



Fundació
La Marató de TV3

20^e SIMPOSIUM
Enfermedades neurodegenerativas



IDENTIFICACIÓN DE FUENTES FIABLES DE LAS CÉLULAS MADRE DE LA RETINA PARA LA TERAPIA DE REEMPLAZO CELULAR EN ENFERMEDADES DE DEGENERACIÓN DE LA RETINA

Albert Saiz Hinarejos

Hospital Clínic i Provincial de Barcelona. Fundació Clínic per a la Recerca Biomèdica

Mar Tintoré Subirana

VHIR - Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron

1. Resumen

La degeneración traumática, hereditaria o adquirida de las neuronas de la retina son causas frecuentes de deterioro visual. La terapia de reemplazo celular podría ser en el futuro una aproximación que permitiera restaurar la función visual en individuos con estos tipos de deterioro. En el presente proyecto, a través de modelos de ratón con degeneración retiniana, nos propusimos identificar poblaciones celulares que puedan utilizarse en terapias de reemplazo neuronal de forma segura en un futuro.

Hipótesis

La retina forma parte del sistema nervioso central y las enfermedades o traumas que cursan con muerte neuronal causan la pérdida de la visión. Hasta la fecha no existen estrategias terapéuticas para sustituir las neuronas muertas, o desde un punto de vista menos ambicioso, para retrasar o detener su degeneración. Nuestra hipótesis se basaba en investigaciones previas que habían propuesto que las células del margen ciliar de la retina, localizadas en la zona periférica del ojo, podrían ser una fuente potencial de factores protectores que frenen la muerte neuronal en enfermedades degenerativas de la retina, como el glaucoma (que provoca la pérdida paulatina de células ganglionares de la retina; CRGs), la retinitis pigmentaria o la degeneración macular (que provocan la pérdida de fotorreceptores) o bien que pudieran utilizarse como fuente de reemplazo celular en tales patologías.

En concreto, en el presente proyecto nos propusimos:

1. Determinar si los factores segregados por células madre neurales de la retina periférica de mamíferos tienen un efecto neuroprotector que retrase o detenga la degeneración neural en la retina.
2. Dilucidar si las células madre neurales de la retina periférica de mamíferos poseen potencial para diferenciarse *in vivo*, de forma que puedan considerarse una fuente fiable de células que sustituya a las neuronas dañadas en enfermedades degenerativas de la retina.

2. Resultados

Las células del cuerpo ciliar (CCC) son una población celular localizada en la zona periférica de la retina que se ha propuesto como posibilidad ser usadas en terapias de neuroprotección y/o reemplazo en enfermedades degenerativas de la retina. El objetivo de este proyecto era doble: por una parte investigar un posible efecto neuroprotector de estas células y, por otra parte, evaluar su potencial capacidad de reemplazo neuronal *in vivo* en comparación con otros tipos de células madre neurales, como pueden ser las obtenidas de la zona subventricular (SVZ), cuya potencialidad ha sido previamente testada en otros tejidos. Las CCC son una población poco abundante de la retina y, por tanto, en caso de que estas células resultaran tener capacidad de regeneración, resulta esencial conocer la posibilidad de que sean expandidas *in Vitro*, de manera que se obtengan en un número suficiente para su posterior inyección en el ojo dañado. Por este motivo, además de testar la potencialidad de las CCC para reemplazar células dañadas, hemos amplificado estas células *in vitro* mediante la generación de neuroesferas (N-CCC) y hemos comparado su potencialidad de neuroprotección y reemplazo con la de las células primarias sin expandir. Por tanto, se han inyectado tres tipos de células: (i) CCC recién aisladas del cuerpo ciliar (primarias), (ii) CCC procedentes de neuroesferas (N-CCC) amplificadas *in Vitro*, y (iii) células pluripotentes neurales obtenidas de la SVZ. Cada tipo celular se ha comparado con sus respectivos controles, que son los medios en los que van suspendidas.

Para contestar a las dos preguntas planteadas en este proyecto (potencialidad neuroprotectora y/o de reemplazo de las CCC) hemos realizado dos tipos de ensayo:

- **Ensayo de neuroprotección:** para analizar un posible efecto neuroprotector de las CCC se realizó la inyección de las células en la retina a la vez que practicamos una axotomía del nervio óptico (NO), que induce la degeneración progresiva de las CRG. Datos previos del laboratorio de la Dra. Agudo-Barriuso han mostrado que a los 5 días postaxotomía el 50% de las CRG han degenerado, a los 14 días sobrevive un 12-15% y a 45 día solo sobrevive un 1-2% de la población original de las CRG. Por tanto, cuantificamos la supervivencia de CRG a estos tres tiempos (5, 14 y 45 días).

- **Ensayo de reemplazo:** para estudiar la potencialidad de estas células a diferenciarse a neuronas como un primer paso a un posible reemplazo de células retinales, realizamos dos tipos de ensayos:

a) *Diferenciación concomitante a degeneración:* se procedió a las inyecciones celulares al mismo tiempo que indujimos degeneración de las CRG mediante axotomía del NO. A los 14 y los 45 días, analizamos la capacidad de las células inyectadas de diferenciarse a neuronas.

b) *Diferenciación después de degeneración:* las inyecciones celulares se realizaron en retinas en las que las CRG ya han degenerado (45 días después de la axotomía). De esta manera evitamos la posibilidad de que los factores tóxicos y la glía reactiva que pudieran estar produciendo las CRG en degeneración, afecten a la posible capacidad de diferenciación de las células inyectadas. En este caso, el destino de las células inyectadas se analizó 30 y 90 días después de ser transplantadas en las retinas sin CRG.

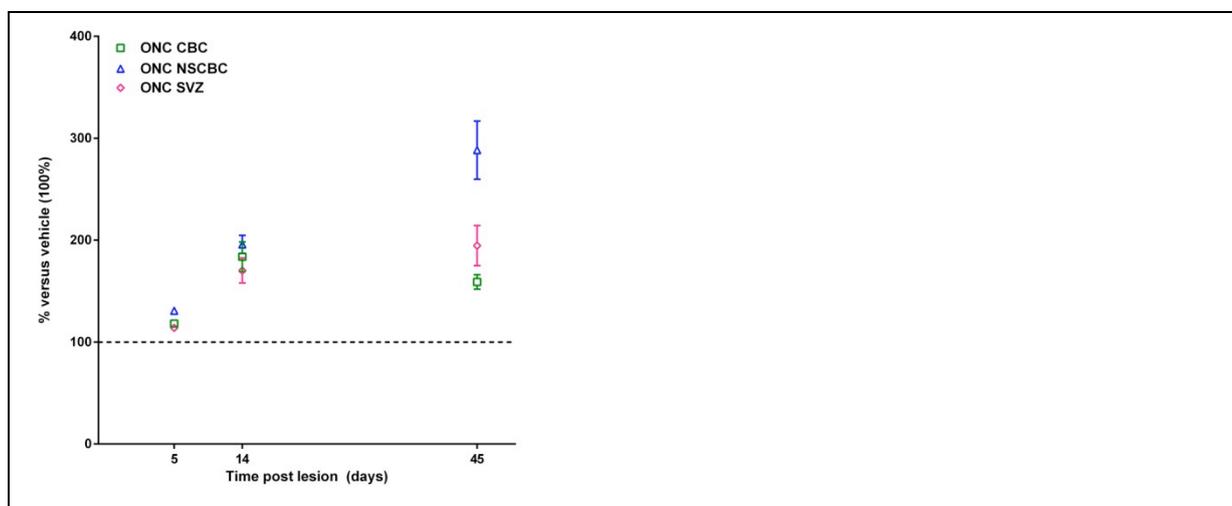


Figura 1. Neuroprotección

Gráfica del porcentaje (\pm s.e.m.) de supervivencia de las CRG axotomizadas en retinas tratadas con los distintos tipos de células a lo largo del tiempo. Se ha considerado 100% (raya discontinua) el número de CRG supervivientes en los respectivos grupos controles (ONC+vehículo). $n = 4-6$ retinas por tiempo y tipo celular.

Ensayos de neuroprotección

Para este ensayo inyectamos los tres tipos celulares y sus respectivos controles que contenían solo el medio de suspensión, después de realizar la axotomía del NO, y

cuantificamos la supervivencia de las CRG a diferentes tiempos tras la lesión (de 3 a 45 días). Los resultados muestran que en las retinas tratadas con CCC, N-CCC o SVZ, la supervivencia de las CRG es significativamente mayor que tras el tratamiento con sus correspondientes vehículos y que este efecto neuroprotector es proporcionalmente más alto a tiempos largos tras la axotomía (figura 1).

Ensayos de reemplazo

a) Diferenciación a la vez que degeneración

En experimentos en los que realizamos inyecciones de CCC, N-CCC y SVZ a la vez que practicamos axotomía del NO, analizamos también el destino de las células inyectadas a los 14 y los 45 días. Los tres tipos celulares se obtuvieron a partir de una línea de ratones actina-GFP, de forma que pudimos visualizar su localización y morfología en las retinas inyectadas mediante fluorescencia de la proteína GFP. Tanto a 14 como 45 días postrasplante, las células de todos los tipos formaban una malla epirretiniana, aunque en ningún caso se observó integración de las células fluorescentes en la retina (resultados no mostrados).

b) Diferenciación después de degeneración

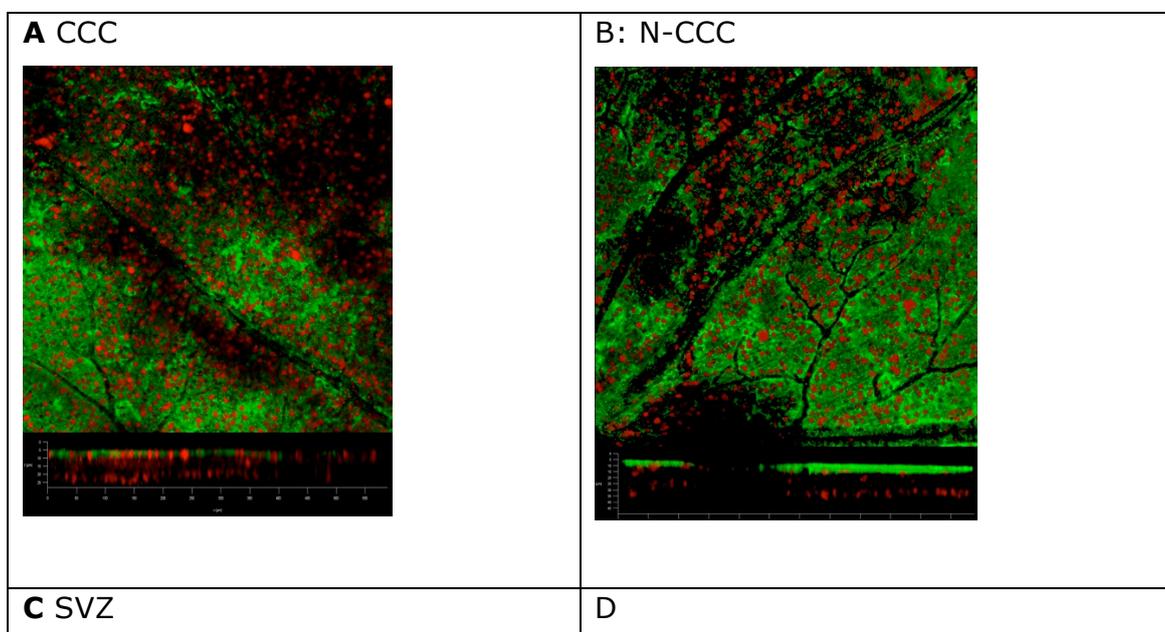
Tras los resultados negativos del ensayo anterior, pensamos que el ambiente proinflamatorio como resultado de la muerte masiva de CRG y la consiguiente activación de la microglía podrían generar un ambiente hostil, poco permisivo para la migración e integración de las células inyectadas. Por este motivo decidimos trasplantar las células una vez que las CRG ya han degenerado y desaparecido por completo, es decir, a los 45 días después de la axotomía. Las retinas fueron analizadas a 30 y 90 días después del trasplante (es decir, a los 75 o 105 días después de la axotomía).

Tanto a 30 como 90 días del trasplante de cada tipo celular se observan mallas epirretinianas que contienen células positivas para GFP (figura 2a-c). Además de la malla, se detectaron células GFP integradas en la capa más interna de la retina, que es donde se localizaban las CRG antes de su degeneración. Muchas de las GFP localizadas en esta capa expresaban NeuN, que es un marcador de neuronas diferenciadas. En el caso de las SVZ se observó también señal de GFP en la capa nuclear interna (figura 2C).

Finalmente, al comparar el número total de CRG en las retinas controles (axotomía sin trasplante) con el de las retinas trasplantadas, observamos un número significativamente mayor de células que expresan marcadores específicos de CRG, como el factor de transcripción Brn3a tras la inyección en las retinas deplecionadas (figura 2D), sugiriendo que las células trasplantadas se han diferenciado y expresan marcadores de CRG.

En resumen, nuestros datos sugieren que:

- 1). Células aisladas de la retina adulta periférica, así como células derivadas a partir de ellas amplificadas *in vitro*, y células de la zona subventricular, cuando son inyectadas intravítreamente en la retina, retrasan moderadamente la degeneración de CRG dañadas por axotomía del NO.
- 2). Cuando estas células se inyectan en retinas deplecionadas de CRG, comienzan a expresar marcadores neuronales, sugiriendo que comienzan a diferenciarse a neuronas y, por tanto, abren la puerta a su utilización como posible fuente celular en terapias de reemplazo en un futuro.



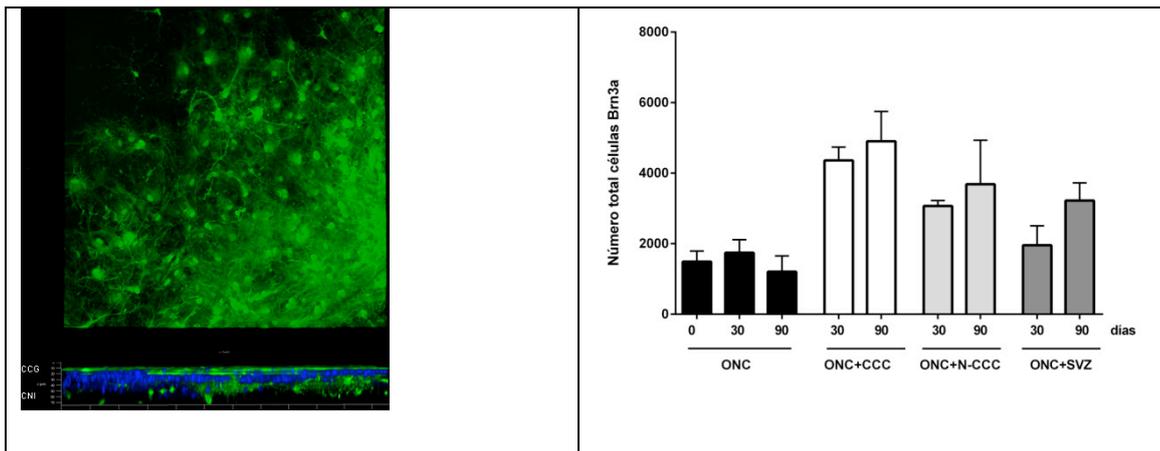


Figura 2. Reemplazo.

(A-C) Imágenes de confocal que muestra en verde las células CCC-GFP, N-CCC-GFP y SVZ-GFP y en rojo núcleos NeuN positivos, en la retina 90 días tras el trasplante de las mismas en retinas deplecionadas de CRG. Arriba, vista de la capa de células ganglionares. Abajo, sección de la retina. CCG: capa células ganglionares, CNI: capa nuclear interna.

(D) Número total \pm desviación estándar de células Brn3a⁺ cuantificadas en retinas controles deplecionadas de CRG (ONC) 45 días antes o deplecionadas de CRG 45 días antes y tratadas con cada tipo celular (ONC + CCC, ONC + N-CCC, ONC + SVZ).

3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

El tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas es uno de los mayores retos de la medicina actual. El advenimiento de la terapia celular ha abierto nuevas esperanzas para la reparación de daños en los diferentes tejidos, aunque las lesiones del SNC suponen un reto particular, dada la extrema complejidad de los circuitos neuronales. La degeneración neuronal es un proceso que tiene lugar a largo plazo y, por tanto, en el SNC la terapia celular podría resultar útil en dos posibles escenarios: 1) que las células trasplantadas eviten la degeneración del tejido del huésped (neuroprotección) y 2) que las células trasplantadas se diferencien y adquieran las propiedades funcionales de las células perdidas (reemplazo).

Gracias a la localización superficial de la retina, la terapia celular aplicada a la retina es la que probablemente tiene más opciones de éxito. De hecho, el trasplante de células madre en retinas dañadas está actualmente en marcha con ensayos clínicos en fase I/II. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta la fecha utilizando células madre autólogas derivadas de la médula ósea en pacientes con un alto grado de degeneración y que eran prácticamente ciegos, no han demostrado una mejora de la visión y en

algún paciente incluso se ha descrito un empeoramiento. En modelos animales, el trasplante intravítreo de células madre no derivadas del SNC (por ejemplo, células estromales mesenquimales) produce una respuesta glial e inflamatoria en la retina que deforma la estructura laminar de la misma. Estos resultados, tanto en pacientes como en modelos animales, sugieren que el uso de células madre totipotentes en terapia celular no es recomendable.

En este proyecto hemos estudiado el potencial neuroprotector y la capacidad de integración de células neurales, las células del margen ciliar de la retina adulta (CCC), que son células pluripotentes con una capacidad de diferenciación más restringida que las totipotentes, y que han sido propuestas como una buena opción, ya que son la fuente natural de células madre en la retina en vertebrados no amniotas. Además, hemos comparado el potencial de estas células con las de otras células madre no retinales derivadas de la zona subventricular del cerebro (SVZ) que han sido previamente utilizadas para ensayos de reemplazo en otros contextos. Nuestros datos muestran que contrariamente a las células madre multipotentes o totipotentes, las células pluripotentes neurales no producen una respuesta inflamatoria en la retina, ni son tóxicas, lo que resultaría en una mejora en la seguridad durante el tratamiento de pacientes. Pero, además, hemos observado que tanto las células primarias (CCC, SVZ) como las amplificadas en cultivo a partir de ellas (N-CCC) tienen capacidad neuroprotectora a largo plazo y que a tiempos largos y que en determinadas condiciones incluso poseen la capacidad de expresar marcadores específicos de neuronas diferenciadas. El impacto neuroprotector de estas células neurales pluripotentes en neuronas en proceso de degeneración tiene varias implicaciones positivas: por una parte, estas células podrían utilizarse en un futuro para retrasar el proceso de muerte neuronal en enfermedades crónicas degenerativas de la retina, como el glaucoma, y, por otra parte, cabría la posibilidad de mantenerlas en cultivo y que sigan siendo bioactivas, abriendo así las puertas a generar biobancos de este tipo de células. Además, el hecho de trasplantar células neurales pluripotentes en modelos animales deplecionados de células ganglionares, y observar que expresan marcadores específicos de neuronas maduras, sugiere que estas células podrían acabar diferenciándose e integrándose en el circuito. Estos prometedores resultados sugieren la posibilidad de un tratamiento incluso después de la pérdida neuronal, pero a pesar de estas esperanzadoras observaciones, para obtener una conclusión clara y comenzar a pensar en una posible aplicación clínica, son necesarios más análisis que confirmen

que las células que expresan marcadores de CRG proceden realmente de las células inyectadas. En el caso de las células ganglionares, esta posibilidad resulta ciertamente remota, ya que la conexión de estas células con el cerebro implica la regulación de una serie de eventos de guía axonal que no se encuentran activados en el individuo adulto. En el caso de otros tipos de neuronas retinales, tales como los fotorreceptores, células horizontales, bipolares, etc., nuestros resultados abren una esperanza más plausible.

4. Bibliografía científica generada

Durante el desarrollo de este proyecto hemos adquirido una serie de conocimientos y experiencia sobre la biología de las células del margen ciliar de la retina que hemos publicado en revistas de alto impacto:

Marcucci F, Murcia-Belmonte V, Wang Q, Coca Y, Ferreiro-Galve S, Kuwajima T, Khalid S, Ross M.E., Mason C, and Herrera E* (2016)

The Ciliary Margin Zone of the Mammalian Retina Generates Retinal Ganglion Cells.

Cell Reports 1 (12) 3152-3164. Cover caption. FI: 8.1.

Fernández-Nogales M*, Murcia-Belmonte V*, Yu Chen H, Herrera E* (2018)

The peripheral eye: A neurogenic area with potential to treat retinal pathologies?

Prog Retin Eye Res. 2019 Jan; 68:110-123. doi: 10.1016/j.preteyeres.2018.09.001.

FI:11.8.

Los resultados donde se detallarán los datos descritos en esta memoria, que eran objeto de la propuesta inicial, se están finalizando y serán enviados en breve para su publicación.