



Máster en Investigación en Ciencias de la Visión

2018-2019

Universidad de Valladolid

Trabajo de Fin de Máster

EVALUACIÓN IN VITRO DEL POTENCIAL NEUROPROTECTOR DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES SOBRE LOS FOTORRECEPTORES

Kevin Louis Puertas Neyra

Directores

Dr. Ricardo Usategui Martín

Dr. Iván Fernández Bueno

AGRADECIMIENTOS:

A mi madre, por supuesto.

Al grupo de Retina del IOBA.

Al Dr. Iván Fernández, mi director. Por todo lo que me enseñó, como veterinario e investigador.

Al Dr. Ricardo Usategui, mi director. Por toda la entrega que puso en este trabajo y su apoyo incondicional.

A la Dra. Yolanda Diebold, coordinadora del máster. Por su guía y apoyo desde que llegué a IOBA.

A Antonio, Carmen, Mayte y Nieves. Por ayudarme siempre que lo necesité.

A Ioanna Souliotti. Futura bióloga y amiga que aportó mucho en el desarrollo de este trabajo.

A Sandra Regen. Mi compañera en este gran viaje. Por todo su apoyo y cariño sinceros.

A los amigos que conocí en España y estuvieron siempre conmigo.

A mi familia en Perú, mis amigos.

Al Dr. Juan Carlos Lau-Choleón. Mi maestro en la medicina veterinaria. Hace mucho le debía una deferencia de esta índole.

ÍNDICE DE CAPITULOS

Curriculum Vitae	1
Resumen y Abstract	3
1. Introducción	5
1.1. Justificación	7
2. Hipótesis y objetivos	9
3. Material y métodos	11
3.1. Cultivos celulares y condiciones de cultivo	11
3.1.1. Células madre mesenquimales	11
3.1.2. Línea celular Hek293T	11
3.2. Cultivo organotípico	11
3.2.1. Procedencia de los globos oculares	11
3.3.2. Preparación de los explantes de neuroretinas porcinas	11
3.3.3. Condiciones experimentales	12
3.4. Array de anticuerpos: análisis del perfil de expresión de 1000 proteínas	12
3.5. Procesamiento de las muestras de neuroretinas	13
3.6. Técnicas de tinción con hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica	13
3.6.1. Tinción con H-E de explantes retinianos incluidos en parafina	13
3.6.2. Técnicas de inmunohistoquímica	13
3.6.3. Caracterización inmunofenotípica de las MSCV	14
3.7. Microscopía	14
3.8. Morfometría de los explantes de neuroretina y conteo de núcleos	15
3.9. Evaluación cuantitativa de las inmunohistoquímicas	15
3.10. Análisis estadístico	15
4. Resultados	17
4.1. Evaluación morfológica y morfométrica de las neuroretinas	17
4.2. Caracterización inmunohistoquímica de las neuroretinas	19
4.2.1. Caracterización inmunohistoquímica de los fotorreceptores retinianos	19
4.2.1.1. Caracterización inmunohistoquímica de los conos	19
4.2.1.2. Caracterización inmunohistoquímica de los bastones	20
4.2.2. Caracterización inmunohistoquímica de células bipolares de bastón	21
4.2.3. Caracterización de las células de la glía	22
4.3. Caracterización inmunofenotípica de las MSCV tras el cultivo organotípico	23
4.4. Análisis del perfil de expresión de 1000 proteínas	24
5. Discusión	27
5.1- Evaluación morfológica y morfométrica de las neuroretinas	27
5.2- Evaluación inmunohistoquímica de las neuroretinas	29
5.3- Evaluación del perfil proteico secretado por las MSCV en contacto con neuroretinas en neurodegeneración	30
6. Conclusiones	35
7. Bibliografía	37
8. Anexos	39

RESUMEN:

La degeneración de los fotorreceptores (FR) es un proceso en el cuál confluyen diversas enfermedades neurodegenerativas de la retina como son la degeneración macular asociada a edad o la retinitis pigmentosa. Enfermedades que representan unas de las principales causas de ceguera a nivel mundial ya que actualmente carecen de un tratamiento realmente efectivo. Las terapias avanzadas se muestran como una alternativa para el tratamiento de este tipo de patologías; entre ellas, la terapia celular mediada por factores paracrinos se perfila como la alternativa más viable. En este sentido, la utilización de células madre mesenquimales (MSCs) podría frenar la degeneración que sufren los FR retinianos en este tipo de patologías. Por ello éste trabajo se planteó el estudio inmunohistoquímico de los FR tras el cocultivo de la retina con las MSCs y el análisis del secretoma proteico tras el cocultivo. Los resultados del presente trabajo mostraron como las MSCs tenían la capacidad de frenar la neurodegeneración de la capa de FR de la retina. Lo que sugiere su posible futura aplicación en tratamientos de terapia celular destinados a pacientes que sufren distrofias retinianas que cursan con la degeneración de los FR. También se muestra como el efecto neuroprotector desarrollado por las MSCs se podría basar en la secreción de factores proteicos por parte de las MSCs, que estarían destinados a contrarrestar los procesos típicos de la degeneración retiniana. Todo ello sienta las bases para, en un futuro, elaborar terapias neuroprotectoras basadas en la combinación de factores neuroprotectores procedentes de las MSCs.

ABSTRACT:

Photoreceptor layer degeneration is a common process in several degenerative retinal diseases, such as age-related macular degeneration or retinitis pigmentosa. Currently, these diseases, constitutes the leading causes of blindness worldwide because there is not an effective treatment available. Advanced therapies could be an alternative for these kind of retinal diseases; in fact, cell-based therapy via paracrine neuroprotection effect seems to be the most viable alternative. In this sense, the paracrine effect of the mesenchymal stem cells (MSCs) could slow down the photoreceptor degeneration. Therefore, the aim of the study was to the immunohistochemically analysis of photoreceptors after coculture of the retina with MSCs, and the protein secretome analysis after coculture. The results showed that MSCs had the capacity to stop the neurodegeneration of the photoreceptors layer. It results suggests that it could be possible the application of cell therapy treatments for patients suffering retinal dystrophies that curse with the degeneration of photoreceptors. The results also showed that the neuroprotective effect developed by MSCs is based on the secretion of protein factors by MSCs that could be used to counteract the typical processes of retinal degeneration. All this suggests, that in the future, it could be possible develop neuroprotective therapies based on the combination of neuroprotective factors from the MSCs.

1- INTRODUCCIÓN

La retina es un tejido multicapa sensible a la luz, conformado por neuronas interconectadas que llevan a cabo las primeras etapas del procesamiento visual. Los fotorreceptores (FR) son neuronas altamente especializadas que transforman los fotones de la luz en señales electroquímicas mediante un proceso denominado fototransducción. La retina humana posee dos tipos de FR; los bastones y los conos. Los bastones son empleados en condiciones de baja intensidad y movimiento de luz, mientras que los conos en la visión luminosa y a color. Los FR son esenciales para iniciar el procesamiento visual (1).

La complejidad funcional y estructural de la retina hacen a este tejido particularmente susceptible de sufrir diversos procesos degenerativos; no obstante, independientemente de la etiología y la patogénesis, la respuesta al daño es muy similar en todos los procesos, tanto a nivel celular como molecular (1,2). Por ello las enfermedades neurodegenerativas de la retina comparten cambios morfológicos y alteraciones funcionales semejantes durante su desarrollo, existiendo variabilidad en cuanto a la rapidez de la progresión de la enfermedad y el tipo celular afectado en primera instancia (1).

La neurodegeneración de la retina implica principalmente mecanismos de muerte celular programada, inflamación y estrés oxidativo (1). Las primeras alteraciones se evidencian a nivel de la retina externa, afectando principalmente a los FR. La activación de las vías apoptóticas dependientes e independientes de caspasa conllevan a una pérdida progresiva de estas células. El remodelamiento de los FR implica: translocación y redistribución de las opsinas desde los segmentos externos (OS, del inglés *outer segment*) hacia la capa nuclear externa (ONL, del inglés *outer nuclear layer*), acortamiento de los OS, tumefacción de los segmentos internos (IS, del inglés *inner segment*), disrupción de OS e IS, y picnosis de los núcleos celulares. Asimismo se inicia la activación y proliferación de las células gliales (gliosis). Estas células sufren un proceso de hipertrofia, hiperplasia y elevación en la producción de proteínas, como la GFAP (del inglés *glial fibrillary acidic protein*) (2,3). De la misma manera, otras células de la retina también sufren modificaciones progresivas que contribuyen a la pérdida de la función retiniana en las etapas tardías de la degeneración (1).

Entre las diferentes enfermedades neurodegenerativas de la retina que cursan con la degeneración de FR, se pueden destacar por su relevancia la retinitis pigmentosa (RP) y la degeneración macular asociada a la edad (DMAE). La RP es considerada como un grupo de enfermedades genéticamente heterogéneas que afectan directamente a los FR o al epitelio pigmentario de la retina (EPR) (4). La DMAE es una enfermedad multifactorial que afecta directamente al EPR y de manera colateral a los FR (5). Ambas enfermedades no tienen tratamientos realmente eficaces y lideran las causas de ceguera a nivel mundial. Para el caso de la RP no existe tratamiento, excluyendo costosas terapias génicas solo disponibles para la mutación del gen RPE65 en homocigosis (LuxturnaTM, Spark Therapeutics). En cuanto a la DMAE, solo existe tratamiento para la de tipo neovascular, utilizando antiangiogénicos anti-VEGF (del inglés, *vascular endothelial growth factor*); sin embargo aquellos afectados por DMAE atrófica (90% de los pacientes) no disponen de tratamiento en la actualidad (5,6).

En este sentido, las terapias avanzadas suponen una opción terapéutica para las enfermedades de tipo neurodegenerativo. Particularmente, la terapia basada en células madre posee un gran potencial en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas de la retina (1). El uso de agentes neuroprotectores permite rescatar los FR, sin importar la causa genética específica o microambiental subyacente (4). Actualmente, la terapia celular más difundida en la práctica clínica es la que utiliza células madre mesenquimales (MSCs, del inglés *mesenchymal stem cells*) debido a que están libres de dilemas éticos (a diferencia de las células madre embrionarias), son rápidamente expandibles y fáciles de aislar (a diferencia de las células madre pluripotentes inducidas) (7).

Las MSCs son células inmunoprivilegiadas (no expresan complejo mayor de histocompatibilidad tipo 2 en su superficie) y multipotentes (con capacidad de diferenciarse en distintos linajes celulares, incluido neuronas y glía). Pueden proceder de médula ósea (MO), tejido adiposo, cordón umbilical, placenta y otros tejidos mesenquimales. Las MSCs presentan dos propiedades de importancia clínica en la terapia neuroprotectora: la neuroprotección a través de su capacidad de reemplazar a las células dañadas y de su efecto paracrino. El reemplazo celular por el momento parece inviable en la práctica clínica, debido a que requiere una diferenciación masiva de MSCs en células retinianas funcionales; sin embargo, la utilización de sus propiedades paracrinas para el rescate de células retinianas en degeneración es actualmente la opción más factible (7,8).

Las MSCs secretan citoquinas y factores de crecimiento con efecto trófico, inmunomodulador, antiapoptótico y proangiogénico, que estimulan la reconexión neuronal y la remielinización axonal, disminuyen la apoptosis y regulan el proceso inflamatorio (9). La inyección intravítrea de MSCs ya se ha evaluado en modelos murinos de distintas patologías, entre ellas RP, glaucoma, degeneración e isquemia retiniana, donde han demostrado que los factores secretados por las MSCs poseen efectos neuroprotectores (10,12). Asimismo, Siqueira et al. (2015) demostraron la seguridad y viabilidad de las inyecciones intravítreas de aspirados de MO en humanos, y además demostraron que las células de MO pueden tener un efecto terapéutico sobre las enfermedades degenerativas retinianas. Pese a que estos estudios respaldan el uso de aspirados de MO, es de esperar que células madre de MO específicas y bien caracterizadas posean un potencial terapéutico mayor; asimismo estas últimas permitirían su uso alogénico a diferencia de los aspirados de MO, debido a la ausencia de inmunogenicidad (13).

Con la finalidad de evaluar la efectividad de la terapia celular en las enfermedades neurodegenerativas de la retina, el Grupo de Retina del Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada de la Universidad de Valladolid (IOBA-UVa) ha desarrollado un modelo *ex-vivo* de neurodegeneración retiniana a partir de un cultivo organotípico de neurorretina (NR) porcina, válido para el estudio de los cambios fisiopatológicos que se producen en la retina durante los procesos neurodegenerativos.

Los cultivos organotípicos de retina son modelos tisulares *in-vitro* que mantienen la dinámica entre múltiples tipos celulares y la matriz extracelular; debido a ello se consideran modelos comparables a las condiciones *in-vivo*, especialmente de aquellas patologías que afectan a la

retina externa (14). Estos modelos proporcionan información muy valiosa respecto a la fisiopatología de los procesos neurodegenerativos, el rol de los factores de crecimiento, la terapia con células madre, y además, han sido útiles en la prueba de sustancias tóxicas y terapéuticas (15). Durante el cultivo *in-vitro* de explantes retinianos, se observan diferentes signos de degeneración, incluyendo: edema tisular, hipertrofia, proliferación y migración del núcleo de las células de Müller, degeneración temprana de los OS y adelgazamiento del tejido (16). Estos mismos cambios morfológicos han sido descritos en diversas enfermedades degenerativas de la retina como la DMAE, RP, retinopatía diabética y glaucoma (1).

Por todo ello, el presente estudio pretende evaluar el potencial neuroprotector de las MSCs sobre los FR de la retina y determinar los factores secretados por las MSCs que puedan estar involucrados en el proceso de neuroprotección, en un modelo *in vitro* de cocultivo de MSCs y NR porcinas.

1.1- Justificación.

La degeneración de los FR es un proceso en el cual confluyen diversas enfermedades neurodegenerativas de la retina como pueden ser la DMAE o la RP. Enfermedades que presentan una elevada prevalencia a nivel mundial y actualmente carecen de un tratamiento realmente efectivo para contrarrestar tanto su sintomatología como progresión. Las terapias avanzadas se muestran como una alternativa para el tratamiento de este tipo de patologías; entre ellas, la terapia celular mediada por factores paracrinos se perfila como la alternativa más viable y que mejores resultados ha presentado en estudios pre-clínicos y clínicos. En este sentido, la utilización de células madre mesenquimales podría frenar la degeneración que sufren los FR retinianos en este tipo de patologías, su efecto neuroprotector podría producirse gracias a la secreción de factores proteicos por parte de las células madre destinados a contrarrestar los fenómenos asociados a la degeneración retiniana. El presente estudio sigue la línea de investigación de trabajos anteriores del Grupo de Retina del IOBA-UVa, cuya finalidad conjunta es la aplicación de terapias celulares en procesos degenerativos retinianos, los resultados obtenidos de esta investigación contribuirán sustancialmente a este fin.

2- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis:

Las células madre mesenquimales (MSCs) secretan factores paracrinos con propiedades neuroprotectoras que retrasan la degeneración de los fotorreceptores (FR) neuroretinianos.

2.2. Objetivos.

2.2.1. Objetivo general.

- Evaluar *in vitro* el potencial neuroprotector de las MSCs sobre los FR, en un cocultivo de MSCs y neuroretinas (NR) porcinas.

2.2.2. Objetivos específicos.

- Evaluar los cambios morfológicos ocurridos en los FR de NR porcinas cultivadas en presencia y en ausencia de MSCs.

- Analizar los factores paracrinos secretados por las MSCs en cocultivo con NR porcinas, como potenciales responsables de efectos neuroprotectores.

3- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Cultivos celulares y condiciones de cultivo.

3.1.1. Células madre mesenquimales.

El estudio utilizó células madre MSCV (del inglés, *Mesenchymal Stem cells from Valladolid*). Las MSCV son células mesenquimales procedentes de MO de donantes humanos, criopreservadas y reexpandidas. Están aprobadas por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) bajo el registro de producto en fase de investigación (PEI) 15-007 para su uso autólogo y alogénico. Las MSCV fueron suministradas por la Unidad de Producción Celular (UPC) del Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM) de la UVa, procedentes de diferentes donantes, a una concentración de 1×10^6 células/ml.

Se sembraron 30.000 células/pocillo en placas de cultivo Transwell® de 6 pocillos cada una (Corning Inc, Corning, NY, E.E.U.U) utilizando medio DMEM (del inglés *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Gibco®, Paisley, Reino Unido) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de antibiótico/antimicótico (100 U/ml de Penicilina, 100 µg/ml de Estreptomicina y 2,5 µg/ml de Anfotericina B, Gibco®, Invitrogen, Paisley, UK) y 1% de L-Glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). Se cultivaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 72 horas antes de iniciar el cocultivo con las NR porcinas.

3.1.2. Línea celular Hek293T.

La línea celular Hek293T es una línea celular inmortalizada procedente de riñón humano. Estas células fueron cedidas por cortesía del Prof. Rogelio González Sarmiento, Director de la Unidad de Medicina Molecular de la Universidad de Salamanca (USAL). Se sembraron 10.000 células/pocillo en placas de cultivo Transwell® de 6 pocillos cada una utilizando medio DMEM suplementado con 10 % de SFB, 1% de antibiótico y 1% de L-Glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). Se cultivaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 72 horas antes de iniciar el cocultivo con las NR porcinas. Esta línea celular se utilizó como control del efecto neuroprotector que podrían conceder las MSCV.

3.2. Cultivo organotípico.

3.2.1. Procedencia de los globos oculares.

El experimento se llevó a cabo utilizando 9 globos oculares de cerdos entre 6 y 8 meses de edad, procedentes del matadero Justino Gutiérrez S.L. (Laguna de Duero, Valladolid, España); fueron recogidos en medio DMEM suplementado con 1% de antibiótico/antimicótico y trasladados al laboratorio manteniendo la cadena de frío.

3.3.2. Preparación de los explantes de neuroretinas porcinas.

Para la preparación de los explantes de NR porcina se siguió el protocolo descrito por Fernandez-Bueno et al. (2012) (2). A modo de resumen, de cada NR se recortaron 4 explantes adyacentes de aproximadamente 5x5 mm en el *área centralis*. De los explantes extraídos, se

utilizó uno para ser directamente procesado y empleado como control para evaluar el estado de las NR previo al inicio del cultivo. Los otros 3 explantes se depositaron sobre la membrana de los pocillos de la placa Transwell® (0.4 µm de poro) colocando los OS de los FR de en contacto con la membrana de las cestillas Transwell®.

3.3.3. Condiciones experimentales.

El experimento se llevó a cabo utilizando 9 placas de cultivo Transwell®. En las cuales se distribuyeron las condiciones experimentales según se muestra en la figura 1. El cultivo se realizó utilizando medio DMEM/Neurobasal A (1:1) suplementado con 10% de FBS, 1% de L-glutamina, 2% B-27 y 1% de antibiótico/antimicótico. Las condiciones de cultivo fueron a 37°C en una atmósfera enriquecida al 5% de CO₂.

El cultivo organotípico se mantuvo durante 72 horas. Los sobrenadantes de cada condición experimental se retiraron a las 24, 48 y 72 horas y se recogieron en tubos de 1,5 ml (Eppendorf, Corning, NY, EE.UU.). El medio retirado se almacenó en ultra-congelación a -80°C hasta su utilización.

El cultivo organotípico se realizó por triplicado.

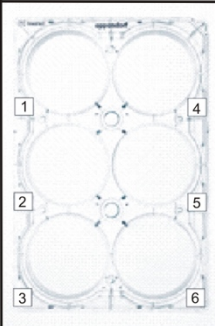
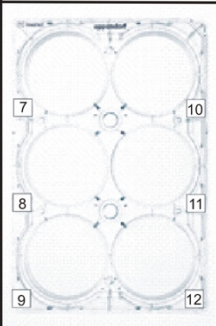
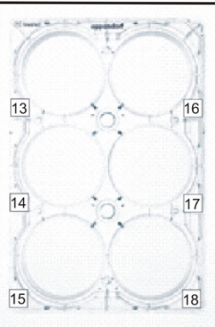
Placa 1		Placa 2		Placa 3	
					
-NR -MSCV -Medio de cultivo	-NR -Células Hek 293T -Medio de cultivo	-NR -Medio de cultivo	-MSCV -Medio de cultivo	-Células Hek 293T -Medio de cultivo	-Medio de cultivo

Figura 1: Distribución de las condiciones experimentales del cultivo organotípico (NR: neurorretina, MSCV: *Mesenchymal Stem Cells from Valladolid*).

3.4. Array de anticuerpos: análisis del perfil de expresión de 1000 proteínas.

El array de anticuerpos se llevó a cabo en colaboración con la Unidad de Proteómica de la USAL dirigida por el Dr. Manuel Fuentes. El medio de cultivo recogido de las diferentes condiciones experimentales fue incubado con un array de anticuerpos humano de forma semi-cuantitativa para detectar el patrón de expresión de 1000 proteínas implicadas en neuroprotección, inflamación, respuesta inmunitaria, oxidación y apoptosis (RayBio Human Cytokine Antibody Array G series 4000, Raybiotech, Norcross GA, USA). Se llevó a cabo en medios de cultivo procedentes de monocultivo de MSCV y de cocultivo de MSCV y NR tras 24 horas de cultivo.

El medio de cultivo sin diluir fue incubado en un array (slide) con cuatro subarrays idénticos (4 réplicas para cada muestra) durante 2 horas. Tras sucesivos lavados, los arrays fueron incubados con una mezcla anticitoquinas conjugado con biotina durante otras dos horas. Tras un nuevo lavado e incubación de dos horas, para la amplificación y detección mediante estreptavidina conjugada con Cy3, los arrays fueron analizados utilizando un escáner GenePix® 4000B (Molecular D Sevice, Sunnyvale, CA, USA). Los valores de señal de fluorescencia fueron analizados con el software GenePix 6.0 (Molecular D Sevice, Sunnyvale, CA, USA).

Las señales fueron normalizadas utilizando controles positivos y negativos internos incluidos en el array. Los controles positivos (POS1, POS2, POS3) consistieron en cantidades equivalentes de IgGs biotiniladas unidas directamente en el array; mientras que los negativos, correspondieron a intensidades no específicas de anticitoquinas conjugadas con biotina.

3.5. Procesamiento de las muestras de neurorretinas.

Tras finalizar el cocultivo organotípico, se retiraron los pocillos junto al explante de NR adherido a la membrana porosa, y se recortó la membrana delimitando el explante. Los explantes fueron divididos en 2 porciones con la finalidad de incluir una mitad en parafina y criopreservar la otra, siguiendo los protocolos establecidos por el Laboratorio de Anatomía Patológica del IOBA-UVa. Sobre los explantes incluidos en ambas condiciones, se realizaron cortes no seriados de 5µm en un microtomo (RM2145; LEICA, Minnesota, EE.UU.) y cortes de 5µm con un criostato (CM 1900; Leica, Nussloch, Alemania) que fueron recogidos en portaobjetos comerciales tratados (SuperFrost® Plus; Menzel-Gläser, Braunschweig, Alemania). Posteriormente, fueron sometidos a pruebas inmunohistoquímicas y de tinción con hematoxilina-eosina (H-E).

3.6. Técnicas de tinción con hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica.

3.6.1. Tinción con H-E de explantes retinianos incluidos en parafina.

Se llevó a cabo la tinción con H-E siguiendo el protocolo establecido por el Laboratorio de Anatomía Patológica del IOBA-UVa a partir de cortes no seriados de 5µm incluidos previamente en parafina de cada una de las muestras. A modo de resumen, las muestras fueron desparafinadas con Xilol (Sigma-Aldrich), rehidratadas en concentraciones decrecientes de alcohol, teñidas con Hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU), lavadas, teñidas con Eosina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU), deshidratadas con concentraciones crecientes de alcohol y finalmente fueron cubiertas con láminas cubreobjetos.

3.6.2. Técnicas de inmunohistoquímica.

Se llevaron a cabo en cortes de 5 µm de las muestras conservadas en parafina y criopreservación. Se siguió el protocolo establecido por el Laboratorio de Anatomía Patológica del IOBA-UVa para inmunofluorescencias utilizando anticuerpos secundarios específicos de especie ligados a fluoróforos (Alexa Fluor, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) en una dilución de 1:200 en PBS durante 1 hora a TA. Para la tinción de núcleos se utilizó el marcador DAPI (2-4-amidinofenil-1H-indol-6-carboxamida; 10µg/ml) durante 5 minutos a TA. Se utilizaron cortes de muestras embebidas en parafina para la IF de Rodopsina (RHO) y GFAP, mientras que

para el resto de marcadores moleculares se utilizaron criosecciones. Para la IF con Lectina PNA (del inglés, *peanut agglutinin*) se realizó un protocolo de IF directa. Los anticuerpos primarios utilizados en el estudio de cada una de las proteínas analizadas y sus condiciones de uso se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados y condiciones de uso.

Marcador molecular	Origen	Casa comercial	Concentración	Tiempo de incubación	Temperatura de incubación	Especificidad
Glial fibrillary acid protein (GFAP)	Policlonal de conejo	DakoCytomation Inc, #n1506 (Glostrup, Denmark)	1:250	1 hora	TA	Astrocitos, células de Müller (reactivas) (1)
Lectina PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	Molecular probes Inc #L-32458 (Eugene, Oregon, USA)	1:100	1 hora	TA	OS de conos (1)
Protein kinasa C, isoforma α (PKC α)	Policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology. #SC-108000 (Santa Cruz, CA, USA)	1:100	24 horas	TA	Células bipolares de bastón (1)
Rodopsina (RHO)	Policlonal de conejo	Chemicon-Millipore, #AB9279 (Temecula, CA, USA)	1:100	24 horas	4°C	OS de bastones (1)

3.6.3. Caracterización inmunofenotípica de las MSCV.

Las células MSCV fueron fijadas con metanol a -20°C (Panreac Química S.A.U., Barcelona, España) durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, para caracterizar el inmunofenotipo de las MSCV se utilizó el Kit comercial de caracterización para MSC humanas (Human Mesenchymal Stem Cell Characterization Kit, Millipore, Billerica, EE.UU.). Este kit contiene una selección de anticuerpos que actúan como marcadores positivos para moléculas de superficie presentes en las MSC (CD44, CD90, STRO-1 y CD146) y dos marcadores hematopoyéticos de superficie que no están presentes en MSC (CD14 y CD19). Se siguió el protocolo establecido por el kit (Human Mesenchymal Stem Cell Characterization Kit, Millipore, Billerica, EE.UU.).

3.7. Microscopía.

Para el estudio morfológico y de inmunofluorescencia se utilizó un microscopio DM4000B (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Las imágenes se obtuvieron mediante una cámara digital Leica DFC490 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). También se utilizó un microscopio confocal LEICA SP5 modelo DMI 6000B acoplado a un software informático LEICA LAS AF. Los estudios comparativos basados en la expresión de los marcadores inmunofluorescentes se llevaron a cabo en imágenes adquiridas con los mismos niveles de

exposición, intensidad y ganancia. El brillo y el contraste de las imágenes se ajustaron mediante el software Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems, San Jose, EE. UU).

3.8. Morfometría de los explantes de neuroretina y conteo de núcleos.

El espesor retiniano se evaluó utilizando el software ImageJ (versión 1.49, National Institute of Health, Bethesda, EE.UU.) a partir de imágenes a 40x de secciones no seriadas de NR porcinas teñidas con H-E (5 secciones por muestra). Se evaluó el grosor total, desde la membrana limitante externa (OLM, del inglés *outer limitant membrane*) hasta la membrana limitante interna (ILM, del inglés *inner limitant membrane*), y cada una de las siguientes capas por separado: ONL, capa plexiforme externa (OPL, del inglés *outer plexiform layer*), capa nuclear interna (INL, del inglés *inner nuclear layer*), capa plexiforme interna (IPL, del inglés *inner plexiform layer*) y la capa de células ganglionares (GCL, del inglés *ganglion cell layer*) que incluyó la capa de fibras nerviosas (NFL, del inglés *nerve fiber layer*). Asimismo, los núcleos fueron contados manualmente en un área de $100\mu\text{m}^2$, utilizando las imágenes y software definidos previamente.

3.9. Evaluación cuantitativa de las inmunohistoquímicas

Se cuantificó la inmunoreactividad de las micrografías realizadas sobre las inmunofluorescencias de cada marcador evaluado utilizando el software ImageJ. Las micrografías se dividieron en diferentes canales. Con la finalidad de extraer el fondo del canal de interés se utilizaron controles negativos para establecer el umbral, este mismo valor se utilizó en todas las micrografías que se analizaron en una misma inmunofluorescencia. Los valores de inmunofluorescencia fueron medidos es "unidades de fluorescencia normalizadas" (UFN) \pm SEM.

3.10. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa informático SPSS (versión 21.0, SPSS Inc., Chicago, EEUU). Se consideró la existencia de significación estadística cuando se halló un p-valor menor de 0,05.

El análisis descriptivo de los datos se realizó en términos de tendencia central (media) y de dispersión (desviación estándar). En el estudio de las posibles diferencias entre variables se aplicó un test ANOVA (del inglés *analysis of variance*) en el caso de que los datos cumplieren igualdad de varianzas (homocedasticidad) y siguiesen una distribución normal. La homocedasticidad y la distribución de las muestras se comprobaron con la aplicación del test de Levene y con el test de Kolmogrov-Smirnov respectivamente.

4- RESULTADOS

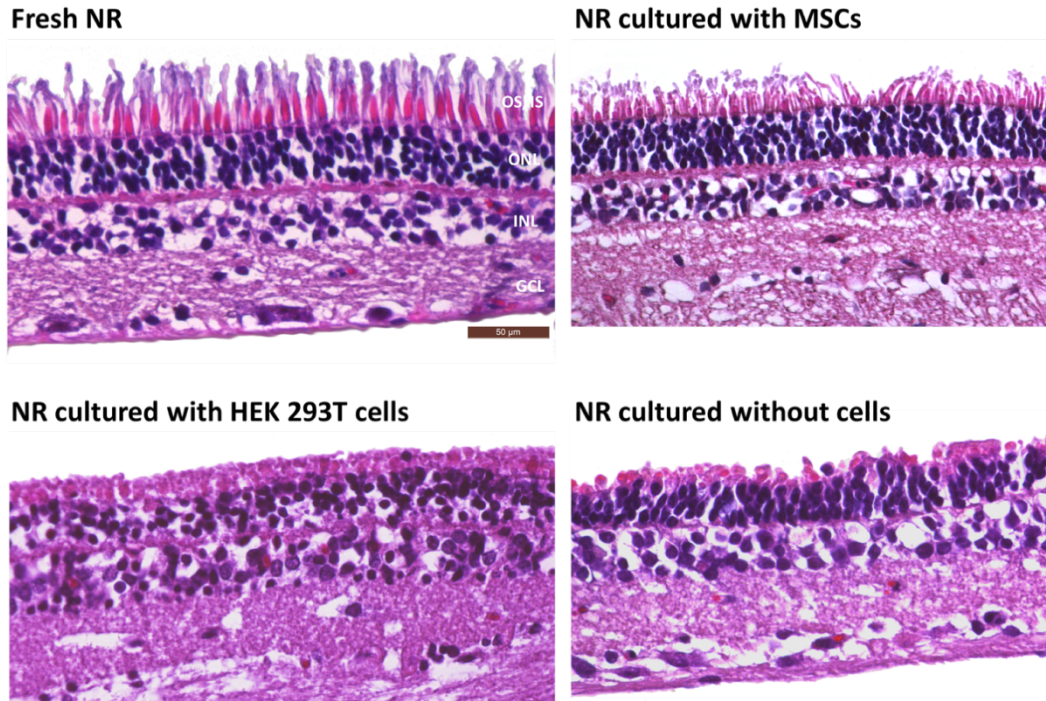
4.1. Evaluación morfológica y morfométrica de las neuroretinas.

Con el objetivo de evaluar los cambios histológicos sufridos en los explantes de NR después de cada condición experimental, se llevó a cabo un análisis morfométrico sobre las muestras teñidas con H-E.

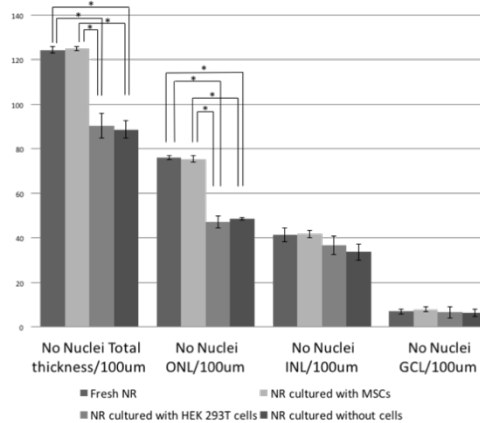
Las NR frescas (control de 0 días) mostraron una adecuada preservación y organización estructural de cada una de sus capas (Figura 2A). Las NR frescas presentaron $124,33 \pm 1,53$ núcleos por $100 \mu\text{m}^2$ (Figura 2B) y un espesor total de $130,09 \pm 0,99 \mu\text{m}$ (Figura 2C). Las NR cocultivadas con MSCV mostraron una adecuada preservación y organización estructural, con ligera pérdida de los OS y escasa alteración de los IS (Figura 2A); presentaron $125 \pm 1,00$ núcleos por $100 \mu\text{m}^2$ (Figura 2B) y un espesor total de $129 \pm 3,73 \mu\text{m}$ (Figura 2C). Ambas condiciones experimentales sólo mostraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al grosor de la IPL ($p=0.02$), siendo el cocultivo con MSCV la que presentó un mayor espesor (Figura 2C); en el resto de parámetros estudiados no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las NR frescas y las NR cocultivadas con MSCV (Figura 2B y C).

En lo referente a las NR en monocultivo durante 72 horas, se produjo una intensa degeneración de los FR, con pérdida de la mayoría de los OS, tumefacción y acortamiento de IS, además de una ligera vacuolización. A nivel estructural se mantuvieron diferenciadas cada una de sus capas que presentaron $88,67 \pm 4,04$ núcleos por $100 \mu\text{m}^2$ y un espesor total de $92,44 \pm 2,28 \mu\text{m}$ (Figura 2). Las NR en cocultivo con células Hek293T presentaron alteraciones similares a las NR en monocultivo, describiéndose una mayor compactación de los IS y una mayor vacuolización en todo el parénquima retiniano (Figura 2A). Las NR en cocultivo con células Hek293T presentaron $90,33 \pm 5,51$ núcleos por $100 \mu\text{m}^2$ (Figura 2B) y un espesor total de $100,66 \pm 9,87 \mu\text{m}$ (Figura 2C). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la morfometría, ni el conteo de núcleos entre las NR en monocultivo y en cocultivo con células Hek293T. Tanto las NR en monocultivo como las cocultivadas con células Hek293T mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto a las NR control y al cocultivo con MSCV en cuanto al grosor de todas las capas analizadas y el conteo de los núcleos (Figura 2).

A)



B)



C)

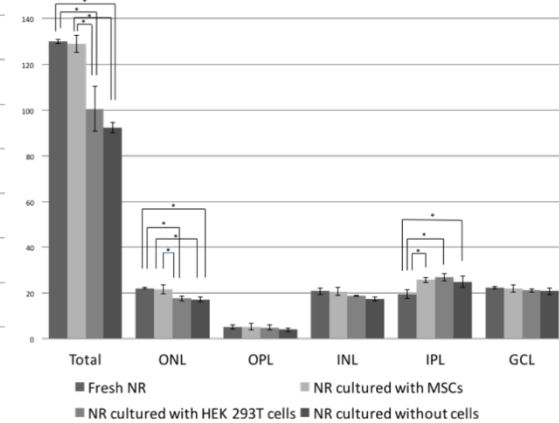


Figura2. Estudio morfométrico de las NR en las diferentes condiciones experimentales. (A) NR previo al cultivo, NR cocultivadas con MSCV durante 3 días, NR cocultivadas con células Hek 293T durante 3 días y monocultivo de NR durante 3 días. (B) Comparación del número de núcleos por 100µm² después de 3 días de cultivo. (C) Comparación de la morfometría tras 3 días de cocultivo en cada condición experimental. * : p-valor<0.05. Barra de escala: 50 µm.

4.2. Caracterización inmunohistoquímica de las neuroretinas.

4.2.1. Caracterización inmunohistoquímica de los fotorreceptores retinianos.

4.2.1.1. Caracterización inmunohistoquímica de los conos.

Con el objetivo de evaluar el nivel de degeneración ocurrido en los conos durante el cultivo organotípico se estudió la inmunoexpresión de la lectina PNA la cual se expresa en los procesos calicales de los conos (1).

La inmunoexpresión de la lectina PNA en las NR frescas mantuvo una distribución uniforme en los OS de los FR. Mientras que en las NR cocultivadas con MSCV presentó una ligera penetración hacia los OS/IS de los FR. Por su parte, en las NR en cocultivo con las células Hek293T, se observó escasa inmunoexpresión de lectina PNA, focalizando su distribución en la periferia de la OLM. En el caso de las NR en monocultivo, se observó también escasa inmunoexpresión lectina PNA con una distribución heterogénea entre los OS, IS y la región más externa de la ONL (Figura 3A).

En las NR frescas se produjo una inmunoexpresión de lectina PNA estadísticamente superior que en las NR en monocultivo (p -valor $<0,001$) y que en las NR en cocultivo con células Hek293T (p -valor $<0,001$). También hubo una inmunoexpresión de lectina PNA estadísticamente superior en las NR cocultivadas con MSCV respecto a las NR en monocultivo (p -valor $<0,001$) y respecto a las NR en cocultivo con células Hek293T (p -valor $<0,001$). Por otra parte, las NR frescas no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la inmunoexpresión de lectina PNA respecto a las NR en cocultivo con MSCV (p -valor=1,00). Finalmente, las NR en monocultivo no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la inmunoexpresión de lectina PNA respecto a las NR cocultivadas con células Hek293T (p -valor=1,00) (Figura 3).

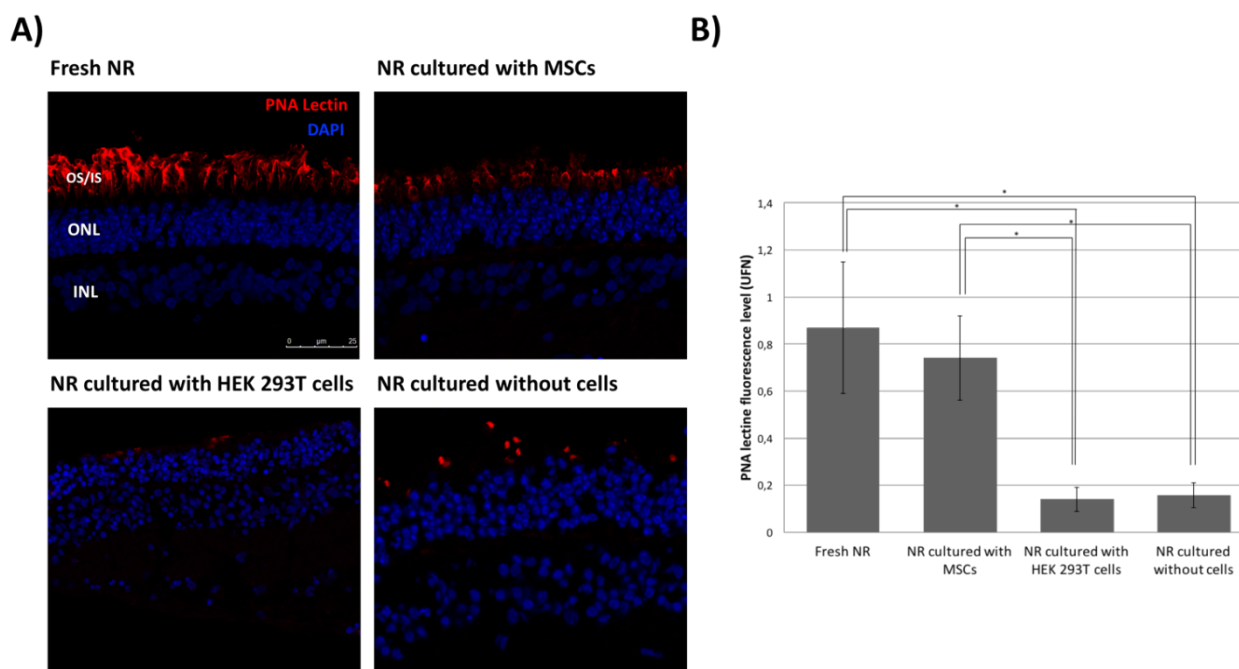


Figura 3. Inmunoexpresión de la Lectina PNA. (A) Inmunoexpresión de la Lectina PNA en los segmentos internos y externos de los fotorreceptores de la NR fresca, de la NR en cultivo con MSCV, en cultivo con células Hek293T y en monocultivo. (B) Estudio semicuantitativo de la inmunoexpresión de Lectina PNA. *:p-valor < 0,05. Barra de escala: 25 μ m

4.2.1.2. Caracterización inmunohistoquímica de los bastones

Con el objetivo de evaluar el nivel de degeneración ocurrido en los bastones durante el cultivo organotípico se estudió la inmunoexpresión de la proteína RHO, localizada en los OS de los bastones (1).

La inmunoexpresión de la RHO en las NR frescas mantuvo una distribución uniforme en los OS de los FR. Mientras que en las NR cocultivadas con MSCV, presentó una ligera penetración hacia los OS/IS de los FR. Por su parte, en las NR en cocultivo con las células Hek293T, se observó una escasa inmunoexpresión de RHO, focalizando su distribución en la periferia de la OLM y en la región más externa de la ONL. La inmunoexpresión de RHO en las NR en monocultivo presentó una distribución y nivel de fluorescencia similares a las NR en cocultivo con Hek293T (Figura 4A).

Las NR frescas mostraron una inmunoexpresión de RHO estadísticamente superior que en las NR en monocultivo (p-valor<0,001) y que en las NR en cocultivo con células Hek293T (p-valor=0,001). También hubo una inmunoexpresión de RHO estadísticamente superior en las NR cocultivadas con MSCV respecto a las NR en monocultivo (p-valor=0,005) y respecto a las NR en cocultivo con células Hek293T (p-valor=0,023). Por otra parte, las NR frescas no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la inmunoexpresión de RHO respecto a las NR en cocultivo con MSCV (p-valor=0,697). Finalmente, las NR en monocultivo no

mostraron diferencias estadísticamente significativas en la inmunexpresión de RHO respecto a las NR cocultivadas con células Hek293T (p -valor=1,00) (Figura 4).

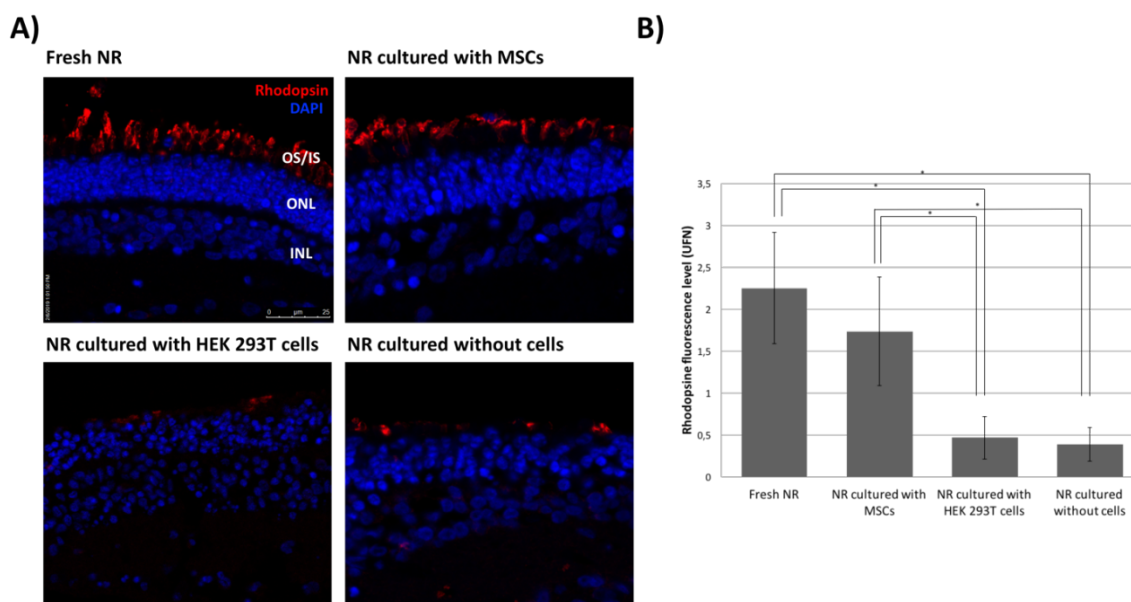


Figura 4. Inmunexpresión de la rodopsina (RHO). (A) Inmunexpresión de la proteína RHO en los segmentos internos y externos de los fotorreceptores de la NR fresca, de la NR en cultivo con MSCV, en cultivo con células Hek 293T y en monocultivo. (B) Estudio semicuantitativo de inmunexpresión de la proteína RHO. *: p -valor < 0,05. Barra de escala: 25 μ m.

4.2.2. Caracterización inmunohistoquímica de células bipolares de bastón

Con el objetivo de evaluar el nivel de degeneración ocurrida en las células bipolares de bastón durante el cultivo organotípico se estudió la inmunexpresión de la proteína PKC α la cual se localiza en las células bipolares de bastón, sobre todo en los botones sinápticos (1).

La inmunexpresión de la proteína PKC α en las NR frescas mantuvo una distribución uniforme a lo largo de la INL e IPL, bordeando claramente la forma de las células bipolares de bastón y mostrando una intensa fluorescencia, sobre todo en los botones terminales. En las NR cocultivadas con MSCV, la proteína PKC α mostró una distribución uniforme, similar a la observada en las NR frescas. En las NR en cocultivo con las células Hek293T se observó discreta inmunexpresión de PKC α ; asimismo, las células bipolares de bastón presentaron alteraciones morfológicas leves y un contorno no definido por completo. Mientras que en las NR en monocultivo, se determinó similar inmunexpresión de PKC α que en las cocultivadas con células Hek293T, añadiendo una marcada alteración morfológica de las células de bipolares de bastón (Figura 5A).

Las NR frescas mostraron una inmunexpresión de la proteína PKC α estadísticamente superior a las NR en monocultivo (p -valor=0,001) y que las NR en cocultivo con células Hek293T (p -valor=0,001). También hubo una inmunexpresión de PKC α estadísticamente superior en las NR cocultivadas con MSCV respecto a las NR en monocultivo (p -valor=0,002) y respecto a las

NR en cocultivo con las células Hek293T (p-valor=0,002). Por otra parte, las NR frescas no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la inmunoexpresión de PKC α respecto a las NR en cocultivo con MSCV (p-valor=1,00). Finalmente, las NR en monocultivo no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la inmunoexpresión de PKC α respecto a las NR cocultivadas con células Hek293T (p-valor=1,00) (Figura 5).

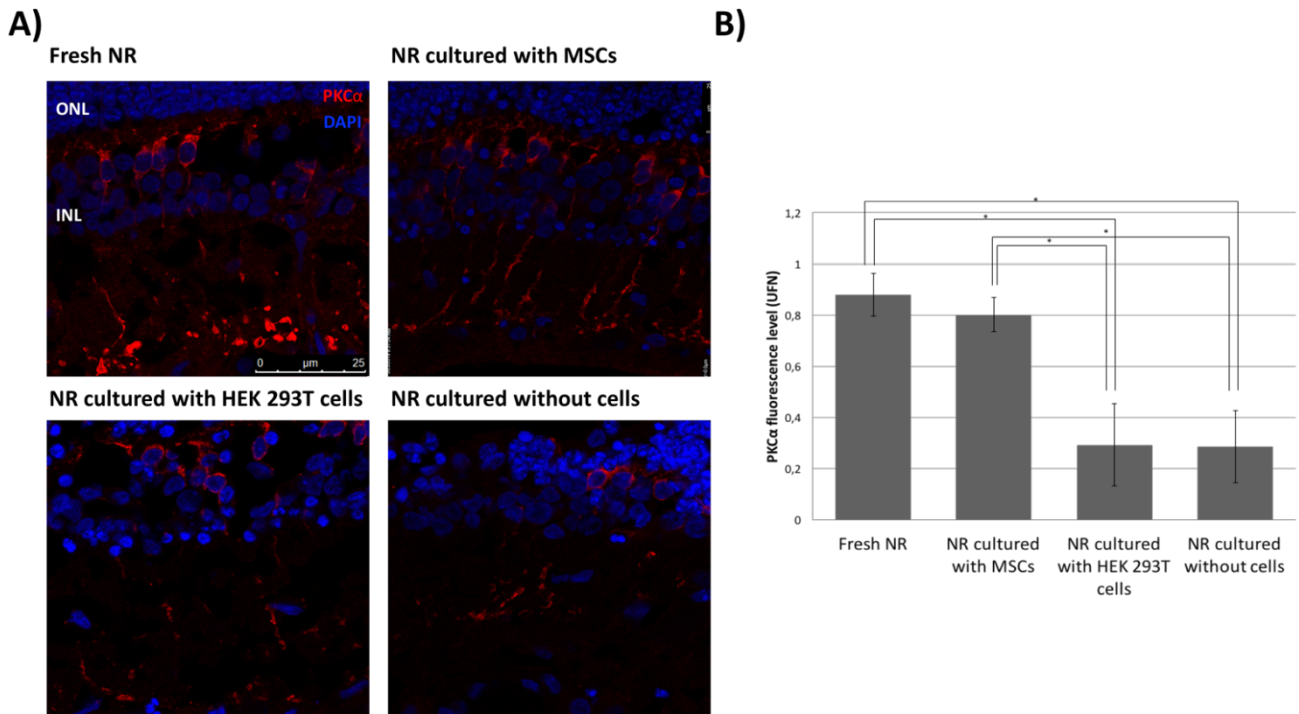


Figura 5. Inmunoexpresión de Protein kinasa C isoforma α (PKC α). (A) Inmunoexpresión de la proteína PKC α de la NR fresca, de la NR en cultivo con MSCV, en cultivo con células Hek293T y en monocultivo. (B) Estudio semicuantitativo de la inmunoexpresión de PKC α . *:p-valor < 0,05. Barra de escala: 25 μ m.

4.2.3. Caracterización de las células de la glía

Con el objetivo de evaluar el nivel de gliosis como signo de degeneración retiniana durante el cultivo organotípico se estudió la inmunoexpresión de la GFAP, una proteína fibrosa que se expresa en el citoesqueleto de los astrocitos y en las células de Müller reactivas (1,16).

La distribución de la inmunoexpresión de la GFAP en las NR en monocultivo mostró una invasión casi completa de la INL, llegando incluso a infiltrarse en la ONL. Por su parte, en las NR en cocultivo con las células Hek293T, la GFAP penetró discretamente en algunos puntos de la INL, sin llegar a invadir la ONL. Mientras que en las NR en cocultivo con MSCV, la GFAP se distribuyó por toda la RGL y en las zonas más internas de la IPL. En el caso de las NR frescas, la GFAP se mantuvo relegada al margen interno de la NFL (Figura 6A).

En las NR en monocultivo se produjo una inmunoexpresión de GFAP estadísticamente mayor que en las NR frescas (p-valor<0,001) y que en las NR en cocultivo con MSCV (p-valor<0,001). También hubo una inmunoexpresión de GFAP estadísticamente superior en las NR cocultivadas con células Hek 293T respecto a las NR frescas (p-valor<0,001) y respecto a las NR

en cocultivo con MSCV (p -valor $<0,001$). Por otra parte, las NR frescas no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la inmunoexpresión de GFAP respecto a las NR en cocultivo con MSCV (p -valor=1,00). Finalmente, las NR en monocultivo mostraron una inmunoexpresión de GFAP estadísticamente superior respecto a las NR cocultivadas con células Hek293T (p -valor=0,013) (Figura 6).

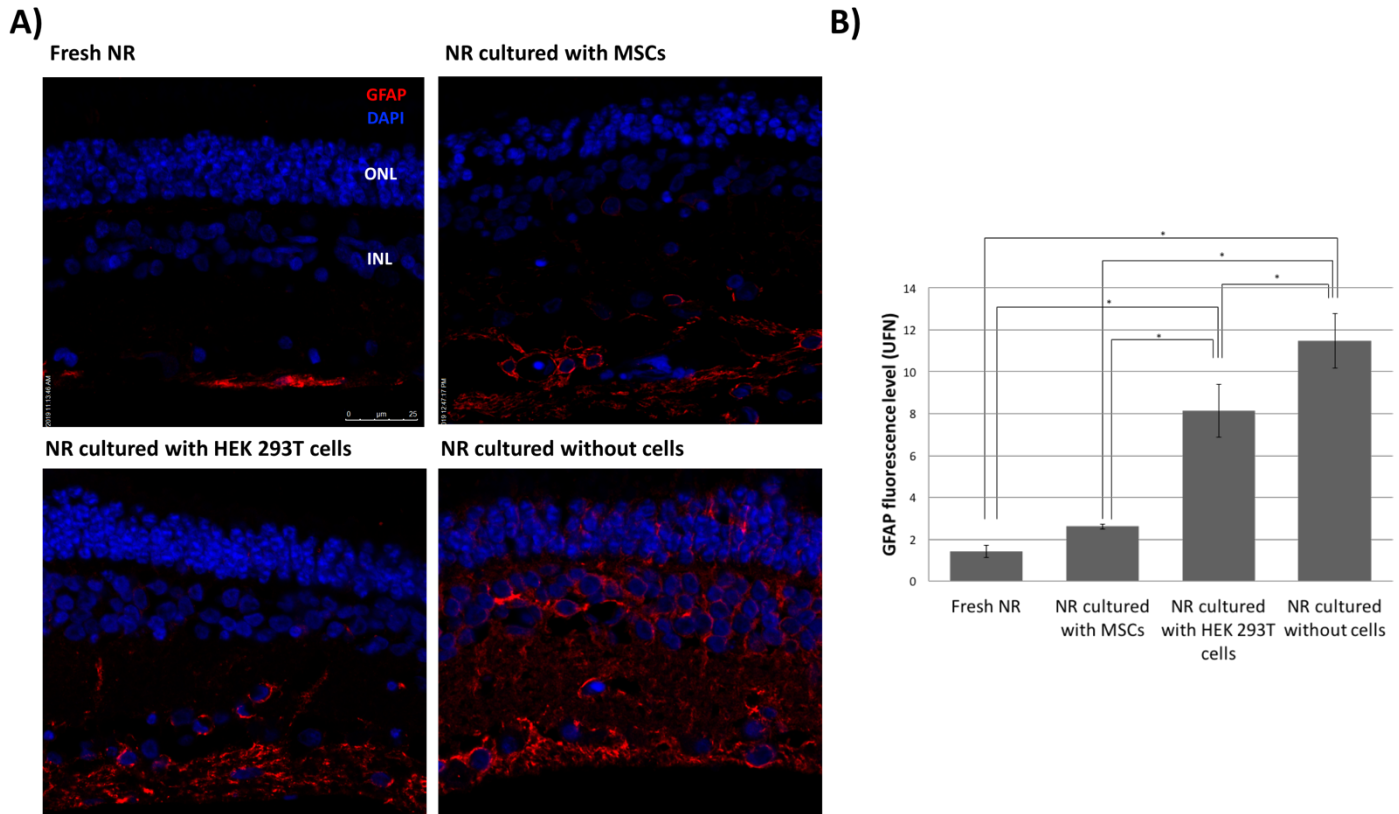


Figura 6. Inmunoeexpresión de GFAP. (A) Inmunoeexpresión de GFAP en la NR fresca, en la NR en cultivo con MSCV, en cultivo con células Hek293T y en monocultivo. (B) Estudio semicuantitativo de la inmunoeexpresión de GFAP. *: p -valor $< 0,05$. Barra de escala: 25 μ m

4.3. Caracterización inmunofenotípica de las MSCV tras el cultivo organotípico.

Con la finalidad de determinar si las MSCV mantuvieron el inmunofenotipo característico de célula madre tras estar 72 horas en cocultivo con las NR se realizó una inmunofluorescencia frente a marcadores típicos de MSC. Los resultados mostraron que en las MSCV la inmunofluorescencia fue positiva frente a los marcadores CD44, CD90, STRO-1 y CD116 y fue negativa para los marcadores CD14 y CD19 (figura 7).

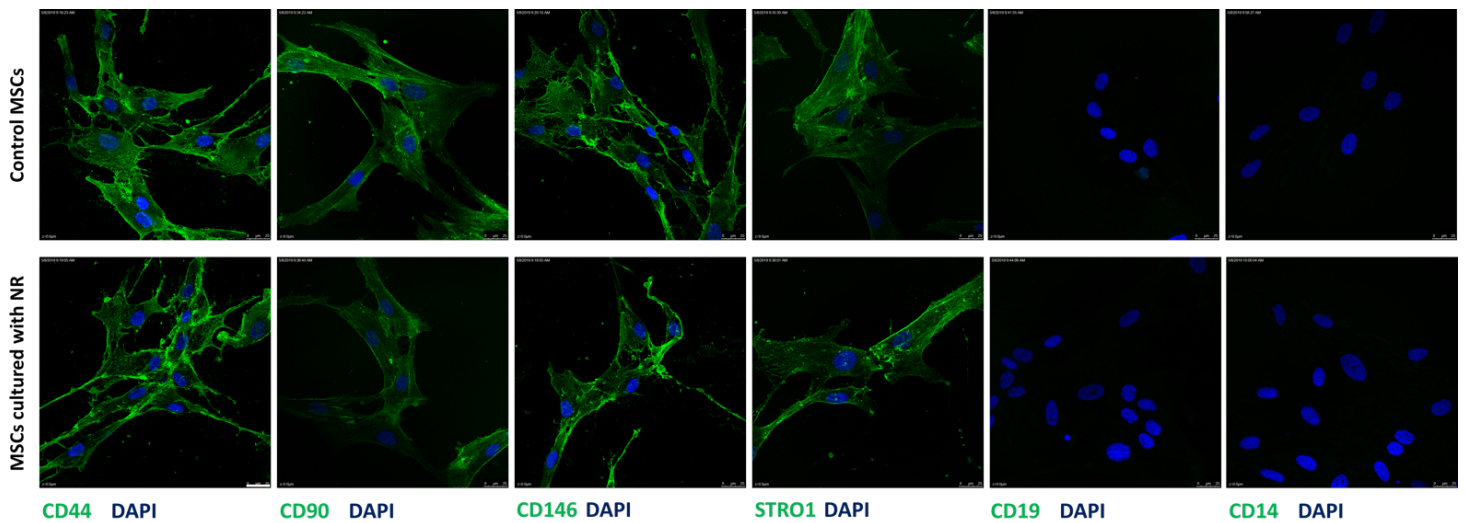


Figura 7. Evaluación inmunofenotípica de las MSCV. Inmunofluorescencia frente a las proteínas de membrana CD44, CD90, STRO-1, CD146, CD14 y CD19 en MSC cultivadas junto con NR y en MSC en monocultivo. Barra de escala: 25 μ m.

4.4. Análisis del perfil de expresión de 1000 proteínas

Con el fin de conocer cuáles son los posibles factores paracrinos secretados por las MSCV que puedan frenar la degeneración retiniana se planteó analizar las diferencias existentes en los factores proteicos secretados por las MSCV en presencia y en ausencia de NR en degeneración. Para ello se llevó a cabo un array de anticuerpos que nos permitió analizar el perfil de expresión de 1000 proteínas en medios de cultivo procedentes del cocultivo de MSCV con NR y monocultivo de MSCV tras 24 horas.

Los resultados de este estudio, resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas en el perfil de expresión de 653 proteínas. De estas 653 proteínas, 152 estaban elevadas en el monocultivo de MSCV respecto al cocultivo de MSCV con NR, mientras que 501 proteínas estaban elevadas en el cocultivo de MSCV y NR respecto al monocultivo de MSCV. Estas 501 proteínas estaban implicadas en procesos de inflamación, inmunidad, muerte y supervivencia celular, estrés y oxidación celular, metabolismo del colágeno, metabolismo lipídico, metabolismo del calcio, metabolismo del retinol, angiogénesis y proteínas que clásicamente se han clasificado como neuroprotectoras, entre otras. En la tabla 2 se recoge que función desempeña cada una de las proteínas cuyos niveles estaban elevados tras 24 horas de cocultivo de NR con MSCV respecto al monocultivo de MSCV y que pueden tener alguna repercusión en el tejido retiniano (hay que tener en cuenta que muchas de las proteínas pueden desarrollar varias funciones).

Tabla 2. Relación de proteínas cuyo nivel está elevado tras 24 horas de cocultivo de MSCV y NR respecto al monocultivo de MSCV

INFLAMACIÓN/INMUNIDAD							
IL-1 F5	IL-1 F7	IL-1 F8	IL-1 R4	IL-1 ra	IL-2 R alpha	IL-2 R gamma	IL-3
IL-3 R alpha	IL-4 R	IL-5	IL-6 R	IL-7	IL-8	IL-10	IL-10 R alpha
IL-10 R beta	IL-11	IL-12 p40	IL-12 p70	IL-12 R beta 2	IL-13	IL-15 R alpha	IL-16
IL-17B	IL-17B R	IL-17C	IL-17D	IL-17E	IL-18 BPa	IL-18 R alpha	IL-18 R beta
IL-19	IL-20	IL-20 R alpha	IL-20 R beta	IL-21	IL-22	IL-22 BP	IL-23 R
IL-24	IL-26	IL-27	IL-29	IL-31	Haptoglobin	CXCR6	TNFRSF17
CD14	CD30 Ligand	CD40 Ligand	IL-8 RB	CXCR3	CXCR4 (fusin)	DcR3	HCR
CD46	CD55	CD61	CD71	CD74	CD79 alpha	CD90	CD97
CD200	IGF-II	ICAM-2	ICAM-3 (CD50)	ICAM-5	IFN-alpha	IFN-beta	GLO-1
HVEM	I-TAC	LECT2	MCP-1	MCP-2	MCP-3	L-Selectin	TNFRSF3
MIP-1b	MIP 2	MIP-3 beta	MICA	RANTES	OX40 Ligand	PARC	Pentraxin3
PF4	P-selectin	TNFRSF19L	TNFRSF13B	Thymopietin	TLR2	TLR3	TLR4
TRAIL	TRAIL R1	TRAIL R4	ADAMTS-1	ADAMTS-19	ADAMTS-4	AMICA	BLAME
CFHR2	CHI3L1	Chymase	DPPIV	FAP	Fc RIIB/C	Fibrinopeptide A	Ficolin-3
FOXP3	Furin	GATA-3	IL-33	IL-34	IL36RN	Itk	LAG-3
Legumain	LOX-1	LTF	MATK	MBL	MICB	Midkine	Notch-1
OX40	Pappalysin-1	PD-1	PYK2	Tec	TIM-1	Adiponectin	Hepassocin
TIMP-1	ALCAM	EpCAM	OSM	IGF-I	Csk	Smad 4	Ck beta 8-1
Ghrelin	COX2	Leptin R	THFSF3	TCCR / WSX-1	C3a		

MUERTE/SUPERVIVENCIA CELULAR							
Proapoptosis		Supervivencia celular			Proapoptosis/supervivencia		Autofagia
PPP2R5C	RIP1	HSP10	Clusterin	CCR4	CD27/TNFRSF7		FOXO1
FAM3B	SMAC	HSP20	MINA	HGF	Mer		PI 3Kinase/p85 beta
BAX	TOPORS	HSP27	NAIP	NOV / CCN3	Livin		
BIK	TGF-beta 1	HSP60	NELL2	SCF R / CD117	IFN-alpha		
Caspase-3	TGF-beta 5	HSP70	PAK7	WISP-1 / CCN4	IFN-beta		
Caspase-8	FAK	HSP90	PIM2	BNIP2	LRP-1		
IGFBP-3	FRK	HSPA8	PTN	Survivin	Lipocalin-2		
Protein p65	Galectin-1	ROS					
EXTRÉS CELULAR/OXIDATIVO							
Haptoglobin	APEX-1	VDUP-1					
METABOLISMO DEL COLÁGENO							
MMP-8	MMP-11	NCAM-1/CD56	MMP-1	MMP-2	MMP-7	MMP-9	MMP-10
MMP-12	MMP-13	MMP-14	MMP-15	MMP-16	MMP-19	Pro-MMP-7	Pro-MMP-9
Pro-MMP-13							
METABOLISMO LIPÍDICO							
ApoA1	ApoA2	SERTAD2	BMPR-II	BMPR-IA	ApoA4	ApoC2	ApoD
ApoE	ApoE3	FABP1	FABP4	Resistin	Vitronectin	LRP-1	
METABOLISMO DEL RETINOL							
RBP4							
ANGIOGÉNESIS							
Angiostatin	Endothelin	VEGF R2 (KDR)	Angiopoietin-2	Angiopoietin-4	Angiopoietin-like2	Angiopoietin-4	Angiopoietin-like 1
FGFR2	NF1						
NEUROPROTECCIÓN							
DLL4	Nestin	NPTX1	NPTXR	PEDF	BDNF	AR (Amphiregulin)	CRIM1
GFR alpha-4	Glypican 3	Glypican 5	NGF R	NrCAM	Neuritin	Thrombospondin4	TMEFF2
CNTN1	IGF2BP1	ITM2B	Pro-BDNF	RECK	ROR1	TPA	Chordin-Like1
PDGF-AA	PDGF-C	PDGF-D	Erythropoietin	NT-3	FGF-20		
METABOLISMO DEL CALCIO							
ApoA1	SERTAD2	ALK-3	ApoC1	ApoD	ApoE3	FABP4	Vitronectin
ApoA2	BMPR-II	ApoA4	ApoC2	ApoE	FABP1	Resistin	

5- DISCUSIÓN

La degeneración de los FR es un proceso en el que confluyen diversas enfermedades neurodegenerativas de la retina, como son la DMAE y la RP. Enfermedades que presentan una elevada prevalencia a nivel mundial y que actualmente carecen de un tratamiento realmente efectivo. Las terapias avanzadas se muestran como una alternativa de tratamiento para este tipo de patologías; entre ellas, la terapia celular mediada por factores paracinos se perfila como la alternativa más viable y que mejores resultados ha presentado en estudios pre-clínicos y clínicos (10, 17). Por todo ello, el objetivo de este estudio fue evaluar *in-vitro* el potencial neuroprotector de las MSCs sobre los FR en un cultivo organotípico de NR porcina. Para alcanzar dicho objetivo, se han llevado a cabo estudios de la morfometría de las NR, de la expresión inmunohistoquímica de marcadores típicos FR, células bipolares de bastón y gliosis después del cocultivo con células madre; y finalmente se ha analizado el perfil de expresión proteico de las MSCV en presencia de NR en degeneración.

Los cultivos organotípicos de NR son una adecuada herramienta para la investigación, a nivel celular y molecular, del proceso de degeneración retiniana (18). El cultivo organotípico de NR humana, representa la mejor alternativa disponible para esta metodología de estudio. Sin embargo, la obtención de NR humanas para experimentación está sujeta a la sobredisponibilidad de ojos para trasplante, ocurrida sólo en raras ocasiones; con lo cual, resulta muy difícil llevar a cabo una programación experimental de esta índole. El uso de cultivos organotípicos de NR porcinas, sería el modelo más semejante al de NR humana (salvo el empleo de otro primate), debido a la similitud que presentan las retinas de estas dos especies. Asimismo la relativamente sencilla obtención de globos oculares de cerdo, promueven su empleo. La NR porcina presenta un *área centralis* que asemeja una mácula humana. Asimismo, es una de las pocas especies de animales domesticados que no presentan tapetum (al igual que los humanos); también el tamaño ocular, grosor y rigidez escleral son similares. Además, estudios previos del grupo de retina del IOBA han utilizado esta especie en sus cultivos organotípicos, con lo cual, existen precedentes para poder realizar comparaciones y aumentar su fiabilidad como modelo (2,16, 18).

5.1- Evaluación morfológica y morfométrica de las neuroretinas

Los resultados de la evaluación morfométrica de las neuroretinas tras 72 horas en cocultivo con MSCV, en cocultivo con células Hek293T y en monocultivo, mostraron como las células madre frenaban la neurodegeneración de los FR. Se observó cómo las NR tanto en monocultivo como en cocultivo con las células Hek293T presentaban ausencia de OS, tumefacción y acortamiento de IS en la capa de FR. También se observó disminución en el número de núcleos y estrechamiento de las capas retinianas. En las NR en cocultivo con MSCV se observó cómo estos signos de neurodegeneración estaban atenuados hasta el punto de no presentar diferencias estadísticamente significativas con las NR frescas en los parámetros morfométricos evaluados.

Los resultados de este estudio mostraron que las NR en cocultivo con las células Hek293T degeneran de igual modo que las NR en monocultivo. El cocultivo con células Hek293T se utilizó con la finalidad de comprobar que el efecto neuroprotector que podrían conceder las

MSCV no podría ser producido también por otro tipo celular no multipotente. El presente trabajo muestra como sólo las células madre tienen capacidad neuroprotectora. Llama la atención la presencia de una gran vacuolización en las NR que han estado en cocultivo con las células Hek293T, una posible explicación podría ser que la línea celular Hek293T es una línea inmortalizada y por ello su crecimiento es muy rápido lo que supondría un agotamiento de los nutrientes del medio de cultivo mucho más precoz.

La degeneración de los FR observada en las muestras teñidas con H-E, se corrobora con lo descrito por Labrador-Velandia et al. (2019) (18). Los cuales, describieron la ausencia de OS, tumefacción y acortamiento de IS a las 72 horas del monocultivo de las NR. Asimismo, corroboran el retraso del proceso degenerativo, que confiere el cocultivo con MSCs a las células, parénquima y arquitectura de la retina. Sin embargo, estos autores describen que existe mayor espesor en cada una de las capas de la NR fresca, en comparación con la NR en cocultivo con MSCs (18); lo cual discrepa con este estudio, que solo encontró diferencias en la capa IPL, siendo la IPL del cocultivo la que tuvo mayor espesor. Este hallazgo podría estar relacionado al medio de cultivo utilizado por ellos (DMEM:HamF12), debido a que esta es la única diferencia metodológica del cultivo organotípico que existe entre su estudio y el aquí descrito. Otro factor que podría influir en la degeneración de los FR es la posición del explante con respecto a la membrana porosa. Labrador-Velandia et al. (2019), a diferencia de este estudio, colocaron el explante de NR con la RGC de cara a la membrana porosa; sin embargo, obtuvo indicadores morfométricos de degeneración similares a los observados aquí (18), con ello se podría sugerir que la posición del explante con respecto de la membrana porosa podría no influir a nivel morfométrico sobre la degeneración de FR.

En cuanto a los cultivos organotípicos de retina de otras especies, existe una notable diferencia en cuanto a la intensidad de degeneración de los FR descrita por Fernandez-Bueno et al. (2012) en su monocultivo organotípico de NR humana al tercer día, la NR humana se conservó mejor (2). Es importante considerar el medio de cultivo utilizado, ellos utilizaron el medio Neurobasal A suplementado con B27. Podríamos atribuirle la diferencia en la degeneración de FR a este hecho; sin embargo el estudio de Rodriguez-Crespo et al. (2014) concluyó que el mejor medio para mantener la integridad del explante era la combinación de Neurobasal A y DMEM suplementado con B27 (19), utilizado en el presente estudio. En este sentido, descartando la influencia del medio de cultivo, podríamos respaldar lo descrito por Jones et al. (2012) quienes sugieren que la retina humana (y la de otros primates) podría ser más resistente a la degeneración que la de otras especies (2, 19,20).

No se encontraron diferencias significativas en las capas más internas (INL, GCL), en los indicadores morfométricos de degeneración de este estudio, entre ninguna de las condiciones experimentales evaluadas. Este hallazgo estaría relacionado con lo descrito por Cuenca et al. (2014) quien menciona que las capas más internas de la retina son las que se afectan en última instancia por la degeneración. Sin embargo, sería necesario corroborarlo con cultivos de NR a largo plazo (1).

5.2- Evaluación inmunohistoquímica de las neuroretinas

En lo referente al estudio de inmunohistoquímica, los resultados de este estudio mostraron como el contacto con las MSCV suponía en las NR una menor gliosis y una mejor conservación de los FR y células bipolares de bastón.

+Los resultados del presente estudio, mostraron como el contacto con las MSCV supuso una mejor conservación de los FR y de las células bipolares de bastón. La severa disminución de la inmunoreactividad de los marcadores directos de FR (Lectina PNA y RHO), es congruente con la premisa de que la retina externa es la primera en ser afectada (1), asimismo podríamos confirmar que a las 72 horas de monocultivo organotípico de NR porcina o cocultivo con células Hek293T existe una considerable afectación de los FR. La menor inmunoreactividad de la proteína PKC α , así como la notable alteración estructural de las células bipolares de bastón y su reducción en número, sugiere que también existe una considerable afectación de la retina interna a nivel de esta capa celular al tercer día de monocultivo de la NR porcina o cocultivo con las células Hek293T. Todo ello, nos permite concluir el efecto neuroprotector que desempeñan las células madre mesenquimales pues los resultados del presente trabajo muestran como tanto los FR como las células bipolares se conservan tras 72 horas de cocultivo de NR con MSCV.

Se observó cómo en las NR en cocultivo con MSCV se producía una menor gliosis reflejada en una menor inmunoreactividad del tejido ante la GFAP. La gliosis es la proliferación y activación de células de glía, principalmente astrocitos y células de Müller. Es considerada como una característica de degeneración del tejido retiniano; en etapas tempranas confiere un efecto neuroprotector, mientras que en fases crónicas exacerba la progresión de la enfermedad (1). Por lo tanto, los resultados de este estudio muestran cómo se produce una disminución de los procesos neurodegenerativos en presencia de las MSCV. La discreta gliosis observada en las NR en cocultivo con MSCV podría ser atribuida principalmente a la ausencia de soporte sanguíneo y axotomía realizada durante el cultivo organotípico; aun así, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la inmunoreactividad de la GFAP en las NR frescas y las NR en cocultivo con MSCV. Lo descrito en este estudio está en sintonía con los descritos previamente por Labrador-Velandia et al., 2019 (18).

La distribución de núcleos en las pruebas de inmunofluorescencia mostró consonancia con lo descrito en la evaluación morfométrica en las muestras teñidas con H-E. Asimismo confirma el efecto de vacuolización generado en el cocultivo con células Hek293T, al mostrar grandes espacios entre los núcleos de todas las capas. Como se mencionó anteriormente éste fenómeno podría deberse a que la línea celular Hek293T es una línea inmortalizada y su crecimiento es muy rápido.

En los experimentos de este estudio no se produjo una diferenciación de las MSCV durante el cocultivo con NR, por ello el presente trabajo respalda la premisa que la diferenciación de MSCs en células madre retinianas o en otros linajes celulares requiere de un cocultivo directo, durante una cantidad mayor de días e incluso de la estimulación adicional para lograr esta diferenciación (7, 21). A día de hoy la utilización de MSCs como terapia de reemplazo celular

está prácticamente descartada, en la práctica clínica, debido a los problemas de diferenciación e integración al tejido que presentan. Por ello es importante centrar la investigación de aplicación clínica de estas células en el efector neuroprotector que pueden conferir mediante señales paracrinas (7).

5.3- Evaluación del perfil proteico secretado por las MSCV en contacto con neurorretinas en neurodegeneración

Los resultados de este trabajo, están en sintonía con la hipótesis que plantea que las MSC tienen capacidad neuroprotectora a través de la secreción de factores proteicos con efecto paracrino. Ante esta situación y con el objetivo de establecer cuáles son los posibles factores proteicos responsables de esta neuroprotección, nos planteamos estudiar el perfil proteico del secretoma obtenido a partir del cocultivo de NR con MSCV y del monocultivo de MSCV.

Después de analizar el perfil de expresión de 1000 proteínas, los resultados de este estudio mostraron que 501 proteínas se sobreexpresaban en el cocultivo de NR y MSCV, en comparación con el monocultivo de MSCV. Independientemente de la etiología, tanto las neuronas como las células de la glía de la retina responden de una manera muy similar ante la aparición de una lesión. Las células de la retina en degeneración intentan proteger el tejido y preservar su funcionalidad; a pesar de ello, una excesiva o inapropiada respuesta celular pueden contribuir a una neurodegeneración más rápida. Las respuestas neuroprotectoras y regenerativas de la retina implican la activación de mecanismos destinados a contrarrestar los procesos de oxidación celular, muerte programada e inflamación que típicamente ocurren en los procesos neurodegenerativos (1).

Hasta la fecha, se han descrito diferentes factores proteicos con capacidad neuroprotectora específica para la retina, entre ellos se pueden destacar el GDNF, el BDNF, el PDGF y el CNTF, este último estudiando anteriormente en estudios del IOBA-UVA (11,18). Los resultados del presente estudio, también detectaron su presencia, con la salvedad que sólo el BDNF y el PDGF fueron sobreexpresados en el cocultivo de MSCV y NR respecto al cultivo de MSCV. Esto podría ser debido a que el presente estudio se ha llevado a cabo en medios de cultivo tras 24 horas de degeneración retiniana y quizá la sobreexpresión de factores como el GDNF o el CNTF ocurre en estadios más avanzados de neurodegeneración; por ello sería interesante repetir el análisis tras tiempos más prolongados de degeneración.

En el presente estudio se encontraron niveles de factores proteicos elevados que en la literatura han sido categorizados como neuroprotectores o que están implicados en el desarrollo de la retina, por ello puede ser interesante detenernos en su estudio. Algunos de estos factores son la eritropoyetina (EPO), ALCAM, DLL4, Nestina, NPTX1, NPTXR y PEDF. Ding et al, 2019 ya describieron que la EPO tiene capacidad neuroprotectora sobre los FR (22), los resultados de este refuerzan dicha hipótesis. Por otra parte la proteína DLL4, que participa en el desarrollo de los bastones (23), podría desarrollar un papel crucial en la neuroprotección retiniana que se encontró en este estudio. Otros factores neurotróficos, sin antecedentes de poseer capacidad neuroprotectora específicamente sobre la retina fueron descritos en este trabajo, entre ellos cabe destacar a las proteínas AR, CRIM1, GFR alfa-4, Glypican 3 y 5, NGFR,

Nr CAM, Neuritin, Thrombospondin 4, TMEFF2, CNTN1, IGF2BP1, ITM2B, Pro-BDNF, RECK, ROR1, TPA, NT-3 y Chordin-like1. El presente trabajo, amplia los factores proteicos que ya habían sido descritos como proteínas neurotróficos secretadas por las MSCs; también este es el primer trabajo que determina que su secreción se ve estimulada por la presencia de NR en degeneración probablemente con el fin de frenar dicha neurodegeneración.

La homeostasis de las proteínas de la retina está regulada por cuatro mecanismos: la respuesta de proteínas de shock de calor (HSR, del inglés *heat shock response*), el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS, del inglés *ubiquitin-proteasome system*), la respuesta a las alteraciones del plegamiento proteico (UPR, del inglés *unfolded protein response*) y la degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD, del inglés *endoplasmic reticulum-associated degradation*) (24). Las proteínas de shock de calor (HSP, del inglés *heat shock proteins*) actúan como chaperonas en la HSR, son las encargadas de marcar y conducir a las proteínas mal plegadas hacia los sistemas proteolíticos como el UPS. La literatura describe tres HSP implicadas en la HSR en procesos de neurodegeneración: la proteína HSP40, la HSP70 y la HSP90. Por el contrario, en este trabajo se describen siete proteínas HSP que aumentan su expresión en el cocultivo de MSCV y NR en degeneración. Son las proteínas HSP10, la HSP20, la HSP27, la HSP60, la HSP70, la HSP90 y la HSPA8. Este hallazgo sugiere que existen más tipos de HSP implicadas en la degradación de proteínas de las células retinianas en degeneración. Se estimularía la producción de dichas proteínas HSP como una forma de neuroprotección, las proteínas HSP participarían en la eliminación de las proteínas alteradas por el proceso neurodegenerativo. Habría que llevar a cabo más experimentos para determinar si su síntesis se produce por parte del tejido en degradación o éste estimula su síntesis por parte de las MSCV. El sistema UPS es crucial en la homeostasis de las proteínas de la retina; por ello, juega un papel fundamental en la protección de la retina enferma. Está implicado en la respuesta al estrés oxidativo, nitrosativo, protección ante el daño y en la reparación celular (1). El presente estudio describe, por primera vez, niveles elevados de proteínas implicadas en el sistema UPS (clusterina, KCTD10 y PYK2) durante la degeneración retiniana en presencia de células madre. Todo ello nos sugiere que la activación de mecanismos como los que ocurren en los sistemas HSR y UPS podrían ser fundamentales en los procesos de neuroprotección retiniana.

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre la generación y eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive species oxygen*). La retina es uno de los tejidos más susceptibles a sufrir daños por estrés oxidativo; sobre todo la capa de FR, la cual está continuamente expuesta a fotones de luz y es uno de los tejidos que más oxígeno consume del sistema nervioso central (SNC) (25). El análisis de este estudio, mostró como se producía la síntesis de proteínas mediadoras de estrés oxidativo (VDUP-1) y proteínas con acción antioxidante como son APEX-1 y haptoglobina. Esta dicotomía funcional, podría ser explicada porque las MSCV serían las responsables de la secreción de las proteínas antioxidantes (APEX-1 y haptoglobina), mientras que las NR en degeneración secretarían las proteínas mediadoras del estrés oxidativo. Todo ello pone de manifiesto que el control del estrés oxidativo es uno de los objetivos que deben de cumplir las terapias dirigidas a frenar la neurodegeneración retiniana. Merece la pena señalar que aunque se ha utilizado un array de anticuerpos específico para detectar proteínas de ser humano, debido a la homología entre las

proteínas humanas y las porcinas también seremos capaces de detectar las proteínas procedentes de las NR porcinas.

Los tejidos con alto nivel de grasa en su conformación, como es el SNC, son más susceptibles de sufrir daño generado por ROS. Por su parte la retina contiene aproximadamente un 20% de grasa (en materia seca), las largas membranas de los OS de los FR contienen gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, por ello, estas células son particularmente afectadas por la peroxidación de lípidos que se asocia a la degeneración retiniana (1). En este sentido, los resultados de este estudio muestran cómo se produce una sobreexpresión de factores proteicos relacionados con el metabolismo de lípidos; nuestra hipótesis es que dicha síntesis se produce con la finalidad de contrarrestar el daño causado por las ROS sobre los lípidos de la retina.

Adicionalmente a la activación de la maquinaria antioxidante, durante la neurodegeneración de la retina, se activan mecanismos de muerte celular programada, principalmente apoptosis (independiente y dependiente de caspasas) y autofagia (1). Este estudio, describe factores proteicos proapoptóticos como son BAX, PPP2R5C, FAM3B, Caspasa-3, Caspasa-8, IGFBP-3, TGF-beta 1, TGF-beta 5, FAK, FRK, Galectina-1, p65, RIP1, SMAC y TOPORS; síntesis de dichas proteínas probablemente proceda de la NR en degeneración pues sus células están muriendo. Por otra parte, también describimos la secreción de factores implicados en procesos de autofagia como son FOXO1 y PI3Kinasa p85 beta, los cuales pueden actuar como activadores o inhibidores del proceso de autofagia. También se produjo un aumento en la síntesis proteínas con función pro o antiapoptótica (CD27/TNFRSF7, Mer, Livin, IFN-alpha/beta R2, IFN-beta, LRP-1, Lipocalin-2). Finalmente, también se observó el aumento de la síntesis de proteínas implicadas en procesos de supervivencia celular como es el caso de las proteínas CCR4, HGF, NOV / CCN3, SCF R / CD117, WISP-1 / CCN4, BNIP2, Clusterina, MINA, NAIP, NELL2, PAK7, PIM2, PTN, Survivina y ROS; la síntesis de dichas proteínas probablemente proceda de las MSCV con el fin de frenar la neurodegeneración retiniana.

En cuanto a la descripción de los procesos de muerte celular descritos en la literatura asociados a la neurodegeneración de los FR de la retina se hace referencia principalmente al balance entre la proteína proapoptótica Bax y las pertenecientes a la familia Bcl-2 (26). El presente estudio, estudio no evaluó la situación de las proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2, pero si encontró sobreexpresión de la proteína Bax. Por otra parte, en este estudio se describe por primera vez otras doce proteínas proapoptóticas asociadas a la neurodegeneración de la retina. También describimos, por primera vez, dos proteínas implicadas en la autofagia durante el proceso de degeneración retiniana. Es muy probable que las proteínas proapoptóticas y de autofagia provengan de la NR en degeneración; mientras que aquellas relacionadas con la supervivencia celular hayan sido secretadas por las MSCV. En futuras investigaciones evaluaremos la utilidad clínica de estos factores proteicos secretados por las MSCV frente a NR en degeneración.

El estrés celular causa la muerte celular pues, entre otros fenómenos, activa las vías apoptóticas independientes de caspasas. El estrés celular induce la liberación de calcio por parte del retículo endoplásmico lo cual provoca la activación de las calpaínas (proteasas dependientes de calcio) responsables de la muerte celular (27). La activación de las calpaínas

se asocia con fenómenos de neurodegeneración de la retina, siendo la vía apoptótica independiente de caspasas que más frecuentemente se relaciona a la muerte de los FR en la RP (1). Todo ello explica que en este trabajo se describa el aumento de los niveles de factores proteicos implicados en el metabolismo del calcio (ApoA1, SERTAD2, BMPR-IA/ALK-3, ApoC1, ApoD, ApoE3, FABP4, Vitronectin, ApoA2, BMPR-II, ApoA4, ApoC2, ApoE, FABP1, Resistina). Probablemente la síntesis de dichos factores proceda las células de la NR en degeneración. Por otra parte el aumento de niveles intracelulares de calcio está implicado en la activación de muchos otros factores proteicos (27).

La retina humana, como parte del SNC, presenta una población celular encargada de la vigilancia inmunológica y de participar en los mecanismos de defensa inmunomediados, dicha población celular se denomina microglia. Estas células, son fagocitos del tejido retiniano con capacidad inmunológica comparable a los monocitos y macrófagos presentes en otros tejidos. Asimismo, la microglia posee un importante papel en la supervivencia de FR en las distrofias retinianas (1). En este sentido la dicotomía funcional que presentan estas células con capacidad de secretar sustancias neuroprotectoras y proinflamatorias, dependiendo de las circunstancias, no está del todo esclarecida. Existen multitud de proteínas proinflamatorias secretadas por la microglia descritas en la literatura, muchas de ellas han sido también descritas en este estudio. A parte de ello, este trabajo también ha ampliado considerablemente el abanico de factores proteicos proinflamatorios e inmunomoduladores implicados en la degeneración retiniana pues hacemos referencia alrededor de 150 factores proteicos proinflamatorios que no estaban descritos hasta el momento en proceso de neurodegeneración retiniana. Por otra parte, también describimos proteínas con carácter antiinflamatorio pudiendo destacar el caso de IL1-ra, IL-10, IL-11, IL-13, IL-4 o TGF-beta cuya síntesis podría proceder de las MSCV con el fin de frenar los fenómenos inflamatorios típicos de la neurodegeneración.

La pérdida y alteración de FR ocasionada por el estrés oxidativo ha sido relacionada con modificaciones del patrón angiogénico de los vasos sanguíneos retinianos (28), asimismo durante el cultivo organotípico se detiene el soporte sanguíneo que recibe la retina. En el presente estudio se describe cómo se produce un aumento de la síntesis de factores proteicos implicados en la angiogénesis entre los que cabe destacar VEGF y VEGFR2, probablemente la síntesis de dichos factores se produzca con el fin de intentar restablecer el riego sanguíneo en el explante retiniano. La información respecto a los factores angiogénicos implicados en la degeneración retiniana es limitada, y casi únicamente se centra en el estudio de VEGF por su importancia en la DMAE y su papel como factor trófico en la migración de la microglia (1). Futuras investigaciones deben ayudar a esclarecer si estos factores angiogénicos son secretados por las MSCV a consecuencia de la falta de soporte sanguíneo de los explantes de NR, o si también pueden ser secretados en condiciones in vivo.

La familia de proteínas de las metaloproteasas (MMPs, del inglés *metalloproteases*) también cumplen un importante papel en la neoformación de vasos sanguíneos. Asimismo, se ha descrito su implicancia en la fisiopatología de la DMAE, retinopatía diabética, glaucoma y en la toxicidad retiniana inducida por luz azul. Las MMPs participarían en la remodelación de la matriz extracelular, proteólisis, crecimiento celular y respuesta ante el daño sobre la retina

(29). En este trabajo, se describen la sobreexpresión de 17 MMPs lo cual sugiere su importancia en otras formas de degeneración retiniana.

El retinol es una forma activa de la vitamina A, la cual es un importante componente de los fotopigmentos de los FR. Los fotopigmentos son las moléculas encargadas de absorber los fotones de luz y están compuestos por una opsina y un cromóforo. El cromóforo es un derivado de la vitamina A, encargado de traducir la energía del fotón en una señal química (30). Por ello, podemos inferir la trascendental importancia del retinol para el correcto funcionamiento de los FR. El presente estudio, describe un aumento de los niveles de la proteína RBP4, que facilita el transporte del retinol en plasma y al interior celular. La síntesis de este factor proteico podría proceder probablemente de las MSCV, lo cual favorecería a la neuroprotección de la retina.

Finalmente, la degeneración de los FR es un proceso que cursa en las enfermedades neurodegenerativas de la retina de mayor prevalencia y que actualmente no tienen un tratamiento realmente eficaz. El cuadro degenerativo común que presentan estas enfermedades hace que se puedan considerar tratamientos inespecíficos dirigidos a frenar la degeneración de los FR. Por ello la terapia con MSCs se muestra como una alternativa viable y relativamente económica. Debido a los problemas que implica utilizar las MSCs como terapia de reemplazo celular, es importante analizar la efectividad y los factores proteicos responsables de la neuroprotección. El presente estudio, demostró la capacidad que tienen las MSCV de atenuar la degeneración de los FR de la NR en degeneración. Los resultados del presente trabajo también ponen de manifiesto que la capacidad neuroprotectora de las MSCV podría ser atribuida a la secreción de factores paracrinos por parte de las células madre destinados a frenar los procesos característicos de la degeneración retiniana. Investigaciones futuras deben centrarse en detectar el origen exacto de los factores proteicos descritos en este estudio, realizar análisis cuantitativos que permitan definir los principales factores proteicos responsables de la neuroprotección y sobre ellos realizar pruebas específicas de su efectividad individual, conjunta y en diferentes combinaciones con el fin de desarrollar terapias de las cuales los pacientes puedan beneficiarse.

6- CONCLUSIONES

Primera. Las células madre mesenquimales tienen la capacidad de frenar la neurodegeneración de la capa de los fotorreceptores de la retina. Lo que sugiere su posible futura aplicación en tratamientos de terapia celular destinados a pacientes que sufren distrofias retinianas que cursan con la degeneración de los fotorreceptores.

Segunda. El efecto neuroprotector desarrollado por las células madre mesenquimales sobre la retina en degeneración se basa en la secreción de factores proteicos por parte de las células madre que estarían destinados a contrarrestar los procesos típicos de la degeneración retiniana. Todo ello sienta las bases para, en un futuro, elaborar terapias neuroprotectoras basadas en la combinación de factores neuroprotectores procedentes de las células madre mesenquimales.

7- BIBLIOGRAFÍA

1. Cuenca N, Fernandez-Sanchez L, Campello L, Maneu V, De la Villa P, Lax P, et al. Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases. *Prog Retin Eye Res.* 2014, 43:17-75.
2. Fernandez-Bueno I, Fernandez-Sanchez L, Gayoso M, Garcia-Gutierrez M, Pastor J, Cuenca N. Time course modifications in organotypic culture of human neuroretina. *Exp. Eye Res.* 2012, 104:26-38.
3. Di Lauro S, Rodriguez-Crespo D, Gayoso M, Garcia-Gutierrez M, Pastor J, Srivastava G, et al. A novel coculture model of porcine central neuroretina explants and retinal pigment epithelium cells. *Mol Vis.* 2016, 22:243-253.
4. Beltran A, Wen R, Acland G, Aguirre G. Intravitreal injection of ciliary neurotrophic factor (CNTF) causes peripheral remodeling and does not prevent photoreceptor loss in canine RPGR mutant retina. *Exp Eye Res.* 2007, 84: 753-771.
5. Ambati J, Fowler B. Mechanisms of age-related macular degeneration. *Neuron.* 2012, 75(1):26–39.
6. Darrow J. Luxturna: FDA documents reveal the value of a costly gene therapy. *Drug Discov Today.* 2019, 24(4):949-954.
7. Xu W, Xu G. Mesenchymal stem cells for retinal diseases. *Int J Ophtalmol.* 2011, 4(4):413-421.
8. Labrador-Velandia S, Di Lauro S, Alonso-Alonso M, Tabera S, Kumar G, Pastor J, et al. Biocompatibility of intravitreal injection of human mesenchymal stem cells in immunocompetent rabbits. *Graefes Arch Clin Exp Ophtalmol.* 2018, 256:125-134.
9. Seo J, Cho S. Neurorestoration induced by mesenchyme stem cells: potential therapeutic mechanisms for clinical trials. *Yonsei Med.* 2012, 53:1059-1067.
10. Johnson T, Bull N, Hunt D, Marina N, Tomarev S, Martin K. Neuroprotective effects of intravitreal mesenchymal stem cell transplantation in experimental glaucoma. *Investig Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010, 51(4):2051-9
11. Johnson T, Dekorver N, Levasseur V, Osborne A, Tassoni A, Lorber B, et al. Identification of retinal ganglion cell neuroprotection conferred by platelet-derived growth factor through analysis of the mesenchymal stem cell secretome. *Brain.* 2014, 137:503-519.
12. Levkovitch-Verbin H, Sadan O, Vander S, Rosner M, Barhum Y, Melamed E, et al. Intravitreal injections of neurotrophic factors secreting mesenchymal stem cells are neuroprotective in rat eyes following optic nerve transection. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010, 51:6394–6400.
13. Siqueira R, Mesias A, Gurgel, Simões B, ScottIU, Jorge R. Improvement of ischaemic macular oedema after intravitreal injection of autologous bone marrow-derived haematopoietic stem cells. *Acta Ophtalmol.* 2015, 93:174-176.
14. Caffè A, Ahuja P, Holmqvist B, Azadi S, Forsell J, Holmqvist I, et al. Mouse retina explants after long-term culture in serum free medium. *J. Chem. Neuroanat.* 2001, 22:263-273.
15. Fernandez-Bueno L, Pastor J, Gayoso M, Alcalde L, García M. Muller and macrophage-like cell interactions in an organotypic culture of porcine neuroretina. *Mol Vis.* 2008 14:2148-2156.
16. Fisher S, Lewis G, Linberg K, Verardo M. Cellular remodeling in mammalian retina: results from studies of experimental retinal detachment. *Prog Retin Eye Res.* 2005, 24:395-431.
17. Labrador-Velandia S, Alonso-Alonso M, Alvarez-Sanchez S, Gonzáles-Zamora J, Carretero-Barrio I, Pastor J, et al. Mesenchymal stem cell therapy in retinal and optic nerve diseases: An update of clinical trial. *World J Stem Cells.* 2016, 8(11):376-383.

18. Labrador-Velandia S, Alonso-Alonso M, Di Lauro S, García-Gutierrez M, Srivastava G, Pastor J, et al. Mesenchymal stem cells provide paracrine neuroprotective resources that delay degeneration of co-cultured organotypic neuroretinal cultures. *Exp Eye Res.* 2019. S0014-4835(19)30025-9.
19. Rodriguez-Crespo D, Di Lauro S, Singh A, García-Gutierrez M, Garrosa M, Pastor J, et al. Triple-layered mixed co-culture model of RPE cells with neuroretina for evaluating the neuroprotective effects of adipose-MSCs. *Cell Tissue Res.* 2014, 358:705-16.
20. Jones B, Kondo M, Terasaki H, Lin Y, McCall M, Marc R. Retinal remodeling. *Jpn. J. Ophthalmol.* 2012, 56:289-306.
21. Li Y, He X, Li J, Ni F, Sun Q, Zhou Y. Proliferation and differentiation of direct co-culture of bone marrow mesenchymal stem cells and pigmented cells from the ciliary margin. *Mol Med Rep.* 2017, 15(6):3529–3534.
22. Ding S, Koh A, Kumar S, Ali Khan M, Alzahrani B, Mok P. Genetically-modified human mesenchymal stem cells to express erythropoietin enhances differentiation into retinal photoreceptors: An in-vitro study. *J Photochem Photobiol B.* 2019, 195:33-38.
23. Luo H, Jin K, Xie Z, Qiu F, Li S, Zou M, et al. Forkhead box N4 (Foxn4) activates Dll4-Notch signaling to suppress photoreceptor cell fates of early retinal progenitors. *Proc Natl Acad Sci.* 2012, 109(9):E553-62
24. Athanasiou D, Aguilà M, Bevilacqua D, Novoselov S, Parfitt A, Cheetham E. The cell stress machinery and retinal degeneration. *FEBS Letters.* 2013, 587(13):2008–2017.
25. Shukla V, Mishra S, Pant H. Oxidative stress in neurodegeneration. *Adv Pharmacol Sci.* 2011, 2011:572634.
26. Zheng L, Anderson R, Agbaga M, Rucker E, Le Y. Loss of BCL-XL in rod photoreceptors: increased susceptibility to bright light stress. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 2006, 47: 5583-5589.
27. Nguyen A, Campbell M, Kenna P, Kiang A, Tam L, Humphries M, et al. Calpain and photoreceptor apoptosis. *Adv Exp Med Biol.* 2012, 723:547e552.
28. Fernandez-Sanchez L, Lax P, Esquivá G, Martín-Nieto J, Pinilla I, Cuenca N. Safranal, a saffron constituent, attenuates retinal degeneration in P23H rats. *PLoS One.* 2012, 7(8):e43074.
29. Singh M, Tyagi S. Metalloproteinases as mediators of inflammation and the eyes: molecular genetic underpinnings governing ocular pathophysiology. *Int J Ophthalmol.* 2017, 10(8):1308–1318.
30. Blomhoff R, Blomhoff H. Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurol.* 2006, 66(7):606–630.