

ORIGINAL

Transdiferenciación de células mesenquimales del tejido adiposo: hacia una terapia celular para enfermedades degenerativas de la retina

Transdifferentiation of mesenchymal stem cells from adipose tissue: Through a cellular therapy for degenerative retinal diseases

Marcos S¹, Jaén A¹, González D¹, Andreu S¹, Avilés M², Fernández E¹

¹ Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Elche; ² Departamento de Oftalmología, Universidad de Murcia, Murcia, España

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

Resumen

Objetivos: Obtención de células troncales mesenquimales de tejido adiposo para trasplante y recuperación funcional de retinas degeneradas.

Material y metodología: Extracción de la grasa inguinal de ratones transgénicos para proteína verde fluorescente y aislamiento de las células troncales mesenquimales. Estas células fueron implantadas utilizando inoculaciones intravítreas y subretinianas en un modelo murino (rd10) que asemeja la retinosis pigmentaria autosomal recesiva humana. Expresión de genes involucrados en el desarrollo de la retina mediante RT-PCR.

Resultados: Nuestros resultados demuestran que en ambos abordajes quirúrgicos las células trasplantadas sobreviven, migran y se integran en diferentes capas de la retina de los ratones rd10. Además hemos identificado la expresión de genes en embriones y cuerpos embrionarios (Otx2, NF200, Pax6 periferina, IRBP) que pueden ser utilizados como activadores o potenciadores de la transdiferenciación.

Conclusiones: las células mesenquimales del tejido adiposo reúnen las condiciones necesarias para su potencial uso en la terapia de enfermedades degenerativas de la retina. Los cuerpos embrionarios representan un modelo útil para estudiar los mecanismos reguladores de la diferenciación de las células retinianas.

Palabras clave:

Terapia celular, células troncales, cuerpos embrionarios, retinosis pigmentaria.

Abstract

Objectives: To obtain adult mesenchymal stem cells from adipose tissue to be used in cellular therapies aimed to retinal regeneration.

Material and Methods: isolation of adult mesenchymal stem cells from adipose tissue of green fluorescent protein transgenic mice. Recipient mouse eyes were transplanted with these cells by using intravitreal and subretinal procedures. We have used a mice model of human autosomal recessive retinitis pigmentosa (rd10). Gene expression by means of RT-PCR of mRNA isolated from embryo eyes (E9,5 to E18,5); post-natal eyes (P1 to P10) and adults eyes. That technique was also used in mouse embryoid bodies spontaneously differentiated from embryonic stem cells ES-D3.

Results: In both surgical procedures we observed survival, migration and integration of mesenchymal stem cells into several retinal layers. We have also identified the expression of some retinal genes (Otx2, NF200, Pax6, peripherin, IRBP) which may help to drive the mesenchymal stem cells transdifferentiation.

Conclusions: Mesenchymal cells are very promising to be used in degenerative retinal diseases. We emphasize the usefulness of mouse embryoid bodies as a model to study the regulatory mechanisms of retinal neurons differentiation and its potential for obtaining retinal progenitors.

Key words:

Cellular therapy, stem cells, embryoid bodies, retinitis pigmentosa.

Correspondencia

E. Fernández
Instituto de Bioingeniería.
Universidad Miguel Hernández. Avda. Universidad s/n. Elche 03202 Alicante
e.fernandez@umh.es



Introducción

Los problemas visuales representan una de las cuatro causas principales de pérdida de independencia entre las personas mayores. Además, el envejecimiento de la población en los países desarrollados, fruto del descenso de la natalidad y el incremento de la esperanza de vida, hace que estas cifras vayan aumentando progresivamente, dando lugar a alteraciones de la visión que implican una pérdida importante de la agudeza y del campo visual. En este contexto, las degeneraciones retinianas, especialmente la Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE), son responsables de casi el 50% de todos los casos de baja visión.

La degeneración y muerte de los fotorreceptores, que son las células que se encargan de convertir la luz en estímulos nerviosos, es la vía final común e irreversible de muchas de estas formas de ceguera. Sin embargo, aunque durante los últimos 20 años se han podido clonar más de 100 genes diferentes, que son responsables de algunas de las degeneraciones retinianas hereditarias más importantes, y se han descrito tratamientos innovadores basados en terapias génicas, factores neurotróficos y factores nutricionales, la mayor parte de estos tratamientos todavía están en una fase clínico-experimental muy preliminar y aún no existe ningún tratamiento eficaz para estas patologías.

Una alternativa que podría ofrecer la posibilidad de recuperar la visión y/o la capacidad funcional de los receptores dañados en las retinas degeneradas son los trasplantes de células de epitelio pigmentario y de fotorreceptores [1]. En este contexto se han utilizado, con distintos grados de éxito, diversos tipos celulares pluripotenciales o células progenitoras [2] mayoritariamente procedentes de: neuronas retinianas embrionarias (fetales) o neonatales [3,4], progenitores en retina adulta presentes en el cuerpo ciliar y en la membrana basal del limbo esclero-corneal [5,6], progenitores neuronales del cerebro [7,8], células pluripotenciales procedentes de la médula ósea [9,10] y células pluripotenciales embrionarias [11,12]. Las principales propiedades de estas células son su capacidad para dividirse indefinidamente (autorenovación) y la posibilidad de diferenciarse en varias líneas celulares. Sin embargo, uno de los problemas más serios de esta aproximación es la obtención de un número de células aptas para el trasplante, que además puedan sobrevivir el tiempo necesario para restaurar dicha función.

Afortunadamente también aparecen células troncales o progenitoras en tejidos adultos. Estas células permanecen habitualmente quiescentes, pero pueden comenzar a dividirse y diferenciarse en células especializadas si se dan las

condiciones adecuadas. En el caso de las células del tejido adiposo existen además razones que las hacen muy atractivas para su uso en trasplantes debido a su bajo poder antigénico (ya que carecen de marcadores específicos de superficie) y a la posibilidad de obtener grandes volúmenes de tejido y de células sin necesidad de que sean cultivadas.

El uso de células mesenquimales del tejido adiposo está siendo muy utilizado para su diferenciación *in vitro* en células condrogénicas, adiposas e incluso neurales. Uno de nuestros objetivos consiste en comprobar si estas células son capaces de diferenciarse espontáneamente *in vivo* en células de la retina (mediante un proceso de transdiferenciación) y valorar si son útiles para regenerar los fotorreceptores dañados en un modelo animal que asemeja la retinosis pigmentaria. La hipótesis subyacente es que al introducir las células indiferenciadas en un tejido los diversos factores requeridos para el crecimiento celular existentes en ese ambiente tisular (en este caso una retina dañada o enferma) estimularían la diferenciación a una determinada línea celular [13,14].

Material y métodos

Los animales fueron tratados de acuerdo con la normativa de uso de animales para investigación en oftalmología y visión de la Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) y la normativa estatal y europea vigente al respecto. Todos los procedimientos que se realizaron con los animales fueron aprobados y supervisados por el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Extracción células mesenquimales

Seis ratones machos adultos B6 Tg (ACTB-EGFP, AcreGFP)/2Osb (Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University) transgénicos para proteína verde fluorescente fueron sacrificados por dislocación cervical. A continuación se procedió a la extracción instantánea de la grasa inguinal y su lavado con suero salino fosfatado (PBS) estéril en placa Petri sobre hielo para eliminar restos de sangre, pelos y otro material contaminante.

El protocolo de extracción de las células mesenquimales [15] se inició con un lavado en PBS tras el que se introduce la grasa en el medio de cultivo que contiene DMEM 1000 mg/L glucosa, 10% suero fetal bovino (FBS); 1% penicilina y estreptomycin, 2,5 mg/ml anfotericina B y se incubó a 37°C durante una hora. Después se disgregó mecánicamente la grasa y se lavó 2 veces con PBS, tratándola a continuación con 0,75% colagenasa (tipo V, Sigma-Aldrich), en PBS, durante 45 min a 37°C con ligera agitación. La cola-

genasa se inactivó con el mismo volumen del medio descrito, centrifugando durante 5 min a 1500 rpm. El precipitado celular se resuspendió en medio y se filtró en una gasa estéril de 100 μm para eliminar los restos celulares. Con el material obtenido se procedió a la siembra en placas de cultivo convencionales (TPP, Trasadingen, Suiza) con el medio descrito. El cultivo se realizó bajo condiciones estándar (oxígeno atmosférico con 5% de CO_2 , a 37°C). Cuando las células alcanzaron un 70-90% de confluencia, se realizaron pases con tripsina cada 3-4 días y se sembraron a una densidad de 5000 células por cm^2 (Figura 1).

Para realizar los trasplantes de células se usaron ratones machos adultos rd10 (ratones con mutación espontánea en el exón 13 del gen *Pde6b* que se utilizan como modelo de

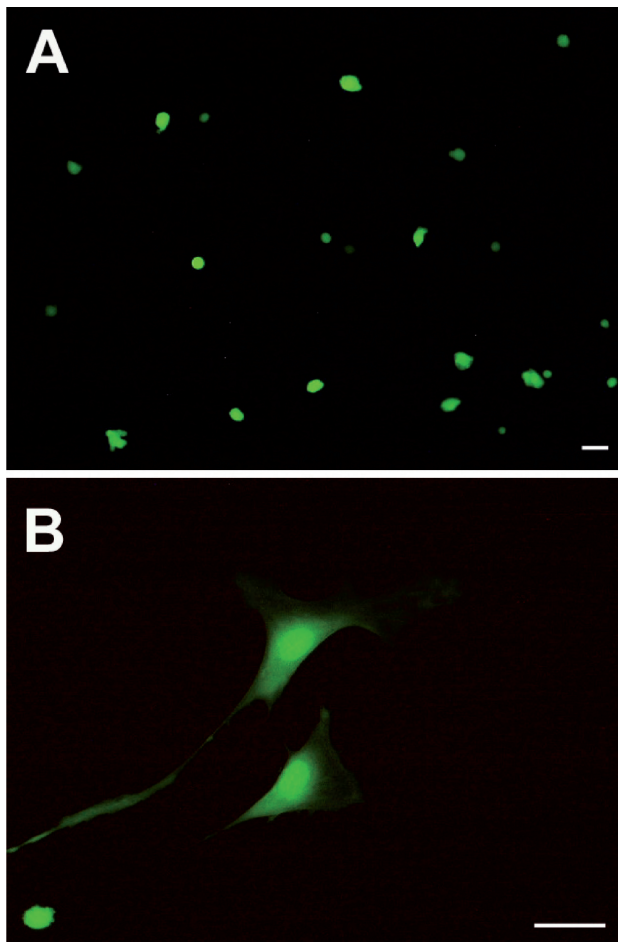


Fig. 1. Ejemplo de células mesenquimales adiposas. a) Suspensión celular, b) Células cultivadas (tras su manipulación con la jeringa de Hamilton) que conservan su aspecto indiferenciado y se adhieren a la placa (Calibración = 20 μm).

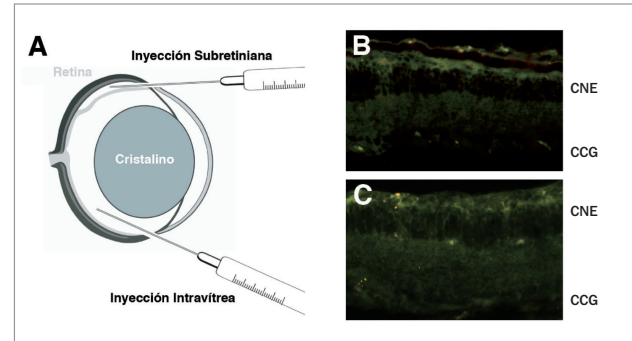


Fig. 2. Trasplante de células mesenquimales. a) Esquema de la técnica de trasplante en los espacios subretiniano y vítreo con ayuda de una jeringa de Hamilton. b) Imagen de microscopía de fluorescencia de células trasplantadas en el espacio subretiniano de un animal rd10. c) Células trasplantadas en el espacio vítreo. CCG, capa de células ganglionares. CNE, capa nuclear externa (Calibración = 100 μm).

retinosis pigmentaria de desarrollo lento). Estos ratones en su edad adulta sólo poseen una fila discontinua de bastones y conos aberrantes [16,17] y la degeneración de la retina empieza después de que ésta haya alcanzado su completa diferenciación.

Antes de realizar el trasplante los animales fueron anestesiados vía intraperitoneal con una mezcla de Ketamina (70 mg/kg, Ketolar®, Pfizer, NY, USA) y Xilacina (10 mg/kg, Rompun®, Bayer, Alemania). A continuación se les indujo en ambos ojos una midriasis pupilar instilándoles una gota de tropicamida al 1% (Colicursi tropicamida 1%®, Alcon-Cusi, Barcelona, España) y fueron anestesiados tópicamente con una gota de Colicursi Anestésico Doble® (Alcon-Cusi, Barcelona).

Para estudiar la mejor vía de administración celular se utilizaron inyecciones subretinianas e inyecciones intravítreas (Figura 2). En ambos casos los animales fueron inyectados en el ojo izquierdo con 2 μl de una suspensión celular de células mesenquimales a una concentración de 25000 cel/ μl en medio de cultivo. Para ello se utilizó una jeringa Hamilton (Hamilton Company, Reno NV, USA) con una aguja con diámetro interno de 130 μm (calibre 26G). El ojo derecho se usó como control y sólo recibió el medio de cultivo en el que estaban suspendidas las células. Una vez realizadas las inyecciones se comprobó la correcta vascularización de la retina mediante fundoscopia directa. También se comprobó la viabilidad de las células inyectadas tras su manipulación. Para ello se sembraron 2 μl de la suspensión celular usada para el trasplante tras su paso por la aguja de la jeringa de Hamilton.



No se usaron inmunosupresores tras la inoculación debido a que la capacidad antigénica de las células mesenquimales adiposas es mínima, siendo éstas el tipo de células pluripotenciales con menor antigenicidad [18].

A los 27 días postimplantación, los ratones fueron sacrificados bajo anestesia mediante dislocación cervical. Se extrajeron ambos ojos y se fijaron en paraformaldehído al 4%, en PBS, durante toda la noche. Al día siguiente, se disecaron la córnea y el cristalino, y se volvieron a fijar durante 1 hora con paraformaldehído al 4% en PBS. Tras varios lavados en agua destilada fueron crioprotegidos en gradientes de sacarosa y finalmente se incluyeron en OCT (Optimal Cutting Temperature). Posteriormente se realizaron cortes sagitales seriados de 7 μ m con ayuda de un criostato (HM505E MICRON). Todos los cortes se montaron con un medio de montaje específico para fluorescencia (VectaShield, Vector Laboratories) y fueron observados y fotografiados con ayuda de un microscopio de fluorescencia (Olympus AX70).

Expresión de marcadores de fotorreceptores en muestras animales y cuerpos embrionarios

Para los análisis *in vivo* se seleccionó la cepa salvaje de ratón OF-1. Las muestras a analizar fueron ojos de embrión desde el estadio E9,5 hasta E18,5, ojos de ratones post-natales desde P1 hasta P10 y ojos de adulto. Una vez sacrificadas las hembras gestantes, se extrajeron los embriones y se aislaron los globos oculares con ayuda de unas tijeras extrafinas, tipo Castroviejo. Los ojos se lavaron en una solución estéril de PBS y se introdujeron en tubos *ependorf* para una congelación rápida con nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron en criocongelador a -80°C.

Para los análisis en cultivo se utilizó la línea comercial ES-D3 de células embrionarias pluripotenciales de ratón. Para mantener esta línea celular en un estado no diferenciado, se cultivaron las células con un medio de cultivo compuesto por: DMEM (Dulbeccos® MEM con Glutamax-1) (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), a una concentración final de 1x, complementado con 100 μ M de Mercaptoetanol (Gibco), 15% de suero fetal bovino (Biochrom, Berlín, Alemania), 1000 U/ml de LIF (factor inhibidor de la leucemia) (Chemicon, Temecula, CA, USA), 100 U/ml de Penicilina-Estreptomomicina (Gibco) y 0,1 mM de aminoácidos no esenciales (Gibco).

El cultivo se realizó sobre placas de cultivo adherentes de 100 mm (TPP, Trasadingen, Suiza) tratadas con una solución de gelatina (Sigma, St Louis, MO, USA) al 0,1% en PBS estéril 1x, en una densidad de 1×10^6 células /10 ml. Se

cambió el medio cada día y se tripsinizaron las células (Trypsina- EDTA, Gibco) cada 3 días, cuando hubieron alcanzado una confluencia del 80%. La forma de tripsinizar las células fue siempre la misma, para las placas de 100 mm, se retiró el medio de cultivo y se hizo un lavado con PBS estéril; se eliminó el PBS de lavado y se añadieron 2 ml de tripsina, dejando actuar 1 minuto, a 37°C; transcurrido el minuto, se bloqueó la reacción con 4 ml de medio de cultivo, homogeneizando la solución con la pipeta para disgregar los posibles agregados celulares. Esta solución se pasó a un tubo cónico estéril y se añadió de nuevo medio a la placa para realizar un lavado y recoger los posibles restos celulares, pasándolos también al tubo cónico. El recuento de las células se realizó mediante una cámara Neubauer, utilizando una dilución 1:1 de suspensión celular y una solución de azul tripán al 0,4% en PBS. De este modo se puede sembrar posteriormente el número adecuado de células.

Para obtener el cultivo de células en diferenciación espontánea se retiró el LIF del medio y el suero fetal bovino pasó a una concentración final del 10%. A continuación se tripsinizaron las células y se volvieron a cultivar en placas de cultivo no adherentes de 100mm (TPP) en una densidad de $2,5 \times 10^6$ células /10 ml con este medio carente de LIF. Esta técnica permite la diferenciación de las células en forma de cuerpos embrionarios. Estos cultivos de cuerpos embrionarios se mantuvieron 30 días, realizándose cambios de medio cada dos días y cambios de placa en los días tercero, quinto y séptimo y cuando fueron necesarios, para evitar la adherencia de los cuerpos embrionarios a la placa.

Los marcadores seleccionados para este estudio fueron los siguientes:

- Pax 6, Otx 2 y neurofilamento 200. Estos marcadores están presentes en el desarrollo embrionario de neuroectodermo y además Pax 6 y Otx 2 son genes esenciales para el desarrollo ocular.
- Notch 1, Chx 10, y Neuro D, que están implicados en neurogénesis retinal.
- Tr β 2, Crx, Nrl, que participan en procesos reguladores de la diferenciación a fotorreceptores.
- Rodopsina quinasa (Rhok), IRBP, Pdeb, arrestina (Sag), transducina (Gnat1, Gnat2), rodopsina (Rho), S-opsina, que marcan diferentes proteínas de transducción de conos y bastones.
- Periferina (Prph1), que es una proteína estructural de conos y bastones.

El diseño de cebadores se realizó a partir de secuencias encontradas en la literatura y comprobadas mediante el

Tabla 1. Marcadores utilizados para el estudio de expresión génica en cuerpos embrionarios de ratón

Marcador	Cebador 5'	Cebador 3'	Tamaño banda	Tm	Ciclos
Crx	CCCAATGTGGACCTGATGCACC	GGGCTGTAAGAATCTGAGAT	370bp	63°C	32
Chx10	CCGGGAGATGCTGGCCAT	TCCTCCTGCTCCATCTTGT	329bp	60°C	32
Gnat1	GAGGAGAAGCACTCCAGAGA	CTGAATCTCCATACTGAATG	261bp	57°C	32
Gnat2	CATCAGTGCTGAGGACAAAG	CAGCTTGGCTCTGCATAGTC	287bp	58°C	32
IRBP	CCCTCCCCAGAAGTCTTT	CAGCCTCTTCATGATGTA	425bp	55°C	32
NeuroD	CTTGCCAAGAACTACATCTGG	GGAGTAGGGATGCACCGGGA	230bp	66°C	32
NF-200	GAGTGGTTCCGAGTGAGGTTGG	GACGTTGAGCAGGTCCTGGT	343bp	67°C	32
Notch1	TCTGGACAAGATTGATGGCTAC	CGTTGACACAAGGGTTGGAC	328bp	64°C	32
Nrl	GTGCCTCCTTCACCCACC	CAGACATCGAGACCAGCG	285bp	59°C	32
Otx2	CCATGACCTATACTCAGGCTTC	GAAGCTCCATATCCCTGGGTG	211bp	67°C	32
Pax6	AGTGAATCAGCTTGGTGGTG	TCTGTCTCGGATTTCCCAAG	294-336bp	60°C	30
Pdeb	CTTGCTACGCGGCTCTTC	CTTCACTCGTGAAGCATG	297bp	55°C	32
Prph1	CTGTCCCGCCTAGAACTGGAGC	GCCTCCCCACCCTTGGTCCC	291bp	67°C	32
Rho	TTCACCACCACCTCTACAC	CATTGCATGCCCTCAGGGATG	283bp	60°C	32
Rhok	ATATCCGAATTTCTGACC	CGCTTCTCCGGGTCCTTC	324bp	55°C	32
Sag	AAAAAGTGCAGCCAAACAGC	CATCTTTCTTCCCTTCTGTG	389bp	56°C	32
s-opsin	GCCCACTGCGCTACAAAAAGT	TGAAGCAGAAGATGAAGAGG	456bp	62°C	32
Trβ2	CAGTCCGGCTCTCAGTGGTC	CAGCCTTCACAGGTGATGCA	327bp	63°C	32

programa BLAST del NCBI o bien diseñadas a partir de las secuencias del ARN mensajero que se encuentran en las bases de datos del NCBI. Una vez obtenidas las secuencias, éstas se enviaron a Invitrogen para que sintetizaran los cebadores. Las secuencias de los cebadores utilizados y sus principales características se muestran en la Tabla 1.

La extracción de ARN de las muestras de ojos de ratón y de los cuerpos embrionarios se realizó mediante el reactivo Trizol Reagent® (Invitrogen), según el protocolo establecido por la casa comercial. Para realizar la retrotranscripción inversa de 1µg de cada uno de los ARN extraídos se utilizó: el kit de la enzima Expand Reverse Transcriptase® (Roche, Basel, Suiza), una solución de OligoDT (Roche), una solución de dNTP's (Innogenetics, Gent, Bélgica) y un inhibidor de ARNasa (RNase Out®, Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Así se generaron los ADN complementarios necesarios para poder realizar la reacción de PCR. Para todas las reacciones de retrotranscripción y PCR se utilizó el termociclador 96-Well GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

El análisis de los productos de amplificación de las PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa, al 2%, con Bromuro de Etidio para su visualización; y se utilizó un marcador de 100 pb (Invitrogen) para comprobar los tamaños de las bandas.

Resultados

Los cultivos obtenidos de células mesenquimales del tejido adiposo de ratón adulto, no perdieron su estado indiferenciado y se obtuvieron en gran número a partir de pocos gramos de grasa conservando su estado indiferenciado (Figura 1).

Las células trasplantadas en el espacio subretiniano de retinas distróficas son capaces de migrar por las distintas capas de la retina (Figura 2). Por el contrario, las retinas de los ojos control no muestran ninguna diferencia significativa con respecto a las retinas de ratones rd10 sin implantar.

En las retinas de los animales en los que el trasplante fue intravitreal también hemos observado alguna integración de las células en la capa nuclear externa (Figura 2). Las retinas de los ojos control tampoco mostraron diferencias significativas con respecto a retinas de ratones rd10 sin implantar.

En cuanto a la expresión en cuerpos embrionarios de marcadores tempranos y tardíos de retinogénesis y fotoreceptores, destacamos la expresión de Otx2, NF200, y Pax6 (fig. 3) y la expresión de periferina e IRBP (Figura 4). Estos marcadores concuerdan con los que expresan las células progenitoras de retina y ponen de manifiesto que estos genes también aparecen en cuerpos embrionarios en diferenciación espontánea. Todo ello indica que el estudio

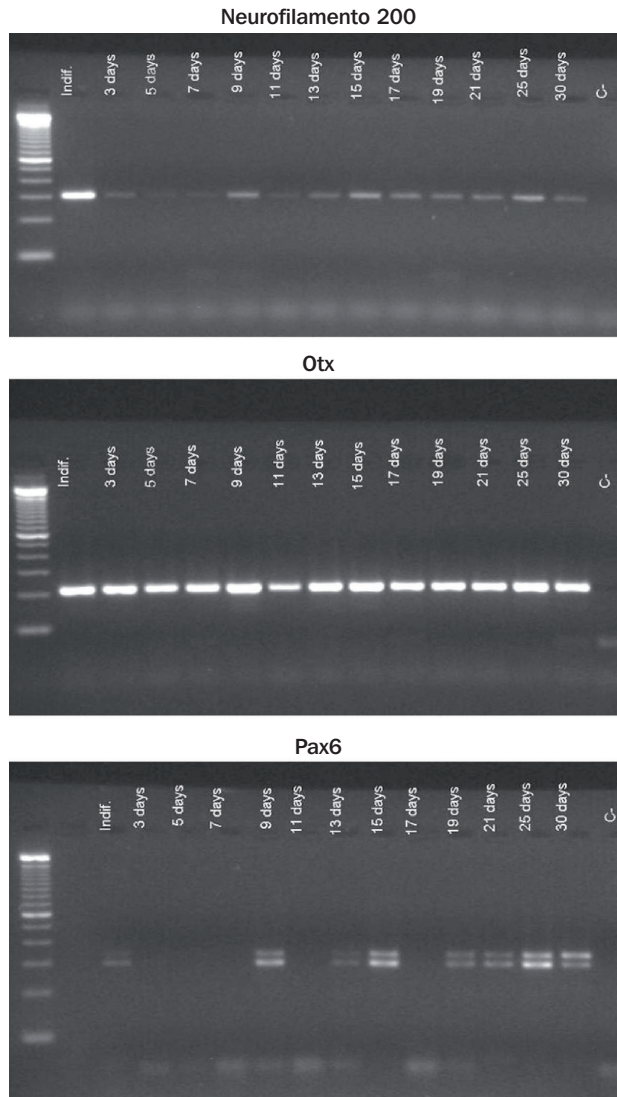


Fig. 3. Ejemplo de la evolución de la expresión de algunos marcadores tempranos y tardíos de retinogénesis y fotorreceptores (Otx2, NF200, y Pax6) en cuerpos embrionarios en diferenciación espontánea. c) control negativo. En extremo izquierdo del gel, marcador de talla desde 100 bp (banda inferior) aumentando 100 bp cada banda.

de marcadores en cuerpos embrionarios puede ayudar a comprender mejor los mecanismos reguladores de la diferenciación celular. Estos resultados también sugieren que los marcadores estudiados, o una combinación de ellos, pueden ser potencialmente útiles para la selección o inducción de líneas celulares capaces de ser utilizadas para el trasplante y la recuperación funcional de retinas degeneradas.

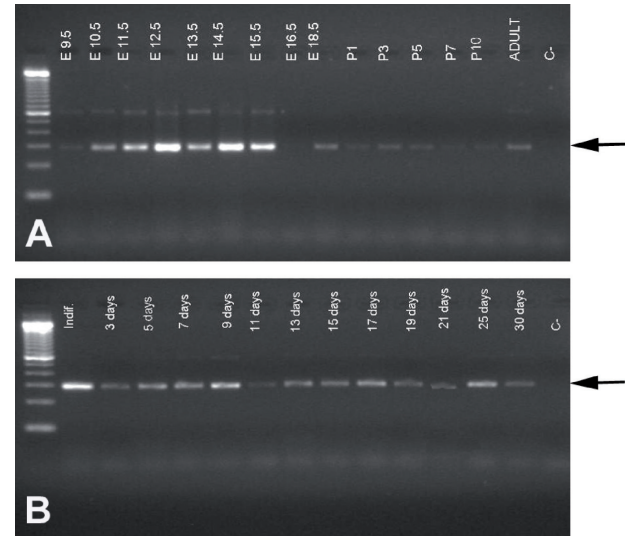


Fig. 4. Evolución de la expresión de periferina. a) Ratones pre- y post-natales. b) Cuerpos embrionarios en diferenciación espontánea. c) control negativo. En extremo izquierdo del gel, marcador de talla desde 100 bp (banda inferior) aumentando 100 bp cada banda.

Discusión

Aunque existen algunos datos experimentales que sugieren que los trasplantes de fotorreceptores pueden ser útiles para restaurar parcialmente la respuesta a la luz en ratones ciegos [19], no es posible extrapolar muchas de estas técnicas a clínica ya que la edad óptima para obtener las células a implantar corresponde aproximadamente al 2º trimestre de vida. Por otro lado, y pese a que los mejores resultados de los trasplantes celulares se han obtenido con células progenitoras de retina, la limitación en cuanto al número de células obtenidas y lo complicado de su obtención (retinas neonatales, células del cuerpo ciliar...), además de su alto poder antigénico desaconsejan esta técnica para un futuro tratamiento de estas enfermedades en el hombre. En cualquier caso todos estos estudios han puesto de manifiesto que la edad del donante y el estadio en el que se encuentra la enfermedad son muy importantes de cara al resultado final, ya que parecen ser más efectivos cuanto más temprano es el trasplante [20].

En este trabajo hemos demostrado que si los cuerpos embrionarios son sometidos a protocolos adecuados de cultivo y diferenciación, aparecen células que expresan marcadores de retina. Estos protocolos también pueden aplicarse a células mesenquimales que podrían ser transfectadas con factores neurotróficos para inducir procesos de transdiferenciación antes del trasplante con el fin de mejorar la eficiencia de estas técnicas [19,21,22]. Por otro lado, el simple

contacto de estas células con el microambiente adecuado (retinas en proceso de degeneración) parece facilitar su supervivencia, migración e integración en la retina. A la vez, las células trasplantadas ayudan a proteger a los fotorreceptores y facilitan la regeneración de la retina mediante la liberación de factores tróficos específicos [23].

Los resultados de un estudio reciente en el que se realizó un trasplante autólogo de células mesenquimales del tejido adiposo en tejido cardíaco dañado de un paciente [24] demuestran que la extracción de este tipo de células es rápida y que es posible conseguir un número de células suficiente para el trasplante. Este procedimiento podría extrapolarse al tratamiento de enfermedades degenerativas de la retina. Así, el aislamiento de la retina que le confiere una inmunoreactividad limitada privilegiada [25], unido a la baja inmunoreactividad de las células mesenquimales adultas del tejido adiposo, sugieren que el trasplante alogénico de células mesenquimales son interesantes en las estrategias terapéuticas del futuro, más teniendo en cuenta que hoy por hoy no existe ningún tratamiento curativo para estas enfermedades. Su extracción es sencilla dado que es un tejido fácilmente accesible y por tanto puede convertirse en un proveedor ilimitado de células para el tratamiento de defectos o injurias de tejidos autólogos o heterólogos. Además, pueden conseguirse fácilmente millones de células y no existen implicaciones éticas para su uso. Otra ventaja adicional de estas células es que presentan una tasa de multiplicación lenta y no tienen un gran poder proliferativo, por lo que su posible capacidad teratogénica está muy disminuida.

Finalmente, no hay que olvidar que aún estamos en unas fases muy preliminares de estas investigaciones y todavía hay que superar muchas dificultades antes de que estas técnicas puedan representar una opción terapéutica real para mejorar la calidad de vida de las personas que padecen estas patologías. Es preciso conocer mejor los procesos de crecimiento y diferenciación celular, y los mecanismos que controlan el desarrollo de los progenitores celulares. Además hay que conseguir que las células trasplantadas no sólo sobrevivan, sino que se integren en la retina, realicen las conexiones apropiadas y no degeneren.

Hemos elaborado un protocolo que permite la obtención, aislamiento y selección de un número suficiente de células mesenquimales de tejido adiposo para ser utilizadas para el trasplante y recuperación funcional de retinas que han sufrido procesos degenerativos. Nuestros resultados han puesto de manifiesto que una vez trasplantadas, estas células sobreviven, migran y se integran en la retina de ratones rd10. Estas células parecen reunir las condiciones necesarias (fácil obtención, número suficiente y bajo poder antigénico) para su potencial uso en este tipo de terapia celular, sin embargo todavía son necesari-

os más estudios para comprender mejor los procesos de crecimiento y diferenciación celular. En especial es preciso conocer las señales y factores tróficos que participan en estos procesos y utilizar este conocimiento para desarrollar estrategias de diferenciación dirigida. La posibilidad de usar estos factores para activar o dirigir la transdiferenciación de estas células hacia fotorreceptores, o incluso el análisis de los trasplantes de estos tipos celulares en retinas dañadas, nos ofrecerán nuevos datos para seguir avanzando en el prometedor campo de la terapia celular de las enfermedades neurodegenerativas.

Agradecimientos

Queremos agradecer a la FUNDACIÓN MAPFRE la Beca de Investigación 2006 otorgada y a la Cátedra de Investigación en Retinosis Pigmentaria «Bidons Egara» por su apoyo financiero en las distintas etapas de la realización de este trabajo. ■

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wang S, Lu B, Girman S, Holmes T, Bischoff N, Lund RD. Morphological and Functional Rescue in RCS Rats after RPE Cell Line Transplantation at a Later Stage of Degeneration IOVS 2008; 49:416-21.
2. Das AV, Zhao X, Ahmad I. Stem Cell therapy for retinal degeneration: retinal neurons from heterologous sources. *Semin Ophthalmol* 2005; 20:3-10.
3. Engelhardt M, Wachs FP, Couillard-Despres S, Aigner L. The neurogenic competence of progenitors from the postnatal rat retina in vitro. *Exp Eye Res* 2004; 78:1025-36.
4. Ahmad I, Das AV, James J, Bhattacharya S, Zhao X. Neural stem cells in the mammalian eye: types and regulation. *Semin Cell Biol* 2004; 15:53-62.
5. Akagi T, Takahashi M. Photoreceptors derived from adult iris tissue: prospects for retinal transplantation. *Semin Ophthalmol* 2005; 20:11-5.
6. Engelhardt M, Bogdahn U, Aigner L. Adult retinal pigment epithelium cells express neural progenitor properties and the neuronal precursor protein doublecortin. *Brain Res* 2005; 1040:98-111.
7. Kurimoto Y, Shibuki H, Haneko Y, Ichikawa M, Kurokawa T, Takahashi M, et al. Transplantation of adult rat hippocampus-derived neural stem cells into retina injured by transient ischemia. *Neurosci Lett* 2001; 306:57-60.
8. Van Hoffelen SJ, Young MJ, Shatos MA, Sakaguchi DS. Incorporation of murine brain progenitor cells into the developing mammalian retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:426-34.



9. Tomita M, Adachi Y, Yamada H, Takahashi K, Kiuchi K, Oyaizu H, et al. Bone marrow-derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina. *Stem Cells* 2002; 20:279-83.
10. Chiou S, Kao C, Peng C, Chen S, Tarng Y, Ku H, Chen Y. A novel in vitro retinal differentiation model by co-culturing adult human bone marrow stem cells with retinal pigmented epithelium cells. *Biochem Biophys Res Comm* 2005; 326:578-85.
11. Sugie Y, Yoshikawa M, O uji Y, Saito K, Hara Y. Photoreceptor cells from mouse ES cells by co-culture with chick embryonic retina. *Biochem Biophys Res Comm* 2005; 332:241-7.
12. Banin E, Obolensky A, Idelson M, Hemo I, Reinhardt E, Pikarski E, et al. Retinal incorporation and differentiation of neural precursors derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2006; 24:246-57.
13. Pellegrini G, De Luca M, Arsenije vic Y. Towards therapeutic application of ocular stem cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2007; 18:805-18.
14. Cheng LC, Tavazoie M, Doetsch F. Stem cells: from epigenetics to microRNAs. *Neuron* 2005; 46:363-7.
15. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang JI, Futrell WJ, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7:211-26.
16. Gargini C, Terzibasi E, Mazzoni F, Strettoi E. Retinal Organization in the Retinal Degeneration 10 (rd10) Mutant Mouse: A Morphological and ERG Study. *J Comp Neurol* 2007; 500:222-38.
17. Chang B, Hawes NL, Hurd RE, Davisson MT, Nusinowitz S, Heckenlively JR. Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision Res* 2002; 42:517-25.
18. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond)* 2005; 26:2-8.
19. Dong X, Pulido JS, Qu T, Sugaya K. Differentiation of human neural stem cells into retinal cells. *Neuroreport* 2003; 14:143-6.
20. Djoj osubroto MW, Arsenije vic Y. Retinal stem cells: promising candidates for retina transplantation. *Cell Tissue Res* 2008; 331:347-57.
21. Spence JR, Aycinena JC and Rio-Tsonis K. Fibroblast growth factor-hedgehog interdependence during retina regeneration. *Dev Dyn* 2007; 236:1161-74.
22. Haynes T, Gutierrez C, Aycinena JC, Tsonis PA, Del Rio-Tsonis K. BMP signaling mediates stem/progenitor cell-induced retina regeneration. *PNAS* 2007; 104: 20380-5.
23. Meyer JS, Katz ML, Maruniak JA, Kirk MD. Embryonic stem cell-derived neural progenitors incorporate into degenerating retina and enhance survival of host photoreceptors. *Stem Cells* 2005; 24:274-83.
24. Sanchez PL, Sanchez-Guijo FM, Villa A, del Canizo C, Arnold R, San Roman JA, et al. Launching a clinical program of stem cell therapy for cardiovascular repair. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007; (Suppl 1):S123-9.
25. Wallace VA. Stem cells: a source for neuron repair in retinal disease. *Can J Ophthalmol* 2007; 42:442-6.

Conflicto de intereses

Los autores no hemos recibido ayuda económica alguna para la realización de este trabajo. Tampoco hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial. Ninguna entidad comercial ha pagado, ni pagará, a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estamos afiliados.