

Células Madre

AUTORES:

Camacho Maldonado Manuel

Camacho Maldonado Zabdi Alejandro

Espinosa Mendes Jorge Ramón

ASESOR:

Luis David Zepeda Domínguez

Colegio Anglo Mexicano de Coyoacan

MÉXICO 2015

Resumen

En el mundo hay mucha gente que a causa de su trabajo o de algunas actividades de alto riesgo pueden provocarse lesiones en los ojos, más específicos en la retina que es parte fundamental para la visión, dichas lesiones pueden causar que las personas vean borroso o que pierdan la visión completamente, hasta el momento se sabe el proceso de curación de este tipo de lesiones en la retina, pero no se ha logrado con éxito aparte de que son demasiado tardadas; por lo que estamos llevando a cabo un experimento con células madre para disminuir la inflamación y acelerar la curación de las lesiones en la retina, lo que se espera en estos modelos murinos con los que se está trabajando es que logren una recuperación total tanto de la retina como de la visión y la integridad anatómica del ojo, para que en un futuro si se tiene éxito, se pueda empezar a trabajar la aplicación de células madre en seres humanos para la regeneración y recuperación en lesiones retinianas.

Summary

In the world there are many people that because of their work or certain risk-activities can be induced eye injuries, specifically in the retina which is a fundamental part of vision, these injuries can cause in people blurred vision, or lose sight completely, until today we know the healing process of these kind of injuries in the retina, but it has not succeeded. That besides are too time-consuming; That besides are too time-consuming; so we are conducting an experiment with stem cells to reduce inflammation and speed healing of lesions in the retina, what is expected in these murine models with which we are working is to achieve full recovery of both the retina and the vision and the anatomical integrity of the eye, so that in the future if you are successful, you can start working applying human stem cells for regeneration and recovery in retinal lesions.

INTRODUCCIÓN

Planteamiento del problema.

¿Cuál es el efecto de los implantes de células madre Pluripotenciales de ratón en la recuperación de una lesión en la retina en los modelos murinos?

Hipótesis.

Los implantes de células madre pluripotentes de ratón son eficaces para la cicatrización en lesión retiniana traumática de un modelo murino.

Sustento teórico.

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.

El trauma ocular ocasiona uno de cada diez desprendimientos de retina y el pronóstico de desprendimiento no es bueno, ya que puede atrofiarse.

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.

En el trauma ocular abierto el paciente deberá ser intervenido quirúrgicamente de inmediato. 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.

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.

El termino célula madre fue acuñado a finales del siglo XX, cuando el científico alemán Darwinist Ernst Haeckel y Cols, fusionaron los conceptos de filogenia¹ y ontogenia² para descubrir stammzelle (Stem cell), un concepto nuevo para definir a las células primordiales que se diferencian en diferentes tipos de células y en organismos multicelulares.

¹ Filogenia: La filogenia es la historia del desarrollo evolutivo de un grupo de organismos.

² Ontogenia: Describe el desarrollo de un organismo, desde el ovulo fertilizado hasta su senescencia.

Si estas células se clasifican según su descendencia y potencial de desarrollo, es posible reconocer cuatro tipos de SC: Totipotenciales, Pluripotenciales, Multipotenciales, Unipotenciales. El presente proyecto está enfocado principalmente a las células pluripotenciales ya que las células madre pluripotenciales surgen de células totipotenciales 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.

La diferencia adicional de SC pluripotentes conduce a la información de células madre multipotentes y unipotentes. Las multipotentes solo pueden crear un número limitado de tipos celulares, y las células unipotentes solo las de su mismo tipo.

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.

El trasplante de SC parece una herramienta prometedora para la regeneración de tejidos enfermos, dañados o defectuosos. Las células madre hematopoyéticas³ ya se han utilizado para restaurar células hematopoyéticas. Los rápidos adelantes en la investigación con SC, han planteado la posibilidad de usar otro tipo de células para el reemplazo celular y tisular.

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 medios oculares claros. La pregunta ahora es: ¿Qué enfermedades retinianas son blancos más apropiados para los ensayos clínicos con células madre pluripotenciales?

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

Objetivo General

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

Fundamentación teórica.

Células Madre

³ Hematopoyesis: Es el proceso de formación, desarrollo y maduración de los elementos formes de la sangre a partir de un precursor célula común e indiferenciado conocido como célula madre hematopoyética.

Una célula madre es capaz de dividirse indefinidamente y diferenciarse en distintos tipos de células especializadas, no solo morfológicamente sino también de forma funcional.

Tienen la capacidad de dividirse simétricamente dando lugar a dos células hijas, una de las cuales tiene las mismas propiedades que la célula madre original y la otra adquiere la capacidad de poder diferenciarse si las condiciones ambientales son adecuadas. La mayoría de los tejidos de un organismo adulto poseen una población residente de célula madre que permite su renovación periódica y su regeneración cuando se produce un daño tisular. Algunas células madre adultas son capaces de diferenciarse en más de un tipo de células como las células madre mesenquimales⁴ y las células madre hematopoyéticas, mientras que otras son precursoras directas de las células del tejido en el que se encuentran.

Las células madre embrionarias son aquellas que forman parte de la masa celular interna de un embrión de 4 a 5 días de edad. Estas son pluripotentes lo cual significa que pueden dar origen a tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo. Una característica fundamental de las células madre embrionarias es que pueden mantenerse de forma indefinida, formando al dividirse una célula idéntica a ellas mismas y mantener una población estable de células madre.

CLASIFICACION DE LAS CELULAS MADRE.

Totipotenciales. Únicamente el cigoto y las descendientes de las dos primeras divisiones son células totipotenciales ya que tienen la capacidad de formar tanto el embrión como el trofoblasto de la placenta.

Pluripotenciales. A los 4 días las células pluripotenciales empiezan a diferenciarse, formando el blastocisto y la masa celular interna.

Multipotenciales. Son células capaces de producir un rango limitado de linajes de células diferenciadas de acuerdo a su localización

Unipotenciales. Son células capaces de generar un solo tipo de célula específica.

Anatomía y fisiología del ojo humano

El ojo es un órgano que detecta la luz y es la base del sentido de la vista. Su función consiste básicamente en transformar la energía lumínica en señales eléctricas que son enviadas al cerebro a través del nervio óptico.

⁴ Células Madre Mesenquimales: Son un ejemplo de tejido o de células madre “Adultas” pluripotentes, pueden producir varios tipos de células de los tejidos esqueléticos tales como el cartílago, hueso y grasa.

El ojo humano funciona de forma muy similar al de la mayoría de los vertebrados y algunos moluscos; posee una lente llamada cristalino que es ajustable según la distancia, un diafragma que se llama pupila cuyo diámetro está regulado por el iris y un tejido sensible a la luz que es la retina. La luz penetra a través de la pupila, atraviesa el cristalino y se proyecta sobre la retina, donde se transforma gracias a unas células llamadas fotorreceptoras en impulsos nerviosos que son trasladados a través del nervio óptico al cerebro.

Su forma es aproximadamente esférica, mide 2,5 cm de diámetro y está lleno de un gel transparente llamado humor vítreo que rellena el espacio comprendido entre la retina y el cristalino.

En la porción anterior del ojo se encuentran dos pequeños espacios: la cámara anterior que está situada entre la córnea y el iris, y la cámara posterior que se ubica entre el iris y el cristalino. Estas cámaras están llenas de un líquido que se llama humor acuoso, cuyo nivel de presión, llamado presión intraocular, es muy importante para el correcto funcionamiento del ojo.

Para que los rayos de luz que penetran en el ojo se puedan enfocar en la retina, se deben refractar. La cantidad de refracción requerida depende de la distancia del objeto al observador. Un objeto distante requerirá menos refracción que uno más cercano. La mayor parte de la refracción ocurre en la córnea, que tiene una curvatura fija. Otra parte de la refracción requerida se da en el cristalino. El cristalino puede cambiar de forma, aumentando o disminuyendo así su capacidad de refracción. Al envejecer, el ser humano va perdiendo esta capacidad de ajustar el enfoque, deficiencia conocida como presbicia o vista cansada.

Conjuntiva

La conjuntiva es una membrana mucosa y transparente que tapiza el globo ocular desde el limbo hasta los fondos de saco conjuntivales. Ayuda a lubricar el globo ocular, produciendo mucosidad y lágrimas, aunque éstas en una cantidad menor que las glándulas lagrimales.

Córnea

Es la estructura hemisférica (cónica) transparente localizada al frente del órgano ocular, y que permite el paso de la luz a las porciones interiores y que protege al iris y cristalino no posee vasos sanguíneos pero si esta inervado. Se nutre de la lágrima y del humor acuoso.

Humor acuoso

Es un líquido claro que fluye por la cámara anterior (entre la córnea y el iris) y la cámara posterior (entre iris y cristalino). También tiene la función de mantener su presión constante, lo que ayuda a conservar la convexidad original de la córnea.

Iris

Es la membrana coloreada y circular del ojo que separa la cámara anterior de la cámara posterior. Posee una apertura central de tamaño variable que comunica las dos cámaras: la pupila.

Cristalino

El cristalino es una lente biconvexa que está situada tras el iris y delante del humor vítreo. Su propósito principal consiste en permitir enfocar objetos situados a diferentes distancias.

Ligamento suspensor del cristalino

El ligamento suspensor del cristalino se encarga, junto con el cristalino, de dividir el ojo en dos secciones: la cámara anterior y la posterior. Sin embargo, su principal función es la de aumentar o reducir la tensión del cristalino para que este adopte una forma más o menos esférica y se logre el enfoque de los objetos.

Cuerpo ciliar

El cuerpo ciliar es una parte del ojo situada entre el iris y la región de la ora serrata en la retina. Es el responsable de la producción del humor acuoso y del cambio de forma del cristalino necesario para lograr la correcta acomodación (enfoque). Está formado por dos estructuras, el músculo ciliar y los procesos ciliares.

Ora serrata

Es el límite de la retina. Existe una ora serrata nasal o medial y una ora serrata lateral o temporal. Por delante de la ora serrata la retina que compone la porción ciliar y la porción irídea de la retina no es fotosensible.

Tendón y músculo ocular

Los músculos oculares extrínsecos son músculos que se insertan en el exterior del globo ocular y en los huesos de la órbita. Tienen la función principal de mover el globo ocular en la

dirección deseada y de manera voluntaria. Son los músculos rectos superior, interno u externo y los músculos oblicuos mayor y menor.

Esclerótica

Es la "parte blanca del ojo". Es una membrana de color blanco, gruesa, resistente y rica en fibras de colágeno. Constituye la capa más externa del globo ocular. Su función es la de darle forma y proteger a los elementos más internos.

Coroides

Es una membrana profusamente irrigada con vasos sanguíneos y tejido conectivo, de coloración oscura que se encuentra entre la retina y la esclerótica del ojo. La función de la coroides es mantener la temperatura constante y nutrir a algunas estructuras del globo ocular.

Retina

Es la capa de tejido sensible a la luz que se encuentra en la parte posterior interna del ojo y actúa como la película en una cámara: las imágenes pasan a través del cristalino del ojo y son enfocadas en la retina. La retina convierte luego estas imágenes en señales eléctricas y las envía a través del nervio óptico al cerebro. La retina normalmente es de color rojo debido a su abundante suministro de sangre. Un oftalmoscopio le permite al médico ver a través de la pupila y el cristalino hasta la retina. Si el médico observa cualquier cambio en el color o apariencia de la retina, esto puede ser indicio de una enfermedad.

Cualquier persona que experimente cambios en la percepción de la nitidez o del color, destellos de luces, moscas volantes o distorsión en la visión debe hacerse examinar la retina.

Fóvea

La fóvea es una pequeña depresión en la retina, en el centro de la llamada mácula lútea.

Nervio Óptico

El nervio óptico está compuesto por axones de las células fotorreceptoras situadas en la retina, capaces de convertir la luz en impulsos nerviosos. Transmite la información visual desde la retina hasta el cerebro para realizar funciones de reconocimiento de imágenes o patrones.

Es un nervio sensorial que emerge del globo ocular; es el nervio que nos permite la visión. Mide aproximadamente 4 centímetros de longitud.

Humor vítreo

El humor vítreo es un líquido gelatinoso y transparente que rellena el espacio comprendido entre la retina y el cristalino (cumple la función de amortiguar ante posibles traumas). El humor vítreo igual que el humor acuoso proveen los elementos necesarios para el metabolismo de los tejidos vasculares como la córnea y el cristalino. Ambos junto a la córnea y el humor acuoso constituyen los 4 medios transparentes del ojo.

Patología de la retina

Retinopatía Diabética

La diabetes afecta a la capacidad del organismo de usar y almacenar el azúcar y puede causar trastornos graves en los ojos: cataratas, glaucoma, visión borrosa y alteraciones en los vasos oculares.

El 60% de pacientes con diabetes de 15 o más años de duración, presenta vasos sanguíneos dañados en los ojos. Sólo un porcentaje reducido de los que desarrollan retinopatías tienen problemas serios de visión y un porcentaje aún más pequeño se vuelve ciego.

Hay dos tipos de retinopatía diabética. En el primero, la retinopatía no proliferativa, los vasos sanguíneos de la retina presentan cambios, estos vasos gotean y sufren hemorragias, en algunos casos, el líquido exudativo se deposita en la mácula, con lo que los objetos situados en la zona central de la visión se vuelven borrosos, dificultando la lectura y el trabajo detallado. Si el proceso sigue avanzando, puede convertirse en ceguera. La retinopatía es una señal de peligro: puede avanzar a etapas más graves y dañar la vista.

El segundo tipo es la retinopatía proliferativa, donde hay neoformaciones de vasos, de gran fragilidad, que pueden desgarrarse y sangrar dentro del humor vítreo, pudiendo ocasionar también desprendimiento de retina y glaucoma.

Moscas volantes

Las "moscas volantes" son pequeños puntitos móviles que muchas personas ven en su campo de visión. Realmente son pequeños grumos gelatinosos que flotan en el líquido vítreo del interior del ojo. La retina los percibe como sombras en forma de puntos, círculos, líneas o telas de araña. Generalmente no tienen gran importancia y se deben al envejecimiento del vítreo o a la miopía. No obstante, a veces pueden ser las primeras

manifestaciones de una rotura o desgarro de la retina, con grave riesgo de desprendimiento de la misma.

Desgarros y desprendimientos de retina

El desprendimiento de retina afecta a una de cada 10.000 personas por año. Se trata de un problema visual grave que puede ocurrir a cualquier edad, aunque normalmente suele darse en individuos de edad media o en personas de la tercera edad. Suele ser más frecuente en personas que son miopes o en aquellos que han tenido anteriormente algún trastorno en la retina. Un golpe fuerte puede causar el desprendimiento de retina. Con menor frecuencia, se relaciona con enfermedades de tipo hereditario, así puede presentarse incluso en niños. El tratamiento no debe demorarse ya que puede acabar en deterioro o pérdida irreversible de la visión.

La mayoría de los desprendimientos de retina son causados por la presencia de hemorragias o desgarros en la estructura tisular de la retina. En el interior del ojo se encuentra el humor vítreo que está firmemente adherido a la retina en algunos puntos concretos.

Metodología de Investigación.

Expansión de células madre embrionarias de ratón (mESC).

Las mESC se sembraron a una densidad de 50,000 células por centímetro cuadrado, sobre una monocapa de fibroblastos embrionarios de ratón previamente arrestados en su ciclo celular, utilizándose medio basal de mESC suplementado con 15% de suero fetal bovino, 2-mercaptoetanol al 0.1 mM factor inhibidor de leucemia a razón de 1000 U/ml; se incubaron a 37 grados centígrados 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 se obtuvieron dosis de 20,000 y 50,000 células re suspendidas en 0.025 mL de solución salina balanceada al 0.09%.

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 hrs de luz/oscuridad, con humedad controlada (50-60%) y condiciones de temperatura constante.

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

Implante de células madre pluripotentes.

Los grupos de estudio se dividieron en 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 la 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 intravítreo de solución salina balanceada; al grupo 2 se le implantaron 20,000 mESC intravítreas re suspendidas en 0.025 ml de solución salina balanceada; el grupo 3 recibió 50,000 mESC intravítreas re suspendidas en 0.025. ml de solución salina balanceada; todos los grupos experimentales recibieron las inyecciones 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 incluso del tejido parafina y se obtuvieron cortes histológicos de 3 m de grosor, tiñéndolos posteriormente con hematoxilina y eosina para ser analizadas posteriormente por un médico patólogo mediante microscopía directa, en el cual desconocía a qué grupo pertenecía cada corte histológico.

Implante de Células Madre Pluripotentes y Estudio Histopatológico.

Las aplicaciones ínvitreas 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.

Resultados Obtenidos.

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, de signó 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% presento 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 observo respuesta inflamatoria en 20% de las muestras sin embargo, 60% presento respuesta inflamatoria escasa, 10% con respuesta inflamatoria leve y 10% con respuesta inflamatoria moderada. En el Grupo 3 no se observo respuesta inflamatoria en 50% de las muestras, 40% presento respuesta inflamatoria escasa y 10% presento una respuesta leve.

Con respecto a la integridad anatómica, el 30% del grupo control sufrió una alteración leve y 70% presento una alteración moderada, mientras que el grupo 1, 50% presento 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% presento alteración leve y 10% restante una alteración moderada. En el grupo 3 90% de las muestras mantuvo conservada su integridad anatómica y el 10% sufrió una alteración leve.

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 tarareados, así como una respuesta notoriamente favorable en el grupo 3, mismo que recibió 50,000 células por dosis.

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.

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 presentará una menor respuesta inflamatoria y se conservará la integridad anatómica, conllevando a una significativa cicatrización.

Conclusiones

El implante mESC es eficaz para una mejor cicatrizacion de lesiones retinianas traumaticas al reducir la respuesta inflamatoria y restaurar la integridad anatomica, pero es necesario continuar con protocolos de investigacion para determinar otros parametros como localizacion y biodistribucion de las mESC, dosis terapéuticas y seguimientos a largo plazo.

Propuesta

Nuestra propuesta consiste en que se sigan haciendo estudios e investigaciones con respecto al conocimiento y manejo de este tipo de células llamadas células madre para que en un futuro no muy lejano se pueda experimentar con seres humanos y generar una mayor facilidad en la cura de este tipo de enfermedades como lo son las lesiones retinianas.

Bibliografía (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-Hernandez DM, Perez BX, Sanchez 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. Garcia-Arumi J, Martinez-Castillo V, et al. Guías de tratamiento de desprendimiento de retina rheimatogénico. Arch Soc Esp Oftalmol 2013; 88(1): 11-35.