

Eficacia en la cicatrización de lesiones retinianas traumáticas al implantar células madre pluripotentes de ratón. Modelo experimental en ratas

Mayor M.C. Gustavo Jesús Vázquez-Zapién,*

Mayor M.C. Luis Rubén Martínez-Nava,** Mayor M.C. Mónica Maribel Mata-Miranda***

Escuela Médico Militar. Ciudad de México.

RESUMEN

Objetivo. Determinar la eficacia en la cicatrización del implante de células madre pluripotentes de ratón en un modelo murino con lesión retiniana traumática.

Material y métodos. Se cultivaron células madre embrionarias de ratón; posteriormente se implementó un modelo en rata con retinotomía con trocar de 27G. Se utilizaron cuatro grupos, cada uno con diez ratas *Rattus norvegicus* (40 ojos). Los grupos se trataron como sigue: Grupo Control no recibió tratamiento, Grupo 1 recibió 0.025 mL intravítreo de solución salina balanceada, Grupo 2 se le implantaron 20,000 células intravítreas y Grupo 3 recibió 50,000 células intravítreas re suspendidas en 0.025 mL de solución salina balanceada; se trataron a la primera, segunda y cuarta semanas posterior a la retinotomía. Tres meses después de la lesión se sometieron a estudio histopatológico.

Resultados. En todos los grupos se valoró histológicamente la respuesta inflamatoria e integridad anatómica, encontrando en el Grupo Control y Grupo 1 inflamación y alteración anatómica moderada, mientras que en los Grupos 2 y 3 la inflamación fue de escasa a nula, restaurándose la integridad anatómica.

Conclusiones. El implante de células madre embrionarias de ratón es eficaz para una mejor cicatrización de lesiones retinianas traumáticas al reducir la respuesta inflamatoria y restaurar la integridad anatómica.

Palabras clave: Células madre; retina; lesión retiniana.

Efficacy in healing traumatic retinal lesions by implanting mouse pluripotent stem cells. Experimental rat model

SUMMARY

Objective. To determine the efficiency of the cicatrization after implanting mouse pluripotent stem cells in a murine model with a retinal injury.

Material and methods. Mouse embryonic stem cells were cultured; later on a rat model with retinotomy was implemented using a 27G trocar. 4 experimental groups were studied, each one containing 10 rats *Rattus norvegicus* (40 eyes). The groups received different treatments in a intravitreal way as follows: control group did not received any treatment, Group 1 received 0.025 mL of balanced salt solution, Group 2 received 20,000 cells resuspended in 0.025 mL of balanced salt solution and Group 3 received 50,000 cells resuspended in 0.025 mL of balanced salt solution. All the groups received the treatment at the first, second and fourth weeks after the retinotomy. Three months after the retinal injury and histopathological study was done.

Results. The inflammatory response and histological integrity were studied in all the groups. The findings were as follows: Control Group and Group 1 showed moderate inflammation and anatomical changes, moreover Groups 2 and 3 showed a low or null inflammation and the anatomical integrity was restored.

Conclusions. Intravitreal implantation of Mouse embryonic stem cells is effective for better cicatrization of traumatic retinal injuries in order to reduce the inflammatory response and the anatomical changes.

Key words: Stem cells; retina; retinal injury.

* Maestro en Ciencias Biomédicas, Jefe del Laboratorio de Embriología de la Escuela Médico Militar y alumno de doctorado del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional. ** Especialista en Oftalmología, Jefe del Servicio de Oftalmología del Hospital Militar Regional de Tampico, Tamps. *** Maestra en Ciencias Biomédicas, Jefe del Laboratorio de Biología Celular y Tisular de la Escuela Médico Militar y alumna de doctorado del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional.

Correspondencia: Dra. Mónica Maribel Mata-Miranda

Escuela Médico Militar, Laboratorio de Embriología, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, Cerrada de Palomas S/N Esq. Periférico, Col. Lomas de San Isidro, C.P. 11200, México, D.F.

Correo e: mmcmirabel@gmail.com

Recibido: Mayo 24, 2014.

Aceptado: Octubre 4, 2014.

Introducción

Casi en la mitad de los traumatismos oculares graves se afecta la retina, cuyas lesiones se asocian en mayor proporción con pérdida visual permanente. En trauma orbitario con secuelas intraoculares significativas la lesión más frecuente es la conmoción o edema de la retina, la cual se caracteriza por tumefacción pálida y oscurecimiento del relieve coroideo.^{1,2}

El trauma ocular ocasiona uno de cada diez desprendimientos de retina (algunas series indican hasta 17%), y el pronóstico del desprendimiento de retina no es bueno, ya que puede atrofiarse.²

El trauma ocular es una causa importante de ceguera prevenible en todo el mundo y casi 50% de las lesiones oculares ocurren en menores de 18 años de edad.³

Se estima que hay 2.4 millones de lesiones oculares en Estados Unidos cada año. El 35% de estas lesiones ocurren en niños menores de 17 años y 55% en niños menores de 15 años.⁴

En el trauma ocular abierto el paciente deberá ser intervenido quirúrgicamente de inmediato.² El cierre quirúrgico de la penetración ocular deberá restaurar la anatomía y la arquitectura funcional, evitar complicaciones posibles y preparar el globo ocular para futuras intervenciones.⁵

La retina es una parte del sistema nervioso central y como el cerebro es en gran parte incapaz de reemplazar las neuronas perdidas por enfermedad o lesión. Dependiendo del tipo neuronal, las enfermedades neurodegenerativas de la retina se pueden dividir en los que afectan a la retina externa y las que afectan a la retina interna.⁶

El término célula madre (SC) fue acuñado a finales del siglo XX, cuando el científico alemán Darwinist Ernst Haackel y cols. fusionaron los conceptos de filogenia y ontogenia para describir stammzelle (stem cell), un concepto nuevo para definir a las células primordiales que se diferencian en diferentes tipos de células y en organismos multicelulares.⁷

Si estas células se clasifican según su descendencia y potencial de desarrollo, es posible reconocer cuatro niveles de SC:⁸

- Totipotentes.
- Pluripotentes.
- Multipotentes.
- Unipotentes.

Las células madre pluripotentes surgen de células totipotentes y pueden originar la mayor parte de los tipos de células especializadas necesarias para el desarrollo fetal. Es decir, las SC pluripotentes humanas pueden generar todas las células del cuerpo, pero ninguna célula del tejido extraembrionario.⁸

La diferenciación adicional de SC pluripotentes conduce a la formación de células madre multipotentes y unipotentes. Las células multipotentes sólo pueden crear un número limitado de tipos celulares, y las células unipotentes sólo células de su mismo tipo.^{8,9}

Dos propiedades de las SC sustentan su utilidad y expectativas: tienen la capacidad de originar células diferenciadas y se renuevan por sí mismas, ya que cada división de la SC crea cuando menos otra SC.⁸

El trasplante de SC parece una herramienta prometedora para la regeneración de tejidos enfermos, dañados o defectuosos. Las células madre hematopoyéticas ya se han utilizado para restaurar células hematopoyéticas. Los rápidos adelantos en la investigación con SC, han planteado la posibilidad de usar otros tipos de células madre para el reemplazo celular y tisular.¹⁰

Para las terapias con SC, la retina tiene la combinación óptima de la facilidad de acceso quirúrgico, combinado con una capacidad de observar células trasplantadas directamente a través de los medios oculares claros. La pregunta ahora es: ¿qué enfermedades retinianas son blancos más apropiados para los ensayos clínicos con células madre pluripotenciales?¹¹

No solamente para enfermedades vasculares retinianas se han empleado ESC como tratamiento de éstas, también se han empleado en enfermedad de Stargardt, retinitis pigmentosa y distrofia de fotorreceptores con diferentes métodos de aplicación de las mismas.¹¹⁻¹³

Dos ensayos clínicos de las terapias basadas con SC en enfermedades de la retina ya han sido aprobados por la FDA, ambos iniciados por *Advanced Cell Technology* (Santa Monica, CA), la cual planea incluir pacientes con enfermedad de Stargardt y atrofia geográfica secundaria a degeneración macular relacionada con la edad (AMD).¹³

Existen estudios que demuestran la ausencia de factores adversos secundarios al empleo de SC en retina como son: hiperproliferación, tumorigenicidad, tejido ectópico o rechazo evidente después de cuatro meses de seguimiento.¹⁴

Objetivo

Determinar la eficacia en la cicatrización al implantar células madre pluripotentes de ratón en un modelo murino con lesión retiniana traumática, analizando histopatológicamente la respuesta inflamatoria y la integridad anatómica.

Material y métodos

Expansión de células madre embrionarias de ratón (mESC)

Las mESC (ATCC, SCRC-1011) se sembraron a una densidad de 50,000 células x cm² sobre una monocapa de fibroblastos embrionarios (MEF) de ratón previamente arrestados en su ciclo celular, utilizándose medio basal de mESC (ATCC, cat: SCRR-2010) suplementado con 15% de suero fetal bovino (FBS), 2-mercaptoetanol al 0.1 mM (Invitrogen, cat: 21985023) y factor inhibidor de leucemia (LIF) a razón de 1 000 U/mL (Chemicon, cat: ESG1107); se incubaron a 37°C y 5% CO₂. Una vez que las placas de cultivo se encontraban confluentes, se procedió a despegar las mESC con tripsina y mediante conteo celular (Invitrogen Cell Counter) se obtu-

vieron dosis de 20,000 y 50,000 células re suspendidas en 0.025 mL de solución salina balanceada al 0.09% (SSB).

Modelo murino con retinotomía

El manejo de los animales se realizó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y los residuos se dispusieron de acuerdo con la NOM-087-ECOL-1995. Los animales fueron machos de la cepa *Rattus norvegicus* de 12 semanas de edad y se aclimataron durante una semana antes de iniciar el proyecto en jaulas metabólicas con ciclos de 12 h de luz/oscuridad, con humedad controlada (50-60%) y condiciones de temperatura constante (21 ± 1 °C).

Bajo sedación con 5 mg de ketamina más 8 mg de xilacina intraperitoneal, se realizó una retinotomía en área temporal, por fuera de las arcadas con un trocar 27G bajo observación directa con oftalmoscopio indirecto, la cual fue realizada por un mismo retinólogo.

Implante de células madre pluripotentes

Los grupos de estudio se dividieron en un grupo control y tres grupos experimentales, cada uno con diez ratas de laboratorio raza *Rattus norvegicus*, los cuales fueron conformados en forma aleatoria (ojo izquierdo de cada rata, siendo un total de 40 ojos).

El implante de mESC fue intravítreo con aguja de 27G, el cual fue realizado por un mismo médico oftalmólogo; al grupo control no se le aplicó ningún tratamiento; el primer grupo experimental recibió 0.025 mL intravítreo de solución salina balanceada (SSB); al Grupo 2 se le implantaron 20,000 mESC intravítreas re suspendidas en 0.025 mL SSB; el Grupo 3 recibió 50,000 mESC intravítreas re suspendidas en 0.025 mL SSB; Todos los grupos experimentales recibieron las inyecciones intravítreas a la primera, segunda y cuarta semanas posterior a la retinotomía.

Estudio histopatológico

Posterior a tres meses de la lesión, se sacrificaron los animales para proceder a enucleación del ojo izquierdo afectado, colocando la pieza patológica en formol amortiguado al 10%, se realizó inclusión del tejido en parafina y se obtuvieron cortes histológicos de 3 m de grosor, tiñéndolos posteriormente con hematoxilina & eosina (HE) para ser analizadas posteriormente por un médico patólogo mediante microscopía directa (microscopio Olympus BC50), el cual desconocía a qué grupo pertenecía cada corte histológico.

Resultados

Expansión de células madre embrionarias de ratón (mESC)

Las mESC son células adherentes que tienen como característica principal su crecimiento en colonias, mismas que crecieron sobre una monocapa de MEF de ratón (Figura 1).

La confluencia de las mESC se alcanzaba cada 72 h, requiriendo un pase celular. Posterior a éste, la formación de las nuevas colonias se presentaba después de las primeras 24 h, siendo el tamaño de las colonias observadas heterogéneo.

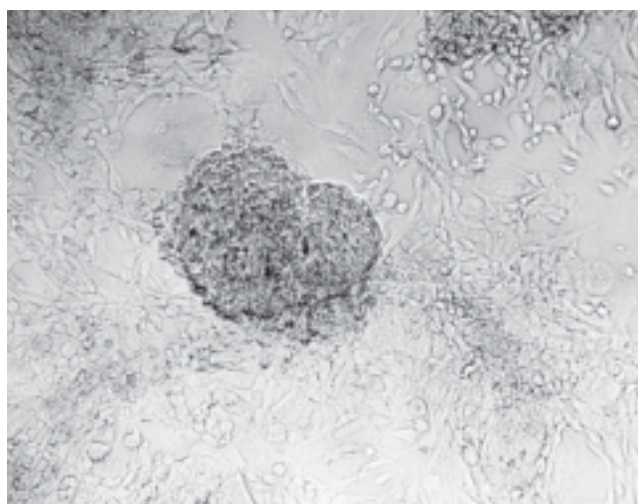


Figura 1. Cultivo de células madre embrionarias de ratón. Colonia de mESC sobre una monocapa de MEF (10X).

Modelo murino con retinotomía

La retinotomía se realizó de manera homogénea de 1 mm en todos los grupos, sin presencia de complicaciones durante y posterior a la lesión como son: endoftalmitis, hemovítreo, desprendimiento de retina y ptisis bulbi.

Implante de células madre pluripotentes y estudio histopatológico

Las aplicaciones intravítreas se llevaron a cabo en el tiempo establecido y sin complicaciones. Durante un lapso de 11 semanas posteriores a la primera aplicación intravítrea de mESC, no se observaron datos de rechazo, endoftalmitis ni alguna otra complicación secundaria a la misma.

De acuerdo con la histopatología retiniana normal de rata, un médico patólogo designó grados según el nivel de respuesta inflamatoria en nula, leve, moderada y severa, utilizando como criterio la cantidad de infiltrado inflamatorio crónico constituido por linfocitos y macrófagos; por otra parte, designó grados de integridad anatómica en conservada, con alteración leve, moderada y severa, en base a la integridad de las capas de la retina y al desplazamiento anterior de las mismas por la presencia de infiltrado inflamatorio.

Referente al criterio de respuesta inflamatoria, en el grupo control se observó una respuesta leve en 30% de las muestras y 70% presentó una respuesta inflamatoria moderada, mientras que en el Grupo 1 se observó una respuesta inflamatoria leve en 50% de las muestras y 50% con respuesta moderada. En el Grupo 2 no se observó respuesta inflamatoria en 20% de las muestras, sin embargo, 60% presentó respuesta inflamatoria escasa, 10% con respuesta inflamatoria leve y 10% con respuesta inflamatoria moderada. En el Grupo 3 no se observó respuesta inflamatoria en 50% de las muestras, 40% presentó respuesta inflamatoria escasa y 10% presentó una respuesta leve (Figura 2).

Con respecto a la integridad anatómica, 30% del grupo control sufrió una alteración leve y 70% presentó una alteración

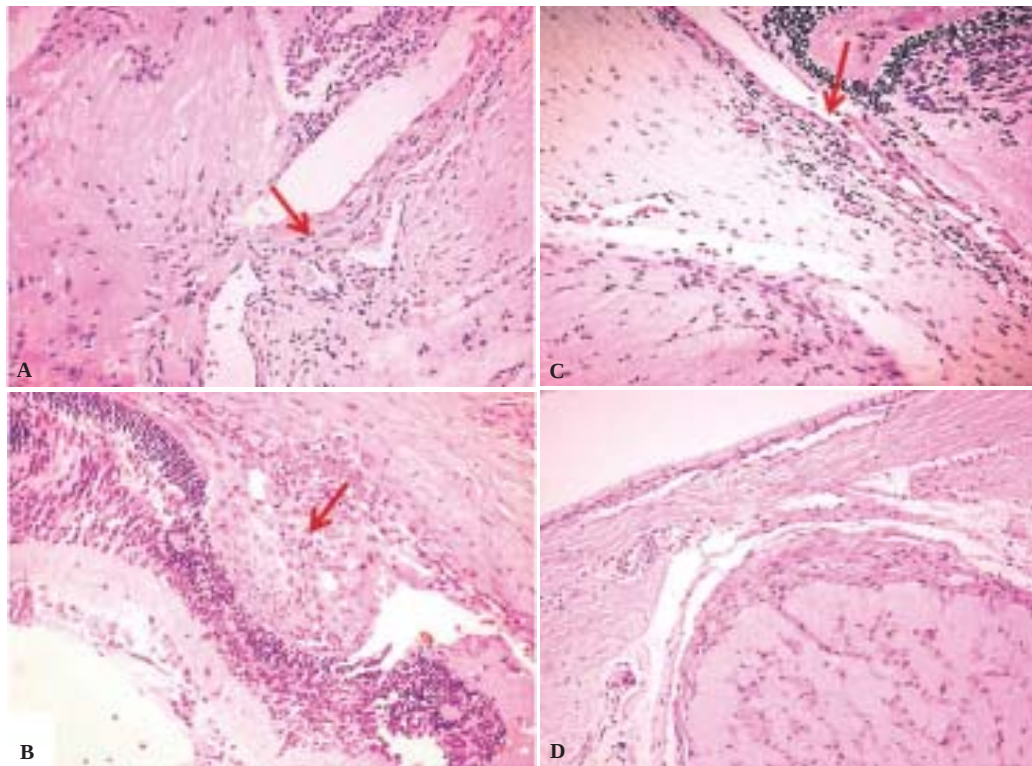


Figura 2. Respuesta inflamatoria e integridad anatómica en cortes histológicos de retina. Fondo de ojo (polo posterior) de rata con tinción HE. (40X). **A.** Infiltrado Inflamatorio crónico leve (↑) con discontinuidad y desplazamiento anterior de las capas superficiales de la retina. **B.** Infiltrado inflamatorio crónico moderado (↑) con desplazamiento anterior importante de las capas superficiales de la retina. **C.** Infiltrado inflamatorio crónico escaso (↑), tejido de proliferación y pérdida leve de la anatomía. **D.** Ausencia de infiltrado inflamatorio, tejido de proliferación y con integridad de la anatomía.

moderada, mientras que en el Grupo 1, 50% presentó una alteración leve y el otro 50% de las muestras una alteración moderada. En el Grupo 2, 80% de las muestras mantuvo conservada su integridad anatómica, 10% presentó alteración leve y 10% restante una alteración moderada. En el Grupo 3 90% de las muestras mantuvo conservada su integridad anatómica y el 10% sólo sufrió una alteración leve (Figura 2).

Al analizar en conjunto los resultados obtenidos en la respuesta inflamatoria de los cuatro grupos, se observó una tendencia a disminuir esta condición en los grupos que recibieron el implante intravítreo con mESC en comparación con los grupos no tratados, así como una respuesta notoriamente favorable en el Grupo 3, mismo que recibió 50,000 células por dosis (Figura 3).

De igual forma, se puede apreciar que el Grupo 3 mantuvo conservada su integridad anatómica en casi todos los casos, a diferencia del grupo control y el Grupo 1 que se vieron afectados en su mayoría presentando una alteración de la anatomía de moderada a leve (Figura 4).

En virtud de que en el Grupo control y en el Grupo 1 hubo una pérdida de la anatomía y no se encontró una mejora en la cicatrización, podemos afirmar que la solución salina balanceada que se utilizó como vehículo para re suspender las mESC, de ninguna manera influyó para que en los grupos 2 y 3 se presentara una menor respuesta inflamatoria y se con-

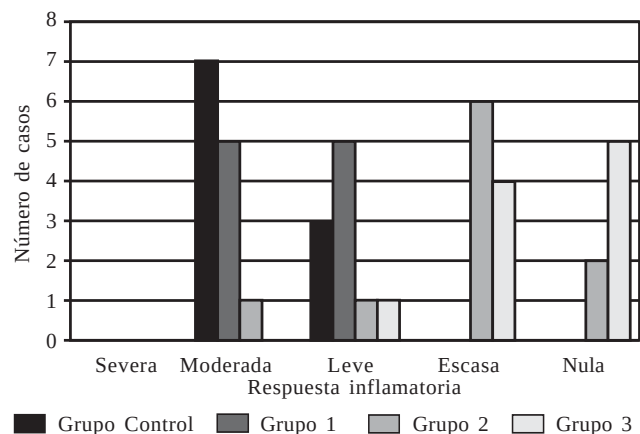


Figura 3. Respuesta inflamatoria en los cuatro grupos de estudio.

servara la integridad anatómica, conllevando a una significativa cicatrización.

Análisis estadístico

Los tratamientos fueron asignados aleatoriamente. Las dos variables (respuesta histológica e integridad anatómica) se midieron en escala ordinal. Se usó ANOVA de un factor

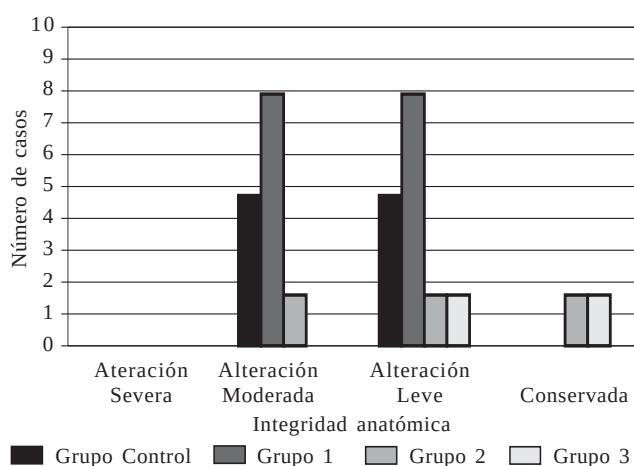


Figura 4. Integridad anatómica en los cuatro grupos de estudio.

para juzgar la significancia estadística (software estadístico empleado: Statistica 8.0). Para las dos variables se encontró que entre el Grupo control y el Grupo 1 no mostraron diferencia estadísticamente significativa. Lo mismo ocurrió en los grupos 3 y 4. Sin embargo, entre los dos pares de grupos así agrupados, se comprobó diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.000001$).

Discusión

El empleo de SC en enfermedades retinianas es un tratamiento prometedor hoy en día que está en investigación activa y que cada vez es más empleado para estudios experimentales, sin embargo, los estudios clínicos son muy escasos y los que existen son con un número de muestra no significativo, los cuales están más enfocados a enfermedades vasculares de la retina como es la retinopatía diabética, así como retinopatías degenerativas o distrofias retinianas (AMD, retinitis pigmentosa y enfermedad de Stargardt).^{12,13} Los primeros enfoques de las terapias con SC en retina han sido empleados para regenerar tejidos dañados como son el epitelio pigmentario de la retina y los fotorreceptores, en tanto el reemplazo de toda la retina con SC diferenciadas es un objetivo más ambicioso.

En virtud de que el objeto del empleo de SC en retina es reemplazar las células dañadas y preservar la función celular, el presente estudio trata de demostrar que en el trauma ocular en donde se ve afectada la integridad anatómica de la retina y como consiguiente su función provocando una disminución o pérdida de la visión, la cual afecta severamente la calidad de vida de los pacientes y sus familias, asociándose con un impacto económico profundo. De acuerdo con nuestros resultados, podemos decir que el tratamiento con terapia de reemplazo celular en trauma ocular es útil para preservar la anatomía de la retina y probablemente presentaría una mejoría de la agudeza visual.

En nuestro estudio no se encontraron datos histológicos de neoplasias (teratomas) a las 11 semanas poste-

riores al implante de mESC a diferencia de Arnhold y Chaudhry y cols., quienes reportaron la presencia de teratomas a las seis y ocho semanas, respectivamente, posteriores al implante de ESC diferenciadas,^{15,16} lo cual nos puede sugerir una mayor utilidad al implantar SC indiferenciadas. Igualmente no se encontraron datos de rechazo, hiperproliferación o tejido ectópico en tres meses de seguimiento, los cuales son similares a lo reportado por Steven y cols.¹⁴

Actualmente no se cuentan con estudios clínicos de trauma ocular con manejo de células pluripotentes, sin embargo, se llevan a cabo estudios clínicos con distrofias retinianas como el de James Bainbridge y cols. (2011), quienes están implantándolas en dosis de 50,000 a 200,000 ESC a pacientes mayores de 18 años con alguna distrofia de retina.

En nuestro estudio se implantaron 20,000 y 50,000 células por dosis, sin observar una diferencia estadísticamente significativa en los resultados entre ambos grupos, sin embargo, en el grupo en el que se implantaron 50,000 no hubo un solo caso de respuesta inflamatoria ni alteración de la anatomía moderada que clínicamente pudiera ser muy útil. Por lo anterior, este estudio abre las puertas a futuras investigaciones en las cuales se pueda valorar la efectividad *versus* costo-beneficio del empleo de células pluripotentes a diferentes concentraciones.

Se necesitan más ensayos clínicos controlados aleatorios del empleo de SC en retina, no solamente para enfermedades vasculares, distrofias o degeneraciones, sino para cualquier patología en la que se vea afectada la anatomía y la función de la retina como es el trauma ocular, para evaluar la toxicidad, establecer la seguridad, la dosis y determinar si el empleo de estas células es eficaz en el tratamiento de una condición en particular.

Conclusiones

El implante de mESC es eficaz para una mejor cicatrización de lesiones retinianas traumáticas al reducir la respuesta inflamatoria y restaurar la integridad anatómica, pero es necesario continuar con protocolos de investigación para determinar otros parámetros como localización y biodistribución de las mESC, dosis terapéuticas y seguimientos a largo plazo.

Consideraciones finales

Este trabajo experimental de ciencia básica fue galardonado con el “XIII Premio Bienal de Oftalmología”, reconocimiento Nacional que otorga la Sociedad Mexicana de Oftalmología y la Universidad Nacional Autónoma de México, como estímulo al mejor trabajo de investigación en el área de Oftalmología.

Agradecimientos

El trabajo fue apoyado por el Programa Presupuestario A022-2014. Agradecemos la colaboración para la realización

del trabajo al Mayor Médico Veterinario Alejandro Camacho Ibarra y a los Médicos Oftalmólogos Retinólogos Mayor Médico Cirujano Gabriel Antonio Ochoa Maynez y Médico Cirujano Jesús Óscar Moya Romero.

Referencias

1. Lima GV, Albarrán SE. Manejo inicial de las lesiones retinianas traumáticas en el servicio de urgencias. *Rev Hosp Jua Mex* 2006; 73(4): 165-9.
2. Lima GV, Barrera FV. Lesiones traumáticas retinianas que requieren atención urgente. ¿Es indispensable la evaluación del fondo de ojo en la sala de trauma? *Cir Ciruj* 2007; 75: 65-9.
3. Hill JR, Crawford BD, Lee H, Tawansy KA. Evaluation of open globe injuries of children in the last 12 years. *Retina, the journal of retinal and vitreous diseases* 2006; 26 (7): s65-s68.
4. Razo-Blanco-Hernández DM, Pérez BX, Sánchez NM, Lima GV. Estimación del daño por trauma ocular en pediatría sin la evaluación de la agudeza visual. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2011; 68: 363-8.
5. García-Arumí J, Matínez-Castillo V, et al. Guiías de tratamiento del desprendimiento de retina rhegmatoigeno. *Arch Soc Esp Ophthalmol* 2013; 88(1): 11-35.
6. Schmeer CW, Wohl SG, Isenmann S. Cell-replacement therapy and neural repair in the retina. *Cell Tissue Res* 2012; 349: 363-74.
7. Brunt KR, Weisel RD, Ren-Ke L. Stem cells and regenerative medicine future perspectives. *Can J Physiol Pharmacol* 2012; 90: 327-35.
8. Mata-Miranda MM, Vázquez-Zapién GJ, Sánchez-Monroy V. Generalidades y aplicaciones de las células madre. *Perinatol Reprod Hum* 2013; 27(3): 194-9.
9. Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashmmakhi N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med* 2008; 2: 169-83.
10. Piscaglia AC. Stem cells, a two-edged sword: Risks and potentials of regenerative medicine. *World J Gastroenterol* 2008; 14(27): 4273-9.
11. Comyn O, Lee E, Maclaren RE. Induced pluripotent stem cell therapies for retinal disease. *Curr Opin Neurol* 2010; 23(1): 4-9.
12. Brunt KR, Weisel RD, Li RK. Stem cells and regenerative medicine future perspectives. *Can J Physiol Pharmacol* 2012; 90(3): 327-35.
13. Krohne TU. Stem cell therapy in retinal diseases, current preclinical research results and upcoming clinical trials. *Retinal Physician* 2011; 26-9.
14. Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, Franco-Cardenas V, Pan CK, Ostrick RM, Mickunas E, et al. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet* 2012; 379: 713-20.
15. Arnhold S, Klein H, Semkova I, Addicks K, Schraermeyer U. Neurally selected embryonic stem cells induce tumor formation after long-term survival following engraftment into the subretinal space. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(12): 4251-5.
16. Chaudhry GR, Fecek C, Lai MM, Wu WC, Chang M, Vasquez A, et al., Trese MT. Fate of embryonic stem cell derivatives implanted into the vitreous of a slow retinal degenerative mouse model. *Stem Cells Dev* 2009; 18(2): 247-58.

