

# Regeneració de retina a partir de cèl·lules mare

Adriana Gálvez Playà, Grau en Biologia, 2013-2014

## Introducció

La medicina regenerativa retinal utilitzava cèl·lules mare pluripotents per restaurar la visió en aquelles malalties degeneratives retinals que fins ara eren considerades incurables i causaven ceguesa. Tot i que els mamífers tenen cèl·lules mare retinals, aquestes no tenen la capacitat de regenerar les cèl·lules danyades, per això s'han hagut de desenvolupar protocols de diferenciació de cèl·lules mare pluripotents i la posterior introducció d'aquestes a la retina hoste lesionada.

L'ull, i especialment la retina, és un òrgan amb potencial per a la seva regeneració (Fig. 1), i té certs avantatges:

- Capaç d'integrar cèl·lules trasplantades i crear connexions sinàptiques amb aquestes amb una correcta polaritat
- Localització immunoprivilegiada
- Fàcil de monitorizar
- Requereix poca manipulació

Les cèl·lules mare pluripotents utilitzades en aquest estudi són **ESc** (*Embryonic Stem Cell*) i **iPSC** (*Induced Pluripotent Stem Cell*), ja sigui en models murins com humans.

## Objectius i Metodologia

Els principals objectius d'aquest estudi són:

- Diferenciació d'ESc o iPSC en medis de diferenciació retinals
- Caracterització de cèl·lules retinals
- Aplicacions clíniques, trasplantaments de cèl·lules retinals per a restaurar la funció visual lesionada.

La metodologia emprada s'ha basat en articles bibliogràfics de les principals revistes tant científiques com especialitzades en l'àmbit oftalmològic.

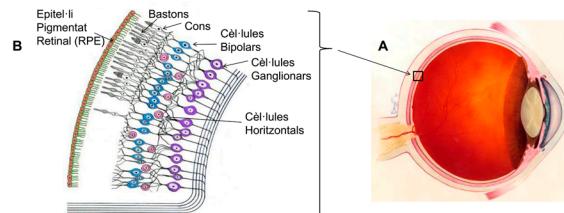


Figura 1. Estructura retina. (A) Tall sagital de l'ull on es señala la retina. (B) Capes cel·lulars d'una retina danyada. (Modificat de CEDIBA [6])

## Diferenciació i Caracterització

S'han desenvolupat protocols de diferenciació per obtenir línies cel·lulars associades a la retina (Fig. 2). Per induir a la diferenciació d'ESc o iPSC hi ha 3 mètodes:

- Diferenciació **per defecte**, els factors intrínsecos propis fan que es diferencien
- Diferenciació **directa**, amb l'addició de factors exògens s'inclouix la diferenciació neural i retinal
- Diferenciació **sense intermediaris**, tractament de cèl·lules somàtiques sense la necessitat d'utilitzar iPSC per obtenir cèl·lules retinals

Per a la diferenciació neural i posteriorment l'obtenció de cèl·lules amb fenotips retinals s'han d'inhibir les vies de senyalització **Wnt** i alguns factors de creixement de la superfamília **TGF-β**, com són proteïnes **BMP** (Bone Morphogenetic Proteins), **Nodal** i **Activina** [1]. Per modificar aquestes vies s'introdueixen certs inhibidors/antagonistes en les consecutives fases de diferenciació que poden ser proteïnes o molècules de baix pes molecular (Fig. 2) [1, 2].

Per a la **caracterització cel·lular** retinal hi ha diferents metodologies:

Mètodes cel·lulars	Mètodes moleculars	Mètodes funcionals	Control de qualitat
Morfologia, FACS, Citometria de flux	RT-PCR, aCGH	Diferenciació directa	Sequènciació cel·lular, Cariotipatge

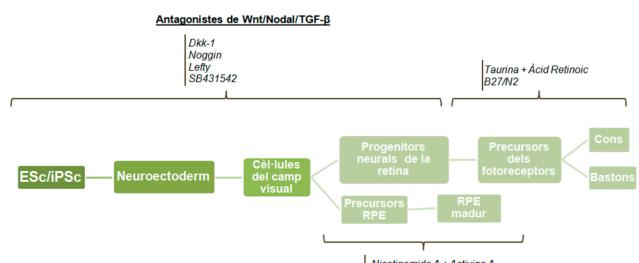


Figura 2. Cada estadi de diferenciació específic és degut a la introducció de factors extrínsecos. Per iniciar la diferenciació retinal s'han d'introduir factors antagonistes de les vies *Wnt*, *Nodal* o *TGF-β*. La diferenciació cap a RPE o Fotoreceptors depèn dels factors introduïts al cultiu cel·lular.

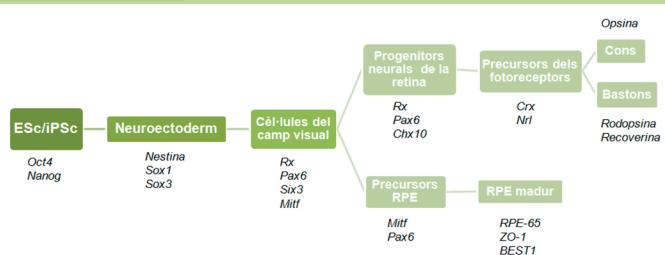


Figura 3. Esquema sobre els marcadors cel·lulars expressats en cada estadi de diferenciació específic. Serveix per a caracteritzar cada tipus cel·lular en el cultiu de diferenciació retinal i poder purificar-los per a posteriors aplicacions clíniques.

El principal mètode de caracterització de cèl·lules retinals és aquell que qualifica els marcadors cel·lulars de cada fase de diferenciació, és a dir, dependent de quin factor de transcripció expressiu ens trobarem davant d'un tipus cel·lular o d'un altre (Fig. 3). L'obtenció i caracterització correcta de **fotoreceptors** (Fig. 4) i cèl·lules de **RPE** (Fig. 5) és un avanç important per a posteriors tractaments clínics.

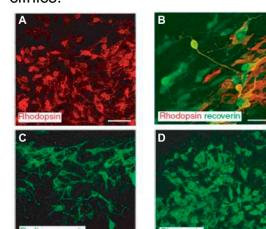


Figura 4. Caracterització de fotoreceptors a part d'una ànalisi immunocitoquímica. (A) Expressió de rodopsina, característica dels bastons. (B) Coexpressió de rodopsina i recoverina, típica de bastons madurs. (C) D) Caracterització d'opsina típica dels cons. [2]

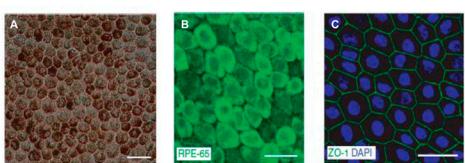


Figura 5. Caracterització de les cèl·lules de RPE. (A) Cultiu de RPE derivades d'ESc de mono amb morfologia cel·lular hexagonal i elevada concentració de pigments. (B) Expressió del factor de transcripció RPE-65, característic de les cèl·lules RPE. (C) Formació de *tight junctions* entre les cèl·lules de RPE a partir d'anticossos ZO-1. [2]

## Aplicacions clíniques

Les malalties o desordres visuals tenen una elevada incidència en la població mundial, però es coneix que un 90% d'aquesta població amb algun tipus de desordre visual es concentra en països en desenvolupament. Alguns de les principals malalties que es poden tractar amb la medicina regenerativa:

- Degeneració Macular Senil (AMD, *Age-related Macular Degeneration*)
- Retinosis Pigmentària (RP)
- Malaltia de Startgard (STGD)

Els millors tipus cel·lulars a l'hora de realitzar els trasplantaments són cèl·lules de RPE (Fig. 7) i fotoreceptors immadurs (Fig. 8), s'ha vist que s'integren millor que cons i bastons madurs [3].

Els **trasplantaments cel·lulars** es fan en l'espai subretinal (Fig. 6), ja sigui a partir de puncions o amb un **scaffold** proteic.

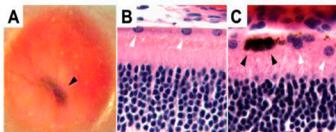


Figura 7. Supervivència de cèl·lules RPE derivades de hiPSC en un model murí albi. (A) Observació del fons de l'ull amb cèl·lules pigmentades. (B-C) Cèl·lules de RPE hostes indicades amb fleixa blanca, mentre que les fleches negres indiquen la correcta integració i disposició de les cèl·lules RPE derivades de hiPSC. [4]

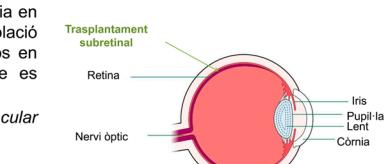


Figura 6. Esquema sobre el trasplantament de cèl·lules mare a l'espai subretinal.

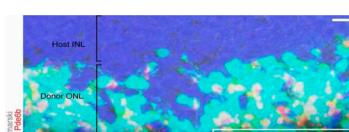


Figura 8. (A) Cèl·lules fotoreceptores *Pde6b* (foscodiesterasa) es van posicionar a l'ONL (Outer Nuclear Layer), entre la RPE i la INL de l'hoste, a més d'integrar-se amb una polaritat correcta respecte RPE. [5]

## Conclusions

La medicina regenerativa aplicada al tractament de malalties visuals ha patit grans avenços en les últimes dècades, tot i ser un camp prometedor hi ha poques grups que hagin començat amb els assaigs clínics, doncs encara hi ha barres a superar:

- Cultius de diferenciació retinals poc eficients
- Caracterització cel·lular poc específica, això pot comportar la formació de teratomes
- Problemes d'immunorebuig, doncs s'utilitzen substàncies d'origen animal en els cultius de diferenciació
- Mètodes de trasplantament subretinals poc eficients. Hi ha integració però amb poques cèl·lules o bé es formen agregats cel·lulars
- Dificultat en la creació de connexions sinàptiques entre les cèl·lules hoste i les transplantades

## Referències

- [1] Smith JR, et al. Inhibition of Activin/Nodal signaling promotes specification of human embryonic stem cells into neuroectoderm. *Dev Biol*. 2008; 313: 107-117.
- [2] Osakada F, et al. Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells. *Nature*. 2008; vol 26 (2): 215-224.
- [3] McLaren RE, et al. Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature*. 2006; 444: 203-207.
- [4] Li Y, et al. Long-term safety and efficacy of human-induced pluripotent stem cell (iPS) grafts in a preclinical model of retinitis pigmentosa. *Mol Med*. 2012; 18: 1312-1319.
- [5] Singh MS, et al. Reversal of end-stage retinal degeneration and restoration of visual function by photoreceptor transplantation. *Proc Natl Acad Sci*. 2013; vol 110; 3: 1101-1106.
- [6] Projecte implanteo retinal. Visió artificial. <<http://www.visionartificial.com.ar/implantes4.htm>>