *Exp Eye Res* 2016;143:28-38.», s. f.
34. «Levkovitch-Verbin H, Sadan O, Vander S, et al. Intravitreal injections of neurotrophic factors secreting mesenchymal stem cells are neuroprotective in rat eyes following optic nerve transection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:6394-6400», s. f.
35. «63. Lin N, Hu K, Chen S, et al. Nerve growth factor-mediated paracrine regulation of hepatic stellate cells by multipotent mesenchymal stromal cells. *Life Sci* 2009;85:291-295.», s. f.
36. «Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:1632-1636», s. f.
37. «Johnson JE, Barde YA, Schwab M, Thoenen H. Brain-derived neurotrophic factor supports the survival of cultured rat retinal ganglion cells. *J Neurosci* 1986;6:3031-3038.», s. f.
38. «Li Y, Tao W, Luo L, et al. CNTF induces regeneration of cone outer segments in a rat model of retinal degeneration. *PLoS One* 2010;5:e9495.», s. f.
39. «MacLaren RE, Buch PK, Smith AJ, et al. CNTF gene transfer protects ganglion cells in rat retinae undergoing focal injury and branch vessel occlusion. *Exp Eye Res* 2006;83:1118-1127.», s. f.