



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**Terapia celular con epitelio pigmentario
de la retina y precursores de
fotorreceptores como nueva estrategia
terapéutica para la retinosis pigmentaria**

Diana Paola Mora Ramírez

TESIS DOCTORAL, 2019



Universitat Autònoma de Barcelona
Doctorado en Cirugía y Ciencias Morfológicas
Departamento de Cirugía

Terapia celular con epitelio pigmentario de la retina y precursores de fotorreceptores como nueva estrategia terapéutica para la retinosis pigmentaria

Diana Paola Mora Ramírez

Tesis doctoral

Directores:

Laura Fontrodona Montals
Miguel Ángel Zapata Victori
Vicente Jesús Martínez Castillo

Tutor:

Prof. José García-Arumí

Barcelona, 2019

© 2019 Diana Paola Mora Ramírez

© 2019 Universitat Autònoma de Barcelona

LAURA FONTRODONA MONTALS,

Doctora en Genética, por la Universidad Autónoma de Barcelona.

CERTIFICA,

Que DIANA PAOLA MORA RAMÍREZ licenciada en medicina y cirugía, especialista en oftalmología ha trabajado bajo mi dirección en el transcurso de proyecto de tesis doctoral titulado:

“Terapia celular con epitelio pigmentario de la retina y precursores de fotorreceptores como nueva estrategia terapéutica para la retinosis pigmentaria”

Habiendo supervisado personalmente el trabajo efectuado así como la redacción y presentación del mismo.

Por lo tanto considero que el trabajo reúne las condiciones necesarias para ser defendido ante el tribunal estipulado, para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Y para que conste a todos los efectos, firmo la presente en

Barcelona, a 2 de mayo de 2019.

MIGUEL ÁNGEL ZAPATA VICTORI,

Doctor en medicina y cirugía. Profesor asociado de oftalmología de la Universitat Autònoma de Barcelona.

CERTIFICA,

Que DIANA PAOLA MORA RAMÍREZ licenciada en medicina y cirugía, especialista en oftalmología ha trabajado bajo mi dirección en el transcurso de proyecto de tesis doctoral titulado:

“Terapia celular con epitelio pigmentario de la retina y precursores de fotorreceptores como nueva estrategia terapéutica para la retinosis pigmentaria”

Habiendo supervisado personalmente el trabajo efectuado así como la redacción y presentación del mismo.

Por lo tanto considero que el trabajo reúne las condiciones necesarias para ser defendido ante el tribunal estipulado, para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Y para que conste a todos los efectos, firmo la presente en

Barcelona, a 2 de mayo de 2019.

VICENTE JESÚS MARTÍNEZ CASTILLO,

Doctor en medicina y cirugía. Profesor asociado de oftalmología de la Universitat Autònoma de Barcelona.

CERTIFICA,

Que DIANA PAOLA MORA RAMÍREZ licenciada en medicina y cirugía, especialista en oftalmología ha trabajado bajo mi dirección en el transcurso de proyecto de tesis doctoral titulado:

“Terapia celular con epitelio pigmentario de la retina y precursores de fotorreceptores como nueva estrategia terapéutica para la retinosis pigmentaria”

Habiendo supervisado personalmente el trabajo efectuado así como la redacción y presentación del mismo.

Por lo tanto considero que el trabajo reúne las condiciones necesarias para ser defendido ante el tribunal estipulado, para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Y para que conste a todos los efectos, firmo la presente en

Barcelona, a 2 de mayo de 2019.

JOSÉ GARCÍA-ARUMÍ,

Doctor en Medicina y Cirugía, Jefe de Servicio del Servicio de Oftalmología del Hospital Vall d'Hebron. Catedrático en Oftalmología de la Universitat Autònoma de Barcelona.

CERTIFICA,

Que DIANA PAOLA MORA RAMÍREZ licenciada en medicina y cirugía, especialista en oftalmología ha trabajado bajo mi dirección en el transcurso de proyecto de tesis doctoral titulado:

“Terapia celular con epitelio pigmentario de la retina y precursores de fotorreceptores como nueva estrategia terapéutica para la retinosis pigmentaria”

Habiendo supervisado personalmente el trabajo efectuado así como la redacción y presentación del mismo.

Por lo tanto considero que el trabajo reúne las condiciones necesarias para ser defendido ante el tribunal estipulado, para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Y para que conste a todos los efectos, firmo la presente en

Barcelona, a 2 de mayo de 2019.

*À mes amours:
Maëva et Marc*

Agradecimientos

Son muchas las personas que de manera personal y profesional han contribuido a la realización de este trabajo. Entre ellas quiero agradecer especialmente:

Al Prof. José García-Arumí, tutor de esta tesis, por su apoyo, la confianza depositada en mí, por brindarme la oportunidad de integrarme al grupo de investigación de oftalmología del Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR) y participar en el proyecto de investigación objeto de estudio de la presente tesis doctoral.

A Laura Fontrodona, codirectora de esta tesis, por su interés en la dirección de esta tesis, por la paciencia y la ayuda en su redacción, por la motivación constante y por las horas compartidas en el laboratorio (y delante del ordenador).

Al Dr. Miguel Ángel Zapata, codirector de esta tesis, por sus valiosas sugerencias durante la elaboración de la presente tesis y su buen humor en los momentos difíciles.

Al Dr. Vicente Martínez, codirector de esta tesis, por transmitirme sus conocimientos de retina médica y quirúrgica y por sus consejos en mi proceso de formación como oftalmóloga.

A Marina Riera, bióloga del VHIR en la primera parte del proyecto, por introducirme en el mundo de la investigación básica, por su calidad humana y excelencia profesional.

A Anna Salas, bióloga del VHIR, por su gran ayuda en el laboratorio, con los trasplantes y con los análisis histológicos.

A la Fundación LaMarató de TV3, por la financiación de este proyecto de investigación.

A la Dra. Anna Veiga y a todo el equipo del Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona, por colaboración en la obtención y caracterización de las células madre diferenciadas a EPR y precursoras de fotorreceptores utilizadas en este trabajo.

Pero, sobre todo, a mi familia. Gracias a mis padres, a quienes debo lo que soy. Gracias a mi amorcito, por toda su paciencia, su incondicional apoyo, sus palabras alentadoras en los momentos de agobio, por todo su amor y comprensión. Y a mi hija, por todas las horas sacrificadas, por su sonrisa infinita.

Este trabajo es por ustedes.

Índice

Agradecimientos	15
Abreviaturas	21
Introducción	25
I.1 El ojo	27
I.1.1 La retina	27
I.1.1.1 El epitelio pigmentario de la retina	29
I.1.1.2 Los fotorreceptores	32
I.1.1.3 Ciclo visual del retinol	34
I.2 Retinosis pigmentaria	37
I.2.1 Epidemiología	38
I.2.2 Genes implicados en los diferentes patrones de herencia de la RP	39
I.2.2.1 RP autosómica dominante	39
I.2.2.2 RP autosómica recesiva	40
I.2.2.3 Genes implicados en la RP ligada a X	40
I.2.2.4 RP de herencia digénica	40
I.2.3 Vías bioquímicas afectadas en la RP	41
I.3 Opciones terapéuticas en la retinosis pigmentaria	43
I.3.1 Terapia génica	44
I.3.1.1 Terapia génica en enfermedades oculares	44
I.3.2 Terapia celular	45
I.3.2.1 Células madre en el ojo	46
I.3.2.2 Historia de las células madre	47
I.3.2.3 Campo de aplicación terapéutica de la terapia celular en distrofias retinianas	48
I.4 Modelos animales para la investigación de enfermedades retinianas	51
I.4.1 Modelo de rata del Royal College of Surgeons (RCS)	52

Justificación	53
Hipótesis	55
Objetivos	57
Materiales y métodos	59
M.1 Cultivo celular y diferenciación de células de EPR a partir de células madre humanas	61
M.1.1 Inmunocitoquímica de las células de EPR diferenciadas a partir de hPSC	62
M.1.2 Determinación de la expresión de ARN mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real	63
M.2 Cultivo y diferenciación de células precursoras de fotorreceptores a partir de células madre humanas	65
M.2.1 Inmunocitoquímica y determinación de la expresión de ARN mediante reacción en PCRC en tiempo real de las CPF diferenciados a partir de hPSC	66
M.2.2 Generación de fotorreceptores que expresan fluorescencia verde	66
M.3 Trasplante subretiniano de células de EPR y de CPF derivadas de hESC o de hiPSC	67
M.4 Inmunosupresión de las ratas RCS con ciclosporina A	69
M.5 Análisis histológicos	71
M.6 Análisis inmunohistoquímicos	73
M.6.1 Inmunotinción de las criosecciones	73
M.6.2 Inmunotinción de las preparaciones en <i>flat mount</i>	74
M.7 Microscopía electrónica de transmisión	77
M.8 Análisis TUNEL	79
M.9 Valoración de la función visual mediante electroretinografía	81
Resultados	85
R.1 Terapia celular con células madre pluripotentes humanas derivadas a EPR para el tratamiento de distrofias de retina	87
R.1.1 Diferenciación y caracterización de células de epitelio pigmentario de la retina (EPR) a partir de células madre embrionarias (hESC) y pluripotentes inducidas (hiPSC) humanas	87
R.1.1.1 Diferenciación de hPSC a EPR	87
R.1.1.2 Caracterización de las células EPR obtenidas a partir de hPSC	89
R.1.2 Trasplante de las células de EPR derivadas de hESC y hiPSC en un modelo animal de retinosis pigmentaria: la rata Royal College of Surgeons	92

R.1.3 Integración de las células derivadas de hPSC en la monocapa de EPR endógena de la rata	95
R.1.4 Las células trasplantadas expresan marcadores específicos de EPR y presentan capacidad fagocítica	95
R.1.5 Valoración de la funcionalidad del EPR trasplantado a través de la autofluorescencia	99
R.1.6 Efecto de la terapia celular sobre la gliosis y la apoptosis de la retina patológica	101
R.1.7 Análisis ultraestructural del efecto de la terapia celular en la retina trasplantada	102
R.1.8 Impacto de la terapia celular en la preservación de las capas celulares de la retina	103
R.1.8.1 Impacto de la terapia celular en retinas trasplantadas a día p21	105
R.1.8.2 Impacto de la terapia celular en retinas trasplantadas a día p42	109
R.1.9 Evaluación de la actividad electroretinográfica de las ratas RCS con y sin terapia celular con EPR derivado de hPSC	110
R.1.10 Inmunosupresión de las ratas RCS con ciclosporina A	112
R.2 Terapia celular combinada con células de EPR y CPF para el tratamiento de distrofias de retina	115
R.2.1 Diferenciación y caracterización de hPSC a células precursoras de fotorreceptores	115
R.2.1.1 Diferenciación de hPSC a células precursoras de fotorreceptores	115
R.2.1.2 Caracterización de las células precursoras de fotorreceptores obtenidas a partir de hPSC	117
R.2.2 Trasplante combinado de células derivadas a EPR y a precusores de fotorreceptores a partir de hiPSC y hESC en el modelo de rata RCS	120
R.2.3 La terapia celular combinada es más efectiva que la terapia celular con EPR en el enlentecimiento de la degeneración de retina	122
R.2.4 Los ojos que reciben la terapia celular combinada responden mejor a los estímulos lumínicos que los ojos trasplantados con terapia celular única con EPR	125
Discusión	131
D.1 Protocolos de diferenciación celular	133
D.2 Trasplante celular único con EPR humano en el modelo de distrofia retiniana de la rata RCS	135
D.3 Trasplante celular combinado con EPR + CPF humanos en el modelo de distrofia retiniana de la rata RCS	137
D.4 Métodos de integración celular en modelos animales de patologías degenerativas de la retina	139
D.4.1 Matrices 3D	139

D.4.2 Retinogénesis <i>in vitro</i>	140
D.5 Efectos de la terapia celular única con EPR humano en la rata RCS	141
D.6 Efectos de la terapia celular combinada de EPR + CPF humanas en la rata RCS	147
D.7 Expectativas y aplicaciones clínicas de la terapia celular	149
D.7.1 Combinación de edición genética y terapia de reemplazo celular: ¿es el futuro de la terapia regenerativa ideal?	150
Conclusiones	153
Anexos	157
Bibliografía	171

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AF	Autofluorescencia
AGF	Angiografía fluoresceínica
BEST1	Bestrophin 1
BSA	Albúmina de suero bovino
CHX10	Visual system homeobox 2: Vsx2
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeat</i>
CCG	Capa de células ganglionares
cd	Candelas
CD	Capa de detritus
CM	Células madre
CNE	Capa nuclear externa
CNI	Capa nuclear interna
CO₂	Dióxido de carbono
CPF	Células precursoras de fotorreceptores
CRALBP	<i>Cellular retinylaldehyde-binding protein</i>
CsA	Ciclosporina A
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DHA	Ácido docosahexaenoico
DMAE	Degeneración macular asociada a la edad
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>

DR	Distrofias retinianas
EDTA	Ácido etilendiamintetracético
EMEA	Agencia Europea de Medicamentos
EPR	Epitelio pigmentario de la retina
ERG	Electrorretinograma
ESC	<i>Embryonic stem cells</i>
ESR	Espacio subretiniano
FDA	Food and Drug Administration
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
hESC	<i>Human embryonic stem cells</i>
hiPSC	<i>Human induced pluripotent stem cells</i>
hPSC	<i>Human pluripotent stem cells</i>
HSM	del inglés <i>human specific marker</i>
IB	invaginaciones basales
IGF-1	del inglés <i>Insulin-like growth factor-1</i>
iPSC	del inglés <i>induced pluripotent stem cells</i>
IRBP	del inglés <i>interphotoreceptor-binding protein</i>
MB	membrana de Bruch
Me	melanosomas
MEC	Matriz extracelular
MER	tirosin-quinasa
MERTK	<i>MER proto-oncogene tyrosine kinase</i>
MET	Microscopía electrónica de transmisión
MITF	<i>Melanocyte Inducing Transcription Factor</i>
mm	Milímetro
OCT	<i>Optimum cutting temperature</i>
OTX2	<i>Orthodenticle Homeobox 2</i>
PAX6	<i>Paired Box 6</i>
PCRc	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PEDF	<i>Pigment epithelium-derived factor</i>
PI	Posinyección
PSC	<i>Pluripotent stem cells</i>
p21	día 21 posnatal

p42	día 42 posnatal
RCS	Royal College of Surgeons
RP	Retinosis pigmentaria
RPE65	<i>Retinal Pigment Epithelium Specific Protein 65</i>
RPGR	<i>Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator</i>
RPad	Retinosis pigmentaria autosómica dominante
RPar	Retinosis pigmentaria autosómica recesiva
SI/SE	Capa de segmentos internos y externos de fotorreceptores
SE	Segmento externo
seg	segundo
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TUNEL	<i>Terminal deoxyucleotidyl transferase-dUTP nick end labelling</i>
VAA	Vectores víricos adenoasociados
VCo	Vasos coroideos
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
ZO-1	Zona occludens 1
3D	Tridimensional

Introducción



I.1

Introducción

El ojo

El ojo, el órgano del sentido de la vista, capta las señales luminosas del ambiente exterior y las transforma en impulsos eléctricos para conducirlos al cerebro donde serán registrados, procesados y finalmente convertidos en imágenes. En el segmento posterior del ojo se encuentra la retina, una membrana transparente constituida fundamentalmente por neuronas cuyas fibras desembocan en la papila para formar el nervio óptico.¹

Para entender mejor la fisiopatología de las distrofias retinianas, objeto de estudio del presente trabajo, se detallan a continuación las características anatómicas y fisiológicas de la retina.

I.1.1 La retina

La retina se deriva del tubo neural, convirtiéndose en una extensión del sistema nervioso central. Como tal posee estructuras especializadas para transducir los estímulos ambientales lumínicos en potenciales eléctricos.

La retina se divide por capas según la agrupación espacial de las células. Partiendo desde la más interna, que es la que está en contacto con el humor vítreo, la retina consta de las siguientes capas²:

- 1) Una membrana limitante interna, cuya cara más externa está formada por las terminaciones de las células de Müller, cubiertas por una membrana basal; y su cara lisa más interna es la que está en contacto con la superficie del cuerpo vítreo.
- 2) Una capa de fibras nerviosas, que contiene los axones de las células ganglionares.

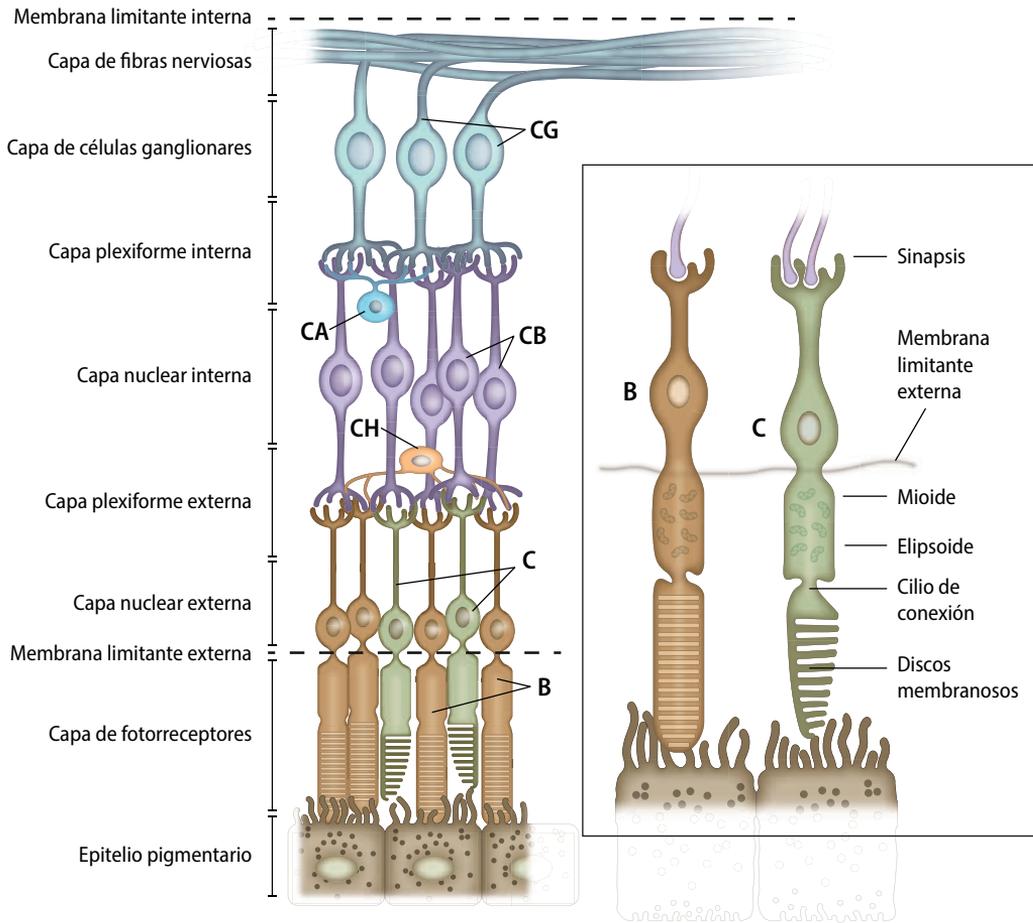


Figura I.1. Representación esquemática de las capas de la retina, las células que las constituyen y sus sinapsis. Detalle ampliado de las células fotorreceptoras cono (C) y bastón (B). CG: células ganglionares. CB: células bipolares. CA: células amacrinas. CH: células horizontales.

- 3) Una capa de células ganglionares, que contiene los núcleos de dichas células, además de algunas células amacrinas.
- 4) Una capa plexiforme interna, que contiene la zona de conexión entre las células bipolares con las células ganglionares y amacrinas.
- 5) Una capa nuclear interna, que contiene los núcleos de células horizontales, bipolares, amacrinas, interplexiformes y de Müller.
- 6) Una capa plexiforme externa, que contiene la zona donde hacen conexión las células fotorreceptoras con las células horizontales y bipolares.

- 7) Una capa nuclear externa, que contiene los núcleos de los fotorreceptores: conos y bastones.
- 8) Una membrana limitante externa, constituida por las uniones intercelulares entre las células fotorreceptoras y entre los segmentos internos de las células fotorreceptoras con las células de Müller.
- 9) Una capa de fotorreceptores, que contiene los segmentos externos e internos de conos y bastones.
- 10) Una capa de células del epitelio pigmentario de la retina (figura I.1).

1.1.1.1 El epitelio pigmentario de la retina

El epitelio pigmentario de la retina (EPR) es una monocapa de células epiteliales polarizadas y cargadas de melanina que reposa sobre la membrana de Bruch. El EPR es la capa más externa de la retina, con su cara basal orientada hacia el endotelio fenestrado de la *coriocalipularis*, y su cara apical con microvellosidades que se interdigitan con los segmentos externos de los fotorreceptores estableciendo una interacción estrecha y compleja entre ellos (figura I.2). La *coriocalipularis* consiste en una capa fina de capilares coroides que irrigan el tercio externo de la retina, desde la plexiforme externa hasta el EPR y toda la fóvea.³

Dentro de las múltiples funciones del EPR, está la formación de la barrera hematorretiniana externa junto con la membrana de Bruch y la *coriocalipularis*. La barrera hematorretiniana interna está constituida principalmente por las células endoteliales de los capilares retinianos.⁴

El EPR juega un papel clave en el ciclo visual y en la supervivencia y mantenimiento de los fotorreceptores gracias a que⁵:

- Establece uniones estrechas intercelulares que forman una barrera entre el espacio subretiniano y la *coriocalipularis* impidiendo el paso de agua a través de la ruta de transporte paracelular.
- Absorbe la energía lumínica que el cristalino enfoca en la retina, evitando su reflexión dentro de ojo. La barrera hematorretiniana consigue evitar esta reflexión de luz gracias a que sintetiza varios pigmentos especializados. Según las diferentes longitudes de onda que alcanzan la barrera, sintetiza determinados pigmentos como la melanina que se acumula en los melanosomas o la lipofuscina que se va acumulando intracelularmente a lo largo

de la vida. Sin esta función de absorción de luz, el tejido iría acumulando oxígeno induciendo el daño oxidativo de la retina.

- Contiene altas cantidades de antioxidantes naturales como la superóxido dismutasa, la catalasa, carotenoides como la luteína y zeaxantina, ascorbato, α -tocoferol y β -caroteno.
- Transporta iones, agua y productos metabólicos finales (como el ácido láctico) del espacio subretiniano al sistema circulatorio. Este transporte lo facilita la bomba Na^+ - K^+ -ATPasa y otros cotransportadores. Además, la serotonina y el neuropéptido Y también son fundamentales para este transporte transepitelial. El EPR también absorbe de la sangre nutrientes como glucosa, vitamina A (*trans*-retinol) isomerizada a 11-*cis*-retinal, ácidos grasos y los transporta hasta los fotorreceptores.
- Garantiza el mantenimiento de la excitabilidad de los fotorreceptores gracias a varios mecanismos: (i) **reisomerización del *trans*-retinal** formado por la absorción de fotones a 11-*cis*-retinal y posterior transporte de vuelta al fotorreceptor (ciclo visual del retinal), (ii) **estabilización de la corriente iónica del espacio subretiniano** fomentada por la conductancia

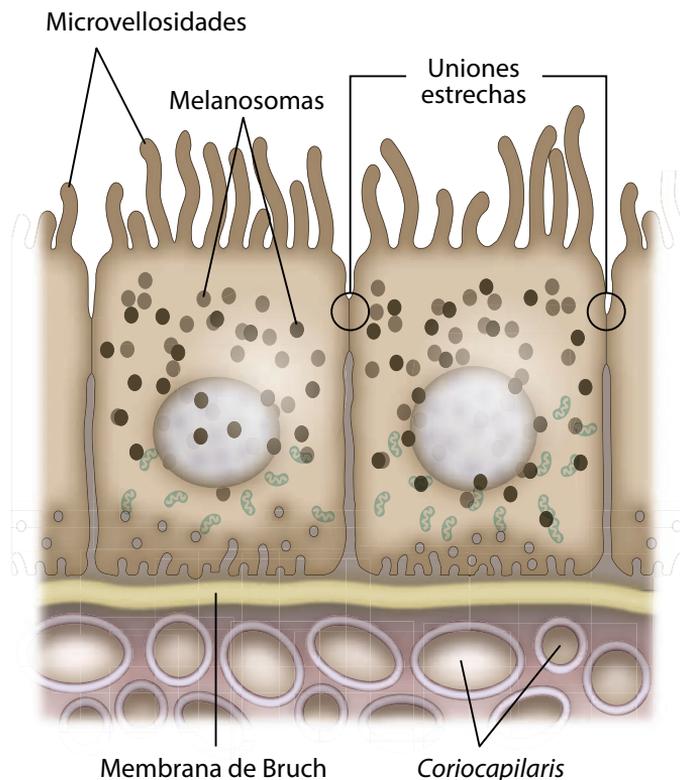


Figura I.2. Células del epitelio pigmentario de la retina.

iónica voltaje-dependiente de la membrana apical del EPR y (iii) **fagocitosis de los discos membranosos de los segmentos externos de los fotorreceptores**. Los discos más apicales de los segmentos externos de los fotorreceptores contienen altas concentraciones de radicales libres, proteínas derivadas de la fotooxidación y lípidos que son expulsados de los segmentos externos. Estos discos expulsados son fagocitados y digeridos por el EPR. Los productos de dicha digestión, como algunos ácidos grasos (docosahexanoico-DHA), son reciclados y transportados de nuevo a los fotorreceptores para formar nuevos discos en los segmentos externos y mantener la integridad estructural de los mismos. Se ha estimado que la tasa de recambio de un segmento externo entero es de diez días.⁵

- Secreta factores de crecimiento esenciales para mantener la integridad estructural de los fotorreceptores y del endotelio de la *coriocapilaris*. Es capaz de secretar diversos factores de crecimiento, algunas interleucinas y el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF, del inglés *pigment epithelium-derived factor*). El PEDF es secretado del lado apical del EPR y actúa en los fotorreceptores y en el resto de las neuronas de la retina. Ha sido descrito como un factor con propiedades antiangiogénicas y como un neuroprotector ya que confiere protección contra el mecanismo de apoptosis inducido por hipoxia o glutamato.⁶ Otro de los factores de crecimiento esenciales secretados por el EPR es el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, del inglés *vascular endothelial growth factor*). Este es secretado del lado basal del EPR en bajas concentraciones, y actúa en el endotelio de la *coriocapilaris* impidiendo su apoptosis y mantener su integridad. Desempeña su función como un factor de permeabilidad estabilizando las fenestraciones del endotelio de la coroides.⁷
- Confiere un privilegio inmunológico al secretar factores inmunosupresores, mecanismos aún no del todo claros.⁵

Se ha demostrado que la reducción del transporte epitelial de iones puede causar degeneración retiniana, tal y como se ha observado en un modelo de ratón transgénico con un gen alterado para los canales de Cl^- , hecho que impide la excreción de ácido láctico.⁸ Esto produce un estrés metabólico y pérdida de fotorreceptores que resulta en un fenotipo comparable al de la retinosis pigmentaria en humanos.

Por otro lado, también se conoce que la alteración de varios reguladores del proceso de fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores, entre los que destacan los receptores de CD36 (internalización del disco) y MERTK e integrina (transducción de la unión específica del disco al EPR), compromete radicalmente la actividad fagocítica del EPR.⁵

Por tanto, el EPR constituye una parte estructural y funcional indispensable de la retina, sin la cual una correcta función visual no sería posible.

1.1.1.2 Los fotorreceptores

Los fotorreceptores son las células más abundantes de la retina y se clasifican en dos grupos según sus características fisiológicas y funcionales: los bastones y los conos. Son neuronas sensoriales especializadas cuya función principal es la fototransducción, es decir, el proceso bioquímico en el cual la luz captada por el ojo es transformada en señales eléctricas que son transmitidas a nivel cerebral y constituyen lo que se conoce como la visión.²

Los *bastones* son los encargados de la visión nocturna y en blanco y negro gracias a su alta sensibilidad a la luz. Su fotopigmento es la rodopsina. Existen alrededor de cien millones de bastones (95 % de la totalidad de fotorreceptores) en la retina humana, en una proporción respecto a los conos de 20:1. Están localizados predominantemente en la periferia y ausentes a una distancia de 350 μm de la fovea.²

Los *conos* son estructural y funcionalmente distintos de los bastones. Constituyen aproximadamente el 5 % del total de fotorreceptores de la retina humana (que contiene alrededor de cinco millones) y son los responsables de la visión en color de alta definición y de la visión fotópica o en condiciones de buena iluminación. Están localizados principalmente en la fovea donde la densidad celular alcanza los 200 000 conos/ mm^2 , unas cien veces la densidad celular de la periferia de la retina. Los conos, a diferencia de los bastones, tienen varios tipos de pigmentos visuales (también denominados opsinas) que varían según el subtipo de cono. En la retina humana se han identificado tres clases de conos: (i) los azules, (ii) los verdes y (iii) los rojos. Así pues, los conos son menos fotosensibles que los bastones y su respuesta a la luz es más breve en el tiempo.²

En cuanto a la estructura celular de los conos y los bastones, son células polarizadas compuestas por (figura I.1, detalle):

- Un **segmento externo** donde se capturan los fotones de luz y se activa la cascada de fototransducción. En los bastones, el segmento externo es cilíndrico y en los conos dicho segmento es más corto (la mitad del de los bastones) con un diámetro mayor en la base que les confiere un aspecto cónico. Los segmentos externos contienen discos con rodopsina empaquetada en su membrana, así como otras proteínas integrales de membrana que forman parte del ciclo visual. Tanto la rodopsina como el resto de proteínas del ciclo visual son necesarias para la formación y el mantenimiento de la integridad de los segmentos externos.
- Un **segmento interno** que se encuentra unido al extremo proximal del segmento externo mediante el cilio de conexión. En su región proximal (o región mioide) contiene el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático, indispensables para la síntesis de proteínas. En su región distal (o región elipsoide) contiene las mitocondrias como maquinaria metabólica. Los conos tienen un segmento interno más grande que los bastones, posiblemente por su gasto metabólico más alto. En los bastones, desde esta región celular se sintetiza y transporta la rodopsina hacia el segmento externo (se estima que hasta 2 000 moléculas son transportadas por minuto).
- El **cilio de conexión**, una estructura no móvil que conecta el segmento interno y el externo de la célula fotorreceptora.²
- El **núcleo**, que, en el caso de la disposición de los conos en la retina, sus núcleos forman una hilera cerca de la membrana limitante externa. Dicha disposición no se observa con los núcleos de los bastones.
- Una **terminal sináptica**, cuya estructura es única dentro del sistema nervioso. En los bastones esta terminal sináptica es llamada esférula y en los conos pedículo. El neurotransmisor de estas terminales sinápticas es el glutamato. Así se establece la sinapsis química con las neuronas retinianas de segundo orden (células bipolares y horizontales). De esta forma es como un fotorreceptor transduce la luz y transmite la señal lumínica a los circuitos neuronales retinianos a través del núcleo geniculado lateral para que dicha señal sea conducida hasta la corteza visual primaria localizada en el lóbulo occipital cerebral.²

I.1.1.3 Ciclo visual del retinol

El ciclo visual consiste en un proceso de fotólisis y la subsecuente regeneración del pigmento visual. La cascada de fototransducción se inicia cuando los compuestos visuales (rodopsina, en los bastones y opsinas, en los conos) absorben la energía lumínica que proviene del ambiente.

La proteína visual más estudiada es la rodopsina, formada por una opsinina transmembrana y el cromóforo retinal (aldehído de la vitamina A). Una vez la rodopsina absorbe los fotones, se produce una isomerización del cromóforo retinal: el 11-*cis*-retinal (configuración inestable) cambia a todo-*trans*-retinal (configuración más estable), hecho que activa una cascada de reacciones químicas que conducen a la generación de una señal eléctrica que se transmite hacia el cerebro y se interpreta como visión.⁹

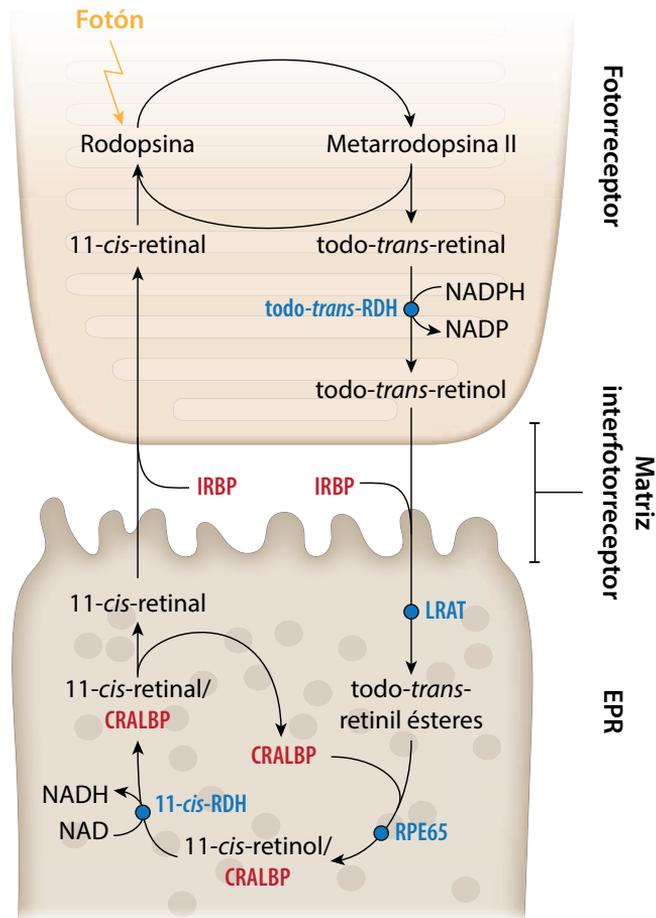


Figura I.3. El ciclo visual sucede en la célula del EPR (abajo), en los fotorreceptores (arriba) y en la matriz interfotorreceptor. Ver texto para la descripción del ciclo visual en el fotorreceptor bastón. EPR: epitelio pigmentario de la retina. CRALBP: del inglés *cellular retinylaldehyde-binding protein*. RDH: retinoideshidrogenasa. LRAT: lecitin-retinol acetiltransferasa. IRBP: del inglés *interphotoreceptor-binding protein*. RPE65: del inglés *Retinal pigment epithelium-specific 65*. Adaptado de [9].

El todo-*trans*-retinal acumulado es reducido a todo-*trans*-retinol por una deshidrogenasa NADPH dependiente y luego es transportado hacia la matriz extracelular, donde se une a una glicoproteína secretada por los fotorreceptores, la IRBP (del inglés *interphotoreceptor-binding protein*), para facilitar su entrada al EPR. Se ha observado que la falta de la proteína IRBP en ratones *knockout* lleva a una degeneración de los fotorreceptores.¹⁰

Una vez dentro del EPR, el todo-*trans*-retinol es esterificado para formar *trans*-retinil-éster que puede ser almacenado. Cuando es necesario, el todo-*trans*-retinil-éster es hidrolizado e isomerizado por la acción de la proteína RPE65 isomerasa para formar el 11-*cis*-retinol. Posteriormente se produce la oxidación del 11-*cis*-retinol a 11-*cis*-retinal por una deshidrogenasa NADH dependiente. Estas reacciones son catalizadas por una proteína expresada por las células de Müller, la CRALBP (del inglés *cellular retinylaldehyde-binding protein*) que puede acelerar dos a tres veces el proceso.¹¹

Finalmente, el 11-*cis*-retinal retorna al fotorreceptor a través del transportador proteico IRBP. De esta forma, la molécula de retinal se encuentra de nuevo disponible en el fotorreceptor para iniciar otro ciclo de fototransducción⁵ (figura I.3).

En conclusión, el EPR es el tejido que sirve de soporte a los fotorreceptores. El elevado metabolismo de estos dos tipos celulares (EPR y fotorreceptores) da como resultado final la conversión de la luz en electricidad para ser transmitida y traducida hasta el cerebro en forme de información visual. Dada la importancia del EPR y de los fotorreceptores, en los últimos años estos dos tipos celulares han sido el blanco de investigación en el campo de la medicina regenerativa, más aún, estando bien definidas las enfermedades retinianas que los comprometen directamente y que conllevan a una pérdida de la función visual.

Las primeras enfermedades que han sido foco de las primeras terapias regenerativas son la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), la enfermedad de Stargardt y la retinosis pigmentaria, esta última objeto de estudio del presente trabajo.

I.2

Introducción

Retinosis pigmentaria

Dos de las enfermedades retinianas que más se podrían llegar a beneficiar de la terapia celular son la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) y la retinosis pigmentaria (RP).

La retinosis pigmentaria (RP), explica la mitad de los casos de distrofias hereditarias de la retina y afecta a más de un millón de personas todo el mundo.¹² La fisiopatología de la RP implica alteraciones en los procesos de fototransducción y provoca la apoptosis celular. Es justo en dichas alteraciones a nivel celular donde la terapia celular está jugando un papel importante y esperanzador. Esta tesis se centra en el desarrollo de diversas opciones de tratamiento para la RP basadas en el uso de células madre como agente terapéutico.

La retinosis pigmentaria es una distrofia retiniana hereditaria que engloba un espectro diverso a nivel genético y clínico.¹² La RP se caracteriza por una degeneración de la neuroretina que secundariamente altera otras células y capas retinianas causando un deterioro progresivo de la función visual.

En los primeros estadios de la patología, los pacientes afectados de RP padecen ceguera nocturna y dificultades de adaptación a la oscuridad debido a la muerte inicial de los bastones. Debido a la localización de los bastones en la retina periférica, el campo de visión se constriñe progresivamente en los pacientes con RP, originándose la denominada visión en túnel (figura I.4). En estadios más avanzados de la enfermedad, los conos también se ven afectados, lo que ocasiona problemas en la agudeza visual y constriñe cada vez más el campo de visión hasta provocar en algunos casos la ceguera total.^{13,14}

Figura I.4. Visión en túnel de un paciente con retinosis pigmentaria. En la fotografía de la izquierda el campo visual se encuentra conservado mientras que en la fotografía de la derecha se representa la constricción periférica del campo visual típica de los pacientes con RP que provoca la visión en túnel.



Los rasgos clínicos característicos de la RP incluyen la aparición de depósitos pigmentarios en forma de espículas en la retina periférica, adelgazamiento de los vasos sanguíneos y palidez del disco óptico. Además, los pacientes de RP muestran respuestas eléctricas menores en los análisis electroretinográficos, con menores amplitudes de onda y retraso en las respuestas al estímulo lumínico, así como un aumento de la autofluorescencia debido a las altas concentraciones de lipofuscina en las células del EPR.^{15,16}

A pesar del aumento constante de información referente a su etiopatogenia, aún no se cuenta con la comprensión completa de los mecanismos moleculares que causan esta enfermedad. Por ello, los esfuerzos para continuar su estudio y desarrollar nuevos tratamientos siguen siendo incesantes y motivan a los científicos en diferentes áreas de investigación.

I.2.1 Epidemiología

La RP es la distrofia retiniana más frecuente con una prevalencia que se estima de un paciente afecto por cada 4 000-5 000 personas sanas. La RP presenta una gran variabilidad según el país y la región estudiada que puede aumentar entre etnias según su grado de consanguinidad. Su presentación más frecuente es de forma aislada (85-90 % de los casos) aunque también existe su forma sindrómica (10-15 % de los casos, donde el síndrome de Usher constituye hasta el 12 % de todos los casos de RP.¹⁷

El patrón de herencia clásica de la retinosis pigmentaria puede ser autosómica dominante, autosómica recesiva y ligada a X, pero se

han reportado también patrones digénicos, mitocondriales y mutaciones esporádicas.

En particular en España se estima una afectación alrededor de 1 por cada 3 000-7 000 personas, siendo la forma autosómica dominante la que explica el 12-14,4 % de los casos, la autosómica recesiva el 31,8-39 % y la ligada al cromosoma X el 1,5-4 %. Hasta un 52,3 % de los casos se clasifican como esporádicos o cuyo patrón hereditario no puede identificarse.^{18,19}

I.2.2 Genes implicados en los diferentes patrones de herencia de la RP

Gracias a los avances en el estudio del genoma humano, las distrofias retinianas han podido ser estudiadas en profundidad a nivel genético. Según el tipo de RP y la tecnología de genotipado utilizada, es posible identificar mutaciones en el 30-70 % de los casos.²⁰ La retinosis pigmentaria presenta una gran heterogeneidad genética (diferentes genes pueden causar la misma enfermedad/fenotipo), alélica (distintas mutaciones en cada gen pueden producir variaciones en las manifestaciones clínicas o incluso cuadros clínicos diferentes), fenotípica (diferentes mutaciones en el mismo gen puede causar diferentes enfermedades) y clínica (la misma mutación en individuos diferentes puede manifestarse clínicamente diferente aun compartiendo grado de consanguinidad).²¹ Este escenario genético tan heterogéneo induce frecuentemente confusiones y errores en el diagnóstico de los diferentes tipos de retinosis pigmentaria.

I.2.2.1 RP autosómica dominante

Dentro del amplio grupo de mutaciones asociadas a la RP se destacan las mutaciones en el gen de la rodopsina (*RHO*), el fotopigmento fundamental del ciclo visual. Para este gen se han identificado hasta 120 mutaciones que se estiman responsables de hasta un 25 % de los casos de RP autosómicas dominantes (RPad).²² Otros genes mutados en la RPad son el gen de la periferina²³ y *NRL*, que codifica para un factor de transcripción específico retiniano que interactúa con el factor de transcripción homeobox de los conos y bastones (*CRX*) para promover y regular la transcripción de LA rodopsina y otros genes retinianos.²⁴

I.2.2.2 RP autosómica recesiva

Algunos de los genes afectados en la RP con transmisión autosómica recesiva (RPar) son el gen de la fosfodiesterasa, CRALBP y MERTK. La proteína fosfodiesterasa GMP cíclico (PDE, del inglés *phosphodiesterase*) está implicada en la cascada de fototransducción.²⁵ Por otro lado, CRALBP (del inglés *cellular retinaldehyde-binding protein*) se une al 11-*cis*-retinol y promueve su oxidación a 11-*cis*-retinaldehído en el EPR.¹¹ Las mutaciones en el gen que codifica para el receptor de la tirosina quinasa (*MERTK*, del inglés *MER proto-oncogene, tyrosine kinase*) han sido ampliamente estudiadas en el modelo de rata Royal College of Surgeons (RCS). Este modelo múrido se caracteriza por un defecto en la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores por parte del EPR lo que conduce a una degeneración retiniana temprana.²⁶ Existen estudios con pacientes afectados por la forma autosómica recesiva de la RP con hasta 6 mutaciones diferentes del gen ortólogo humano *MERTK*.²⁷

I.2.2.3 Genes implicados en la RP ligada a X

La gran mayoría de casos de RP ligada a X se explican por mutaciones en dos genes: *RPGR* y *RP2*. El gen *RPGR* (del inglés *Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator*) codifica para una proteína del aparato de Golgi de los segmentos externos de los bastones que es esencial para su viabilidad.²⁸ El gen *RP2* que codifica para una proteína homóloga al cofactor C humano implicado en el último paso del plegamiento de la β -tubulina. Su acción como proteína chaperona influye directamente en la estructura y función de los cilios de los fotorreceptores.²⁹

I.2.2.4 RP de herencia digénica

Los pocos casos identificados en la RP de herencia digénica se caracterizan por presentar simultáneamente dos mutaciones genéticas diferentes. Por ejemplo, se han identificado mutaciones puntuales de *periferina/rds*, asociadas con mutaciones en *ROM-1*, en cuyos casos los heterocigotos para ambos genes expresan un fenotipo severo.³⁰

I.2.3 Vías bioquímicas afectadas en la RP

Cada gen implicado en la patogénesis de la RP codifica normalmente para una proteína específica que ejerce una función determinada para mantener adecuadamente los diferentes procesos bioquímicos y metabólicos de la retina que preservan su funcionalidad. La alteración de dichos procesos precipita a una vía común de muerte celular que finalmente conduce a la degeneración retiniana.

Las principales vías afectadas son el metabolismo de la vitamina A, la estructura del citoesqueleto, la señalización-interacción intercelular o sináptica, los factores de *splicing*, la alteración del tráfico intracelular. La alteración de estas vías interfiere en la cascada de fototransducción desencadenando finalmente la apoptosis celular.²

I.3

Introducción

Opciones terapéuticas en la retinosis pigmentaria

Los abordajes terapéuticos se concentran en tratar de enlentecer dicha degeneración, tratar las complicaciones que puedan presentarse durante la evolución de la enfermedad, ayudar al paciente a adaptarse social y funcionalmente a su baja visión o ceguera para mejorar su calidad de vida a través de una correcta refracción y ayudas visuales, y brindarle un soporte psicológico tanto a cada individuo afectado como a su familia.

Dentro de las ayudas de baja visión se encuentran las lupas, los microscopios, los telescopios, los telemicroscopios y los sistemas electrónicos, así como el llamado ojo biónico o “implante retiniano” como lo es el Argus II (The Argus® II Retinal Prosthesis System), que provee una estimulación eléctrica a la retina induciendo una mejora de la percepción visual.³¹

El otro grupo es el de las ayudas no ópticas que permiten realizar las actividades diarias y de ocio más cómodamente para el paciente, incluyen posturas ergonómicas, mejorar condiciones de iluminación según la zona donde desempeñe la actividad, mejorar el contraste con rotuladores o papeles de colores, usar macrotipos, etc.

Los suplementos nutricionales orales como la vitamina A, E, y el ácido docosahexaenoico (DHA) también se recomiendan en estos pacientes, basándose en la fisiopatología de la retinosis pigmentaria, donde el metabolismo de la vitamina A, E³² y ciertos ácidos grasos³³ pueden verse comprometidos.

Otras estrategias que buscan tratar más directamente el proceso fisiopatológico de la retinosis pigmentaria son la terapia génica, con una patente ya aprobada para uso en humanos, y la terapia celular, aún en experimentación.

I.3.1 Terapia génica

La terapia génica es una técnica que consiste en el uso de genes para reparar un tejido determinado. Parte de la base de que una de las causas de enfermedad es la alteración o mutación de un gen que induce la producción defectuosa o la falta de producción de una proteína fundamental para el adecuado funcionamiento de un determinado proceso celular.³⁴

De esta forma, dentro de los objetivos de la terapia génica se encuentran:

- El reemplazo génico, que consiste en reemplazar el gen causante de enfermedad por su copia correcta (sin mutación).
- El llamado “*knocking out*”, donde se inactiva el gen mutado que funciona de forma inadecuada.

Estos dos procesos requieren el conocimiento del gen implicado, por lo que su aplicación se restringe a enfermedades de las que se conoce el gen causante, como por ejemplo algunas enfermedades monogénicas.

Otra finalidad de la terapia génica se encuentra en las enfermedades que no son dependientes de un único gen y son³⁵:

- La neuroprotección; por ejemplo, con la sobreexpresión de factores neurotróficos que promuevan el rescate celular.
- La optogenética; por ejemplo, con la sobreexpresión de proteínas sensibles a estímulos lumínicos.

La terapia génica incorpora una copia correcta del gen mutado. En la mayoría de los casos la incorporación de dicha copia correcta se realiza a través de vectores virales dentro de las células afectadas.³⁶ No obstante, también se están desarrollando formas alternativas de introducción y expresión de los genes correctos en las células afectadas, sin que sea necesario recurrir a los virus como “método de infección”, como por ejemplo mediante el uso de vesículas lipídicas³⁷ o de nanopartículas.³⁸

I.3.1.1 Terapia génica en enfermedades oculares

A nivel ocular, la terapia génica se puede dirigir a poblaciones celulares específicas según la vía de administración, por ejemplo, limitando la penetración de la inyección intravítrea si se quiere actuar en la capa de células ganglionares, o accediendo al espacio

subretiniano para actuar en las células del EPR, o administrando la terapia en cámara anterior para actuar en las células corneales.

Dentro de los métodos utilizados para la transfección génica, actualmente los vectores víricos adenoasociados (VAA) recombinantes son los más utilizados como sistemas de liberación de terapia génica ocular por su habilidad para transducir varios tipos de células retinianas (fotorreceptores, células del EPR, células ganglionares y de Müller) eficientemente *in vivo* probablemente debido a su tamaño relativamente más pequeño en comparación con otros vectores virales.³⁹ No se integran dentro del genoma humano así que permanecen como episomas circulares extragenómicos y de esta forma se disminuye el riesgo de oncogénesis insercional. La potencial respuesta inmune que pueden inducir es mínima y estaría condicionada sobretodo por las proteínas de su cápside lo que puede limitar su uso en ciertos casos. Otro grupo de vectores utilizados en terapia génica ocular son los adenovirus y los lentivirus.³⁶

Los principales inconvenientes asociados a la terapia génica radican en el tamaño limitado del gen que se desea transfectar a las células diana y en su expresión apropiada en dichas células sin que se obtengan efectos adversos.³⁹

Actualmente hay 31 ensayos clínicos abiertos de terapia génica en enfermedades oculares, de los cuales 8 están relacionados con la retinosis pigmentaria.^{35,40} Hasta la fecha la única distrofia retiniana que dispone de un tratamiento aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) es la distrofia retiniana asociada a la mutación bialélica del gen *RPE65*. Dicho tratamiento se basa en la terapia génica que utiliza vectores víricos adenoasociados (voretigene neparvovec-rzyl, Luxturna™). Un ensayo clínico de fase III ha demostrado mejorar la función visual de los pacientes afectados mediante esta terapia,⁴¹ pero no se ha establecido aún que sea curativa y uno de sus principales limitantes es su elevado coste.⁴²

1.3.2 Terapia celular

Las células madre (CM) son una subpoblación celular indiferenciada definida por su capacidad de (i) autorrenovación (producir copias de ellas mismas) y (ii) diferenciación a un linaje celular más especializado.

Esto permite, por ejemplo, regenerar el tejido después de una lesión.⁴³ Las células madre se encuentran normalmente “protegidas” en las capas más basales de los tejidos.

Las células madre pueden clasificarse según su capacidad regenerativa en:

- **Pluripotentes:** pueden generar cualquier tipo celular del cuerpo humano ya sean células de linaje ectodérmico, mesodérmico o endodérmico; excepto células de la placenta y del cordón umbilical, ya que estas últimas se tratan de células de origen extraembrionario.
- **Multipotentes:** pueden generar algunos tipos de células diferentes, generalmente de un tejido u órgano específico.

Existen diversas clases de células madre en el cuerpo humano localizadas en diferentes tejidos y originadas a lo largo de nuestra vida. Según su capacidad de diferenciación, las CM se clasifican en ⁴⁴:

- **Embrionarias:** (ESC, del inglés *embryonic stem cells*) se obtienen a partir de la masa celular interna del blastocisto. Son células pluripotentes, es decir, capaces de generar cualquier tipo de célula del cuerpo, salvo placenta y cordón umbilical.
- **Adultas o específicas de tejido:** son células que se forman durante el desarrollo fetal y perduran en el cuerpo toda la vida. Son multipotentes, o sea que generan tipos celulares específicos según el tejido donde se encuentran. Han sido caracterizadas en la mayoría de órganos importantes, incluyendo el ojo.

1.3.2.1 Células madre en el ojo

El ojo tiene células madre distribuidas en prácticamente todas sus estructuras. A nivel conjuntival se distribuyen uniformemente por toda la conjuntiva bulbar y el fondo de saco conjuntival, repueblan la conjuntiva palpebral diferenciándose en queratinocitos y en células caliciformes. ⁴⁵

En el limbo corneoescleral (zona de transición de los tejidos de la córnea y la esclerótica) las células madre se localizan basalmente en las palizadas de Vogt, una estructura papilar que actúa como órgano generador de células epiteliales corneales. ⁴⁶

También se encuentran las células madre corneales estromales, aún en estudio. Por otra parte, en el epitelio pigmentario del iris, el cuerpo ciliar y coroides se han identificado y aislado células epiteliales con potencial proliferativo hacia líneas neuronales-retinianas. A nivel mesenquimal también se han identificado células madre en la malla trabecular, esclerótica y órbita (adipocitos), así como en el cristalino (figura I.5). ⁴⁷

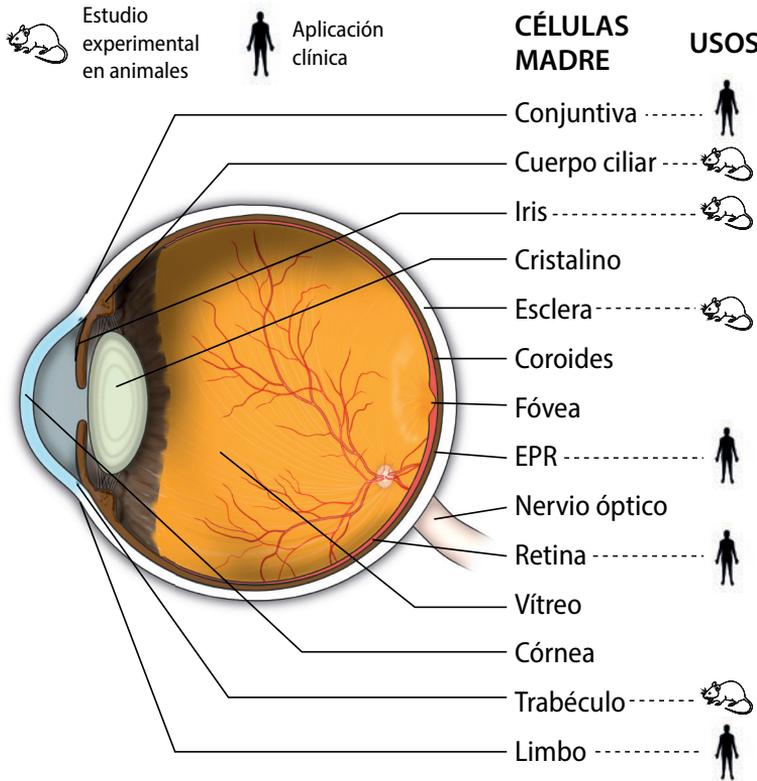


Figura I.5. Células madre en el ojo y sus aplicaciones. Adaptado de [47].

Las células madre límbicas han sido unas de las más estudiadas. Actualmente son las únicas células con aplicaciones clínicas en pacientes para reconstruir la superficie ocular con buenos resultados.^{48,49}

En los últimos años el foco de atención se ha centrado en el estudio preclínico y clínico de terapias con células madre derivadas del epitelio pigmentario de la retina y de fotorreceptores para tratar pacientes con distrofias o degeneraciones retinianas.⁴⁷ También se ha podido demostrar que las células adultas del EPR humano pueden ser transformadas *in vitro* en CM multipotentes y generar células mesenquimales o neurales. Estos hallazgos sustentan que las CM multipotentes del EPR pueden ser útiles para el estudio de modelos de enfermedad y terapias de reemplazo celular.⁵⁰

I.3.2.2 Historia de las células madre

Las CM embrionarias fueron obtenidas inicialmente de los blastocistos originados por fertilización *in vitro*.⁵¹ Antes eran consideradas la fuente principal en la que se basaba la medicina regenerativa por su capacidad de proliferación ilimitada y diferenciación en células

somáticas, pero los problemas éticos derivados de su uso y las reacciones inmunes de rechazo limitaron su aplicación clínica.

El desarrollo de las células madre pluripotentes inducidas revolucionó la biología celular y la medicina regenerativa ya que son células madre derivadas directamente de células somáticas adultas reprogramadas. En 2006 esto fue posible gracias al uso de ciertos factores de transducción (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc), lo que permitió reprogramar el ADN de células somáticas a “células madre” llamadas pluripotentes inducidas (iPSC).⁵²

Las características de estas células permiten desarrollar enfoques terapéuticos “personalizados” ya que las propias células del paciente pueden obtenerse mediante la extracción de una muestra de sangre o una biopsia de piel, por ejemplo, y ser reprogramadas a iPSC en el laboratorio. A su vez, estas iPSC pueden diferenciarse *in vitro* al tipo celular de interés según la enfermedad que se persiga tratar. Estas células pueden ser trasplantadas de nuevo en el paciente sin que ello suponga ningún problema ético ni de rechazo inmunológico.⁵³

1.3.2.3 Campo de aplicación terapéutica de la terapia celular en distrofias retinianas

El ojo es un órgano que ofrece ventajas especialmente atractivas para la terapia celular ya que su estructura y accesibilidad a la retina permite la administración de la terapia mediante técnicas muy poco invasivas si se compara con otros órganos internos.

El ojo sano está aislado inmunológicamente gracias a la barrera hematorretiniana. Esta barrera confiere protección a sus tejidos y células trasplantadas constituyendo un privilegio inmune frente a otros órganos.⁵ Asimismo, se trata de un órgano que permite una evaluación y monitorización de los efectos terapéuticos no invasiva en muchos casos.⁵⁴ Con métodos objetivos se puede evaluar la eficacia terapéutica mediante la visualización directa del trasplante después de ser realizado, o con electrorretinografía o tomografía de coherencia óptica. Subjetivamente, se puede evaluar mediante la percepción del paciente.

Además, el ojo contralateral cumple las condiciones de un control ideal en los experimentos. Aunque el sentido de la vista es fundamental para nuestra vida, el ojo no es un órgano vital, lo que permite una caracterización completa durante la vida del injerto aún si el órgano que lo contiene sigue fallando.

El primer ensayo clínico experimental que usó iPSC humanas fue realizado en 2014 en Japón y se utilizaron células de EPR derivadas de iPSC para tratar la DMAE exudativa, demostrando mejoría en la agudeza visual del primer paciente trasplantado. Desafortunadamente se suspendió el ensayo debido a la identificación de mutaciones genéticas en las iPSC del segundo paciente.⁵⁵ También se han realizado ensayos clínicos de fase I/II con células de EPR derivadas de ESC humanas en enfermedad de Stargardt y DMAE seca, donde se ha podido evidenciar el no empeoramiento de la agudeza visual y en algunos pacientes hasta mejoría visual hasta un año después del trasplante.⁵⁶

I.4

Introducción

Modelos animales para la investigación de enfermedades retinianas

Existen diversos modelos animales no modificados genéticamente para el estudio de las enfermedades retinianas en los que se han hallado mutaciones similares a las humanas y en los que se pueden apreciar fenotipos parecidos de pérdida visual.⁵⁷

Estudios iniciales con la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) y sus mutantes, permitieron entender las vías normales del ciclo visual, así como identificar inicialmente los genes responsables de distrofias retinianas en el humano. El pollo también ha servido para estudiar las similitudes en los conos y los bastones de su retina con la del humano. Los arquetipos de distrofias retinianas en mamíferos han sido ampliamente estudiados, siendo el ratón *rodless* (Keeler, 1924), la rata RCS (Bourne, Campbell & Tansley, 1938; Dowling & Sidman, 1962) y el modelo de ratón *rd*s (*retinal degeneration slow*) los mejor caracterizados. También se han identificado modelos no modificados genéticamente de distrofias retinianas hereditarias en perros y gatos.⁵⁸

Debido a que la cantidad y variedad de modelos animales no modificados genéticamente es limitada, grandes avances en bioingeniería se han llevado a cabo en las últimas décadas para generar modelos animales que mimeticen las enfermedades humanas (por ejemplo, animales *knockout*, transgénicos, etc.). Gracias a la creación de estos modelos modificados genéticamente se han podido desarrollar formas de enfermedad no presentes en los modelos animales no modificados genéticamente como por ejemplo, formas dominantes o ligadas a X de retinosis pigmentaria, o modelos de DMAE o enfermedad de Stargardt.⁵⁹

I.4.1 Modelo de rata del Royal College of Surgeons (RCS)

La rata RCS es un modelo animal de la retinosis pigmentaria autosómica recesiva estudiada inicialmente en 1938 por Bourne, Campbell y Tansley.⁶⁰ Esta cepa fue desarrollada en 1962 por Richard Sidman y John Dowling del stock de Arnold Sorsby del Colegio Real de Cirujanos de Londres, de ahí su denominación.⁶¹ Posteriormente hacia 1975, LaVail, Sidman y Gerhardt establecieron cepas congénitas.

El defecto genético que caracteriza esta rata inhabilita la fagocitosis por parte de las células EPR de los segmentos externos de los bastones, proceso circadiano vital para la renovación de los fotorreceptores. El EPR puede captar, pero es incapaz de digerir la membrana del disco del segmento externo.⁵⁸ En el año 2000, Da Cruz *et al.*,²⁶ identificó el locus de la mutación *rdy* (*retinal dystrophy*) consecuencia de una deleción en el receptor tirosina quinasa MERTK, que produce acumulación de detritus celulares, degeneración de bastones seguida de la degeneración de conos, típica de la RP recesiva.

Desde los años 80 se han llevado a cabo trasplantes experimentales de EPR en la rata RCS en los cuales se ha podido evidenciar la preservación del grosor de la capa nuclear externa, plexiforme externa y de los segmentos internos y externos de los fotorreceptores;⁶² así como también la reducción de la zona de detritus de los segmentos externos y el incremento del número de fagosomas en las células de EPR trasplantadas.^{62,63}

Todas estas modificaciones histológicas favorecen el rescate de los fotorreceptores, que se ha demostrado gracias a la observación de una tasa normal de regeneración de segmentos externos⁶⁴ y expresión de componentes necesarios para la fototransducción.⁶⁵ La documentación del rescate de fotorreceptores generado por el trasplante de células de EPR en la rata RCS ha sido motivadora, a pesar de los resultados dispares del análisis electrorretinográfico según los diferentes autores.^{66,67}

Justificación

La retinosis pigmentaria (RP) es la distrofia retiniana hereditaria más frecuente que afecta a más de un millón de personas en todo el mundo. La RP implica la degeneración irreversible de fotorreceptores, lo que lleva a una enfermedad progresiva caracterizada por ceguera nocturna, constricción concéntrica del campo visual y disminución de la amplitud del electroretinograma. La mayoría de los pacientes inician los síntomas en la adolescencia o en la adultez temprana. A medida que la afectación progresa, los pacientes desarrollan visión en túnel hasta pérdida de la visión central, usualmente hacia la séptima década de la vida. La enfermedad se puede heredar en patrón mendeliano o de forma sindrómica.

La pérdida de fotorreceptores es precedida por alteraciones en el epitelio pigmentario de la retina (EPR) y en la glía de la retina. El EPR forma la barrera hematorretiniana externa y tiene un papel primordial en el ciclo visual y en la supervivencia de los fotorreceptores gracias a la absorción y transporte de nutrientes de la sangre hacia los fotorreceptores y mantiene la excitabilidad de los mismos. De igual forma, el EPR secreta factores de crecimiento e inmunosupresores, lo que confiere al ojo su privilegio inmunológico.

Algunos abordajes terapéuticos en la RP incluyen factores neuroprotectores, agentes antiapoptóticos, suplementación dietética y terapia génica. Sin embargo, la mayoría de estos tratamientos son sólo efectivos previniendo o enlenteciendo la progresión de la degeneración y son menos efectivos en casos de enfermedad avanzada; o bien pueden ser aplicables en un número muy limitado de pacientes, como es el caso de la terapia génica aprobada para RP. Una vez los fotorreceptores están afectados, las únicas opciones

disponibles son el reemplazo celular o los dispositivos protésicos. Bajo esta perspectiva, la terapia basada en células madre es una alternativa potencial a desarrollar.

La terapia experimental con células madre descubierta a finales de los años 90 con las células madre embrionarias abrió un nuevo capítulo en la medicina regenerativa. Posteriormente en 2006, la aparición de las células madre pluripotentes inducidas revolucionó la biología celular. La reprogramación de células somáticas a cualquier tipo celular —incluyendo fotorreceptores y células EPR— provee un número ilimitado de células autólogas disponibles y evita los inconvenientes éticos y de rechazo inmunológico que presentaban las células madre embrionarias. Desde entonces numerosos estudios se están llevando a cabo en diversos campos de la medicina.

El modelo de rata del Royal College of Surgeons presenta un fenotipo derivado de la mutación del gen *MERTK* que produce una fagocitosis deficiente de los segmentos externos de los fotorreceptores, acumulación de detritus en el espacio subretiniano y apoptosis de los fotorreceptores. Las alteraciones retinianas se inician hacia el día 20 posnatal y se desarrollan rápidamente. La atrofia del EPR desencadena la degeneración de los fotorreceptores. Hacia el día 60 posnatal muy pocos núcleos de fotorreceptores pueden ser identificados en la capa nuclear externa.

Diversos reportes en la literatura evidencian el rescate de fotorreceptores y una mejor preservación retiniana gracias al trasplante de EPR derivado de células madre en las ratas RCS. Otros trabajos también han demostrado la efectividad del trasplante de fotorreceptores en otros modelos murinos. Hasta el momento no se han publicados trabajos que contemplen el trasplante combinado de células de EPR y células precursoras de fotorreceptores (CPF) como terapia para la degeneración retiniana.

El trasplante celular combinado de EPR y CPF como terapia para la degeneración retiniana que presenta nuestro modelo animal podría también servir como modelo para el tratamiento de individuos con retinosis pigmentaria, así como de otras enfermedades en las cuales existe una disfunción del EPR como el es caso de la degeneración macular asociada a la edad.

Hipótesis

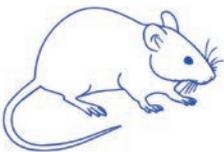
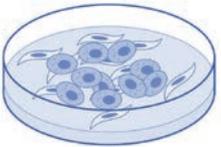
Uno de los mecanismos fisiopatológicos a nivel celular que tiene lugar en la retinosis pigmentaria es el fallo en la fagocitosis de las células del epitelio pigmentario de la retina, lo que conlleva a la degeneración de los fotorreceptores y a la subsecuente pérdida de función visual. Dicho mecanismo es el causante de la degeneración retiniana que presentan las ratas RCS, un modelo animal de retinosis pigmentaria. Teniendo en cuenta esta premisa, las hipótesis de trabajo son:

- El estudio comparativo de los efectos de células EPR diferenciadas a partir de dos fuentes de células madre humanas pluripotentes distintas (embrionarias y pluripotentes inducidas) podría proporcionar evidencias preclínicas sobre cuál fuente de células madre podría ser más beneficiosa en el tratamiento de distrofias de retina.
- La terapia combinada con células de EPR y células precursoras de fotorreceptores proporcionará la implantación de nuevos fotorreceptores y EPR con el fin de enlentecer la degeneración retiniana en el modelo de rata RCS y mejorar la función visual en mayor medida que la terapia única con EPR o que el grupo control.

Objetivos

- 1) Diferenciar y caracterizar células madre humanas embrionarias (hESC) y pluripotentes inducidas (hiPSC) a células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) y a células precursoras de fotorreceptores (CPF).
- 2) Trasplantar las células diferenciadas en la retina del modelo de rata RCS utilizando por un lado únicamente células diferenciadas a EPR, y por el otro, combinando células diferenciadas a EPR y a CPF.
- 3) Evaluar la integración y supervivencia del trasplante celular.
- 4) Valorar la seguridad del trasplante celular en cuanto a la posible formación de tumores.
- 5) Evaluar los efectos morfológicos y funcionales de la terapia celular única con EPR en el modelo animal de rata RCS.
- 6) Evaluar los efectos morfológicos y funcionales de la terapia celular combinada con EPR y CPF en el modelo animal de rata RCS.
- 7) Comparar los resultados de las dos aproximaciones terapéuticas entre sí.

Materiales y métodos



M.1

Materiales y métodos

Cultivo celular y diferenciación de células de EPR a partir de células madre humanas

Las dos líneas de células madre humanas (hPSC) elegidas para obtener células de EPR (la línea embrionaria ES4 y la línea pluripotente inducida CBiPSC30-4F-5 se diferenciaron siguiendo el protocolo de Idelson *et al.*,⁶⁸ con algunas modificaciones menores detalladas a continuación.

Las células fueron cultivadas en discos de matrigel de 10 cm con medio de mantenimiento mTeSR™ (Cat. No. 05850, StemCell Technologies) a 37 °C y 5 % (v/v) CO₂. El medio fue cambiado diariamente hasta que las células adquirieron una adecuada confluencia (75 % aproximadamente) para ser transferidas. Posteriormente a la expansión, las células fueron incubadas durante tres minutos con 0,5 mM de ácido etilendiamintetracético (EDTA) a temperatura ambiente (Cat. No. AM9260G, Life Technologies) y luego lavadas con medio fresco para obtener pequeñas agrupaciones celulares que posteriormente fueron sembradas en discos de matrigel. Una vez las células madre alcanzaron un 50 % de confluencia, el medio de mantenimiento mTeSR™ fue reemplazado por medio de diferenciación de EPR que contenía DMEM (del inglés *Dulbecco's modified eagle medium*) F12 (Cat. No. 21331-046, Gibco) suplementado con 5 % (v/v) KOSR (Cat. No. 10828-028, Gibco), 1 % (v/v) N2 (Cat. No. 17502048, Life Technologies), 2 % (v/v) B27 (Cat. No. 17504044, Life Technologies), dexametasona 0,1 μM (Cat. No. D4902-25MG, Sigma-Aldrich), 10 mM β-glicerol fosfato (Cat. No. 50020-100G, Sigma-Aldrich), 20 ng/ml de IGF-1 (del inglés *insulin-like growth factor-1*) humano (Cat. No. I3769-50G, Sigma-Aldrich) y 10 mM de nicotinamida (Cat. No. N0636-100g,

Sigma-Aldrich). El cambio de medio de las células se efectuó cada dos a tres días.

Tras 6-8 semanas de permanecer en el medio de diferenciación de EPR, aparecieron zonas pigmentadas que fueron expandidas para permitir su aislamiento manual del cultivo heterogéneo. Dichas áreas fueron aisladas y tripsinizadas con 0,25 % (v/v) de tripsina (Cat. No.25200-056, Gibco) para obtener una suspensión de células disgregadas. Las presuntas células de EPR derivadas de hPSC purificadas se volvieron a cultivar en seis discos de matrigel fresco y se mantuvieron en medio de diferenciación de EPR durante dos a tres semanas hasta que se logró un cultivo confluyente. Para obtener una población celular homogénea se realizó en el primer pase una breve incubación de dos minutos aproximadamente con tripsina-EDTA al 0,05 % (v/v) seguida de un lavado con solución tampón PBS (del inglés *phosphate buffered saline*) con el objetivo de descartar las células similares a fibroblastos obtenidas durante el proceso de diferenciación de EPR.

Una vez los fibroblastos fueron descartados, las células de EPR derivadas de hPSC que quedaron en el disco se volvieron a tripsinizar (tripsina-EDTA al 0,25 % (v/v), Cat. No. 03-050-1B, Reactiva). Cuando las células de EPR derivadas de hPSC confluyeron, se realizaron rutinariamente 7-8 pases con Tryple select (Cat. No.12563-011, Reactiva). La duración del protocolo fue de 12 semanas (figura R.2).

M.1.1 Inmunocitoquímica de las células de EPR diferenciadas a partir de hPSC

Una vez diferenciadas las células de EPR a partir de hPSC, estas fueron caracterizadas a día 41 de diferenciación mediante inmunocitoquímica para determinar los niveles de expresión de los marcadores de diferenciación retinianos y de EPR. Las células se cultivaron en frascos de poliestireno y se fijaron con paraformaldehído al 4 % (v/v) durante 20 minutos a temperatura ambiente. La inmunodetección se realizó con TBS al 0,2 % (v/v) Triton X-100 para la permeabilización y las muestras fueron bloqueadas usando una solución de suero de cabra al 3 % (v/v), BSA al 1 % (v/v) y Triton X-100 al 0,3 % (v/v) en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios se incubaron a 4°C durante toda la noche y los anticuerpos secundarios fueron incubados a 37°C durante dos horas. Los anticuerpos utilizados se detallan en

Tabla M.1 Lista de anticuerpos empleados en los análisis inmunocitoquímicos del presente estudio

Nombre del anticuerpo	Casa comercial y referencia	Dilución
PAX-6	Covance, PRB278P	1:100
MITF	Santa Cruz Biotechnology, sc-56725	1:25
ZO-1	Milipore, AB2272	1:100
OTX2	Santa Cruz Biotechnology, sc-30659	1:25
Bestrofina-1	Santa Cruz Biotechnology, sc-32792	1:25
CHX10	Abcam, Ab16141	1:100
RPE65	Novus Biologicals, NB100-355	1:100
Anti-IgG conejo-AlexaFluor488	Jackson, 711-545-152	1:200
Anti-IgG ratón-Cy3	Jackson, 715-165-151	1:200
Anti-IgG ratón-AlexaFluor488	Jackson, 715-545-151	1:200
Anti-IgG oveja-Cy3	Jackson, 713-165-147	1:100
Anti-IgG cabra-AlexaFluor647	Jackson, 705-605-147	1:200

la tabla M.1. Se utilizaron células hPSC indiferenciadas como controles negativos. Las muestras fueron montadas en Fluoroshield con DAPI y las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal SPE (Leica Microsystems).

M.1.2 Determinación de la expresión de ARN mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

Se tomaron muestras de las células de EPR derivadas tanto de hESC como de hiPSC para ser tratadas con el reactivo Trizol y el ARN fue aislado usando el kit RNeasy RNA isolation (Qiagen) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. El ARN fue cuantificado mediante el uso de NanoDrop y el ADN complementario (ADNc)

Tabla M.2 Secuencia de los primers utilizados para el análisis con PCRc en tiempo real de las células de EPR derivadas de hPSC

Gen	Secuencias primer 5' → 3'	
	Forward	Reverse
<i>GAPDH</i>	GTCAGTGGTGGACCTGACCT	AGGGGAGATTCAGTGTGGTG
<i>PEDF</i>	AGATCTCAGCTGCAAGATTGCCCA	ATGAATGAACTCGGAGGTGAGGCT
<i>CRALBP</i>	CCTCTCCTCAACTGTCCTG	CCCTCCTTTATTACCCATCCC
<i>DKK-1</i>	ATAGCACCTTGGATGGGTATTCC	CACAGTCTGATGACCGGAGA
<i>MERTK</i>	TTGCAGCATTCAAGTCAAGGAAGC	GGCTTGCAGCTGCTTGATTGGTA
<i>OCT3/4</i>	GTTCTTCATTACTIONAAGGAAGG	CAAGAGCATCATTGAACTTCAC
<i>OTX2</i>	GACCACTTCGGGTATGGACT	TGGACAAGGGATCTGACAGT
<i>PAX6</i>	TCTAATCGAAGGGCCAAATG	TGTGAGGGCTGTGTCTGTTC
<i>RRH</i>	CACCAAACAATGCCTGTGAC	GCCAGAGTGCACAAACAGAA
<i>SIL</i>	GTTGATGGCTGTGGTCCTTG	CAGTGACTGCTGCTATGTGG
<i>TYR</i>	ACTTACTCAGCCCAGCATC	GGTTTCCAGGATTACGCC

fue sintetizado a partir de 1 µg de ARN por muestra usando el kit Cloned AMV First-Strand Synthesis (Invitrogen, Life Technologies). La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (PCRc) en tiempo real se realizó con el super mix de PCRc Platinum SYBR Green (Invitrogen, Life Technologies) con 25 ng de ADNc por reacción. La expresión genética relativa fue ensayada tres veces y se comparó con una muestra de células hPSC indiferenciadas que se emplearon como nivel basal de expresión. Todas las PCRc en tiempo real se realizaron en el termociclador Applied Biosystem 7900 HT Fast qRT-PCR System Thermocycler siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Los marcadores usados para el análisis de la expresión génica fueron *CRALBP*, *DKK-1*, *MERTK*, *MITF*, *OCT3/4*, *OTX2*, *PAX6*, *PEDF*, *RHH*, *RX*, *SIL* y *TYR*. La expresión del gen *GAPDH* se usó para la normalización de los niveles de expresión del resto de genes. Las secuencias de los *primers* se detallan en la tabla M.2.

M.2

Materiales y métodos

Cultivo y diferenciación de células precursoras de fotorreceptores a partir de células madre humanas

El protocolo utilizado para la obtención de células precursoras de fotorreceptores (CPF) a partir de hiPSC se basó en los protocolos descritos por Yanai *et al.*,⁶⁹ y Tucker *et al.*,⁷⁰ con ciertas modificaciones.

Se eligió la línea celular CBiPS-30-4F-5, la cual se cultivó en el medio comercial mTeSR™ en discos de matrigel para conseguir una confluencia del 70 %, generándose posteriormente cuerpos embrionarios en placas de baja adherencia. Estos cuerpos se mantuvieron en un medio de diferenciación a retina que contenía DMEM/F12, KOSR, B27, N2, Noggin, DKK-1 e IGF-1 durante cuatro días. Transcurrido este tiempo, se seleccionaron los cuerpos embrionarios obtenidos mediante filtración con microfiltros de 100 µm. Los cuerpos embrionarios seleccionados se colocaron en cultivo adherente en discos de BD matrigel y se agregó al medio taurina y hormona T3 al día 16 de diferenciación para la inducción de los fotorreceptores. Las células se cultivaron hasta los días 21, 41 o 90 según las necesidades experimentales.

Se realizaron evaluaciones diarias de la morfología celular mediante microscopía óptica durante el proceso de diferenciación.

M.2.1 Inmunocitoquímica y determinación de la expresión de ARN mediante reacción en PCRc en tiempo real de las CPF diferenciados a partir de hPSC

Una vez diferenciados las CPF, se estudió la presencia de los marcadores de diferenciación retinianos mediante técnicas inmunocitoquímicas al día 21, 41 y 90 de diferenciación. Los marcadores determinados fueron NRL (factor de transcripción de fotorreceptores, bastones), CRX (marcador de progenitores de los fotorreceptores), MITF (marcador de EPR), RHODOPSIN (marcador de pigmento presente en fotorreceptores maduros), PAX6 y TUJ1 (marcadores de tejido neural). De igual forma se recogieron muestras celulares para el análisis de la expresión génica mediante PCRc en tiempo real de los marcadores *RHO*, *NRL*, *CRX*, *Recoverin*, *RX*, *PAX6*, *GAPDH*, *CRALBP*, *OCT3/4* y *MITF*.

M.2.2 Generación de fotorreceptores que expresan fluorescencia verde

Con el fin de introducir la GFP a las células se utilizó un lentivirus que llevaba la proteína reportera GFP bajo el promotor EF1 (SPARQ-GFP). La producción de las partículas virales se hizo siguiendo el sistema de segunda generación. Las células HEK293T se transfectaron con los plásmidos SPARQ-GFP, psPAX2 y pMD2.G (Addgene) con una ratio de 1:0,75:0,25 μ g ADN utilizando FuGene 6. Después de 16 horas, se cambió el medio y los virus se recolectaron a las 24 y 48 horas y se concentraron por ultracentrifugación.

Posteriormente, la línea CBIP-30-4F-5 se cultivó en presencia del lentivirus y en las 24-48 horas se seleccionaron las colonias verdes para la posterior diferenciación a fotorreceptores.

M.3

Materiales y métodos

Trasplante subretiniano de células de EPR y de CPF derivadas de hESC o de hiPSC

Antes de la intervención quirúrgica, las células de EPR a trasplantar fueron marcadas transitoriamente con 20 $\mu\text{mol/l}$ de CellTracker™ verde CMFDA (Life Technologies, Cat. No. C2925). Se incubaron durante treinta minutos a 37°C con el mencionado reactivo y posteriormente fueron lavadas y suspendidas en un medio de diferenciación de EPR a una densidad de 5×10^4 células/ μl . En el caso de la inyección combinada de EPR y CPF, estas últimas se transfectaron con un vector lentiviral para integrar un transgen que contenía la secuencia ORF de la proteína verde fluorescente GFP (del inglés *green fluorescent protein*) bajo el control de promotor viral EF1 (SparQ-GPF).

La técnica para realizar el trasplante subretiniano de las células está basada en el método descrito por Warfvinge *et al.*,⁷¹ con ciertas modificaciones que se describen a continuación (video disponible en: <https://doi.org/10.1038/mtm.2016.10>). En primer lugar, se aplicó al animal anestesia general inhalatoria con una mezcla de isofluorano (Aerrane®, Laboratorios Baxter) al 2% y oxígeno al 1% (inducción en cámara de contención y mantenimiento con mascarilla nasal de rata). Seguidamente se colocó la rata sobre una placa tibia a 37°C y se sujetó la cabeza fijando la mascarilla a la mesa de trabajo con esparadrapo. Se dilataron las pupilas con tropicamida (Colircusí Tropicamida® 10 mg/ml, Laboratorios Alcon Cusí) y fenilefrina (Colircusí Fenilefrina® 100 mg/ml, Laboratorios Alcon Cusí).

Bajo microscopio quirúrgico con un punto simple de sutura (Prolene™ 7/0 Ethicon, Johnson & Johnson) en párpado superior y otro en la conjuntiva límbica superior se expuso la conjuntiva bulbar

superior. Se traccionaron suavemente las suturas y se fijaron con pinzas de sujeción, logrando la estabilización del globo ocular y una correcta exposición del área quirúrgica. Se disecó la conjuntiva bulbar superior y la cápsula de Tenon hasta exponer la esclera dorsal. Se realizó una esclerotomía de 2 mm (cuchillete de 20 G) a 4 mm del limbo, hora 11, sin traspasar la retina. Se cargó una pequeña cantidad de aire en una aguja de punta roma de 32 gauge (32 G) acoplada a una jeringa de microlitros (μ l) Hamilton, seguido de 0,5 μ l de ácido hialurónico (Biolon™ 10 mg/ml, Biotechnology General Ltd.) y de 2 μ l (100 000 células aproximadamente) de la suspensión celular. La aguja de 32 G se introdujo tangencialmente por el espacio subretiniano a través de la esclerotomía y se procedió a inyectar el viscoelástico y las células. El aire se inyectó en último lugar para “bloquear” la suspensión en el lugar de la inyección y minimizar el reflujo. Se retiraron cuidadosamente la aguja y las suturas de fijación y se aposicionó la conjuntiva disecada del lugar de inyección.

Para finalizar se instiló una gota de tobramicina + dexametasona (TobraDex® 3mg/ml + 1 mg/ml, Laboratorios Alcon) como antiinflamatorio local y profilaxis antibiótica. Posteriormente se realizó una retinografía color fundus (Micron III retinal imaging system, Phoenix Research Laboratories) para visualizar la burbuja subretiniana y sus características. De esta forma se pudieron descartar aquellos ojos con hemovítreo y/o trasplantes localizados en el humor vítreo en vez del espacio subretiniano. Se realizó otra retinografía con filtro azul para monitorizar las células de EPR marcadas con CellTracker™ fluorescente y/o las CPF transfectadas con GFP, para así, confirmar la correcta localización del trasplante.

M.4

Materiales y métodos

Inmunosupresión de las ratas RCS con ciclosporina A

Para prevenir un rechazo del trasplante celular, los animales fueron inmunosuprimidos con una mezcla de 21 mg/kg/día de ciclosporina A (CsA) (Novartis, Cat. No. 653833.3) y 1 ml de sucralosa (Clear H₂O, Cat. No. 74-02-5022). El tratamiento se inició dos días antes de la inyección y se mantuvo a lo largo de toda la duración del experimento. Cada 2-3 semanas se realizó un hemograma completo (BC-2800Vet, Minidray) en 20 µl de sangre periférica para verificar el estado de inmunosupresión de las ratas.

Independientemente del período de tratamiento, todos los animales fueron inmunosuprimidos con éxito, reflejado por un recuento de leucocitos por debajo del rango de referencia y sin presentar alteraciones significativas en otros parámetros hematológicos (figura R.20).

M.5

Materiales y métodos

Análisis histológicos

Se realizaron criosecciones de 14 μm sobre láminas cubiertas con polilisina que fueron fijadas con una mezcla de metanol y ácido acético (95:5 v/v) durante un minuto a -20°C y posteriormente teñidas con hematoxilina y eosina mediante protocolos estándar con el fin de evaluar el sitio de inyección, la histología retiniana y cualquier signo de formación tumoral. En los ojos inyectados con medio se midió el número de filas celulares de la capa nuclear externa y el grosor de la capa de unión de segmentos internos y externos de los fotorreceptores. En los ojos inyectados con células de EPR derivadas de hPSC se realizaron dichas mediciones, pero en dos ubicaciones distintas: una sobre el área trasplantada, y la otra en un área no trasplantada, lejos del lugar de la inyección. Para estos análisis histológicos se utilizó el software ImageJ y para los análisis estadísticos, la significancia fue calculada mediante el test de ANOVA, seguido por el test de Tukey.

M.6

Materiales y métodos

Análisis inmunohistoquímicos

Los ojos de las ratas fueron enucleados y congelados en OCT (solución de alcohol polivinil y polietilenglicol utilizada para embeber tejidos para su congelación y subsiguiente procesamiento histológico; Tissue-Tek, Sakura Finetech). Luego, o fueron seccionados para los análisis histológicos e inmunohistológicos, o el EPR fue extraído en su totalidad en una preparación en *flat mount*.

M.6.1 Inmunotinción de las criosecciones

Las secciones fueron secadas durante una hora a temperatura ambiente, se fijaron con paraformaldehído al 4% (w/v) (Electron Microscopy Sciences, Cat. No. 15710) durante 20 minutos a 37°C y se lavaron con PBS. Las muestras fueron bloqueadas durante una hora a temperatura ambiente con una solución que contenía suero de oveja al 3% (v/v), BSA al 1% (v/v) y Triton X-100 en PBS al 0,3% (v/v). Tras el bloqueo, se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario de interés. Al día siguiente, las secciones se lavaron con PBS y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo secundario. Después se montaron con Fluoroshield con DAPI (Sigma-Aldrich, Cat. No. F6057) y se fueron analizadas bajo el microscopio confocal (FV1000 Olympus). En la tabla M.3 se describen los anticuerpos y las diluciones utilizadas para realizar las diferentes inmunotinciones, incluyendo el cóctel de marcadores específicos de humano (HSM, del inglés *human specific marker*).

M.6.2 Inmuntinción de las preparaciones en *flat mount*

Los ojos de los animales fueron enucleados bajo microscopio. El segmento anterior y el cristalino fueron retirados y las neurorretinas fueron desprendidas y separadas del nervio óptico con tijeras curvas finas para ser igualmente descartadas. Posteriormente se realizaron cortes radiales en la copa óptica restante de la preparación en *flat mount* (complejo esclera-coroides-EPR) dirigidos hacia el nervio óptico para exponer la monocapa de EPR (figura M.1)⁷² y seguidamente se fijaron dichas muestras en metanol al 100 % durante 30 minutos a -20°C . Una vez fijas, las copas ópticas se lavaron con una mezcla de PBS y Triton X-100 (v/v), se bloquearon con BSA al 1 % (v/v) y Triton X-100 en PBS al 0,1 % (v/v) y se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario de interés. Un día después se lavaron las copas ópticas y se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario durante una hora. Los segmentos posteriores fueron lavados con PBS y se montaron en *flat mount* con Fluoroshield con DAPI. Finalmente, las muestras inmunoteñidas fueron

Tabla M.3 Anticuerpos empleados en los análisis inmunohistoquímicos del presente estudio

Nombre del anticuerpo	Casa comercial y referencia	Dilución
Núcleo humano	Millipore, MAB1281	1:100
Mitocondria humana	Millipore, MAB1273	1:100
TRA-1-85	Millipore, MAB4385	1:100
Rodopsina	Santa Cruz Biotechnology, sc-20139	1:50
CRALBP	Santa Cruz Biotechnology, sc-28193	1:50
GFAP	Abcam, ab7260	1:200
Ki67	Abcam, ab16667	1:100
ZO-1	Millipore, AB2272	1:200
Anti-IgG ratón-FITC	Santa Cruz Biotechnology, sc-2012	1:250
Anti-IgG conejo-AlexaFluor568	Life Technologies, A11036	1:250

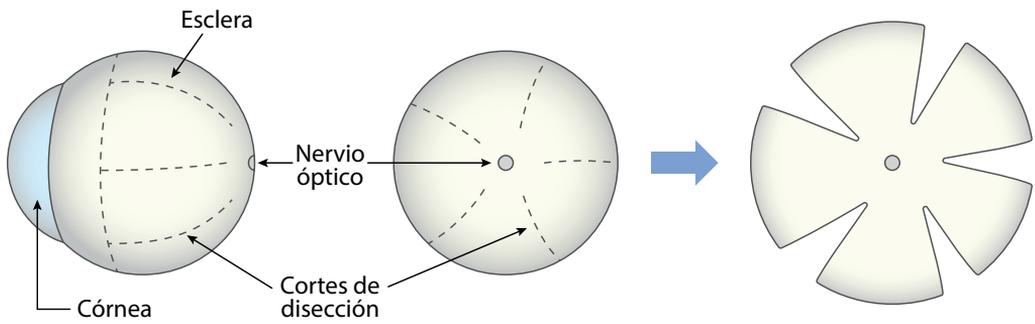


Figura M.1. Disección esquematizada del polo posterior del ojo en *flat mount*. Después de retirar el segmento anterior y desprender la neurorretina, la copa óptica es cortada como se muestra en la figura para de esta forma aplanar el complejo. Modificado de Pijanka *et al.* [72]

analizadas bajo el microscopio confocal (FV1000 Olympus). Los anticuerpos y diluciones utilizadas para la inmunofluorescencia en los ojos preparados en *flat mount* se detallan en la tabla M.1.

M.7

Materiales y métodos

Microscopía electrónica de transmisión

Las muestras homogéneas de células de EPR obtenidas a partir de cultivos de hPSC fueron fijadas en glutaraldehído al 2,5 % (w/v) durante dos horas a 4 °C y el proceso de posfijación se llevó a cabo en tetróxido de osmio al 1 % (w/v) durante dos horas a 4 °C. Seguidamente se deshidrataron las muestras con etanol y fueron embebidas en resina epoxi para la posterior realización cortes semifinos y ultrafinos los cuales fueron examinados bajo el microscopio electrónico de transmisión Jeol 1011 (Jeol).

Las preparaciones oculares contenían neurorretina, EPR, coroides y esclera, y fueron disecadas a partir de los ojos inyectados con EPR y con medio (controles). Adicionalmente, se obtuvo una muestra comparable proveniente de un ojo de rata de la cepa salvaje Long-Evans que sirvió como control sano. Una vez fijadas, las preparaciones se tiñeron con acetato de uranilo acuoso, se deshidrataron y fueron embebidas en resina epoxi. Se realizaron cortes semifinos que fueron teñidos con azul de metileno y fueron examinados bajo microscopio óptico, de la misma forma que cortes ultrafinos (70 nm), que se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo que fueron examinados en un microscopio electrónico de transmisión Jeol 1400.

M.8

Materiales y métodos

Análisis TUNEL

Con el objetivo de determinar los niveles de apoptosis de los fotorreceptores en las ratas tratadas y no tratadas, se analizaron las retinas mediante la técnica TUNEL (del inglés, *terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP nick end labelling*), la cual detecta la fragmentación del ADN. Se cortaron criosecciones de 14 μm y se dispusieron en láminas cubiertas de polilisina para ser fijadas con formaldehído al 4% (v/v) durante 20 minutos a 37 °C. Posteriormente fueron lavadas en PBS y permeabilizadas con proteinasa K (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción TUNEL fue realizada utilizando el Click-iT Plus TUNEL Assay (Life Technologies, Cat. No. C10617) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. El control positivo se obtuvo induciendo la rotura de la cadena del ADN con una unidad de ADNasa I. El control negativo se trató con un cóctel TUNEL al que le faltaba la enzima TdT. Las secciones fueron montadas con Fluoroshield con DAPI (Sigma-Aldrich, Cat. No. F6057) y analizadas bajo microscopía confocal (FV1000 Olympus).

M.9

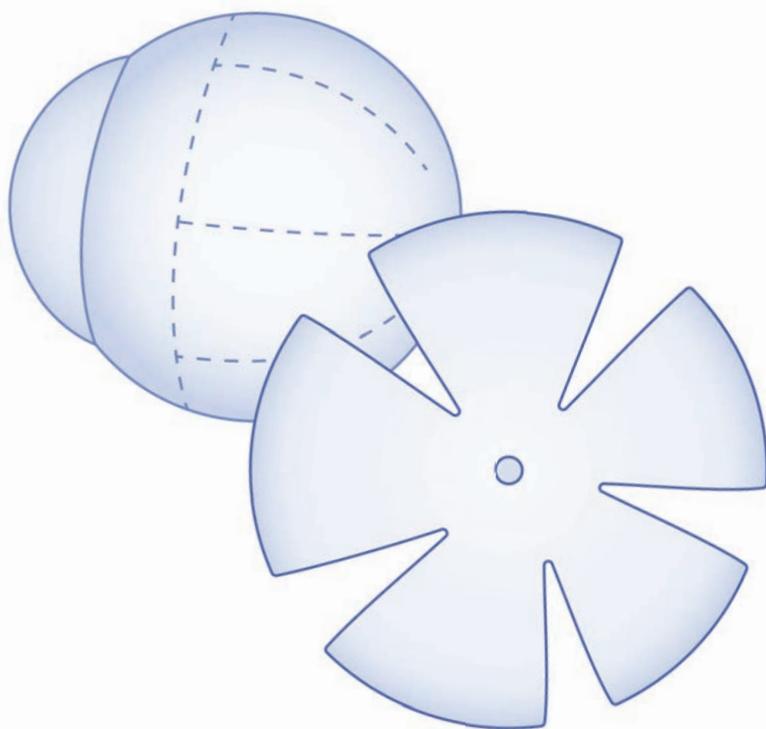
Materiales y métodos

Valoración de la función visual mediante electroretinografía

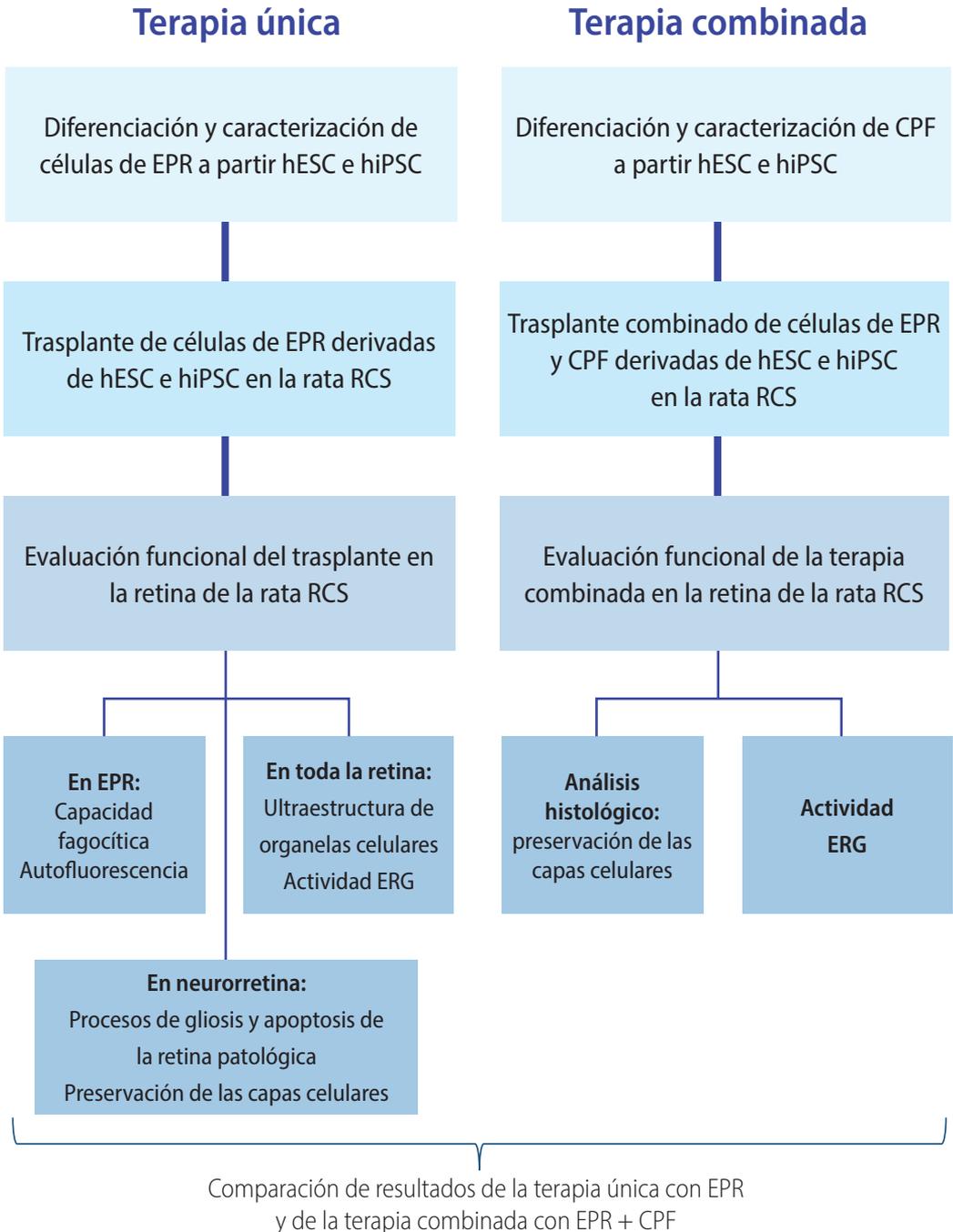
Con el fin de evaluar funcionalmente el efecto de la terapia celular se examinaron las retinas a 5, 8 y 12 semanas posinyección mediante imágenes en vivo y electroretinografía focal que permitió medir la respuesta visual limitada a áreas particulares. Los registros fueron medidos utilizando la plataforma Micron III (Phoenix Research Laboratories). Las ratas se adaptaron a la oscuridad durante 12-16 horas previamente a la realización del electroretinograma (ERG). Bajo luz roja se anestesiaron las ratas con gas de isoflurano al 2% (v/v) (Aerrane®, Laboratorios Baxter) y se colocaron sobre una placa tibia a 37°C. Se dilataron las pupilas con una mezcla de tropicamida (Colircusi Tropicamida® 10 mg/ml, Laboratorios Alcon Cusí) y fenilefrina (Colircusi Fenilefrina® 100 mg/ml, Laboratorios Alcon Cusí). En el experimento de la terapia única con EPR, las retinas se estimularon con un *spot* de luz de 2 mm a intensidades de 500, 4 000 y 16 000 cd·seg/m². En el experimento de la terapia combinada de EPR + CPF, las retinas se estimularon con intensidades de 0,01; 0,04; 0,156; 0,625; 2,5; 10 y 40 cd·seg/m². En el caso de los ojos inyectados con EPR solo o con EPR + CPF se estimularon dos *spots* diferentes: uno en la zona trasplantada y otro en una zona alejada del trasplante. En el caso de los ojos inyectados con medio solo se estimuló un *spot* en la zona inyectada. Se obtuvieron un mínimo de 5 trazos de ERG para cada zona y los resultados de estos se promediaron. La amplitud y el tiempo implícito de la onda *b* fueron calculados usando el software Labscribe2. Respecto a los análisis estadísticos, la significancia fue calculada mediante el test de ANOVA, seguido por el test de Tukey.

Todos los procedimientos realizados en las ratas RCS fueron llevados a cabo bajo la aprobación del comité de ética de experimentación animal del Hospital Universitari Vall d'Hebron y siguiendo los estatutos de la Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) y la declaración de Helsinki para el uso de animales en investigación oftalmológica.

Resultados



Esquema R.1 Resumen de los resultados de la terapia celular única con EPR humano y de la terapia combinada con EPR y CPF humanas en las ratas RCS. CPF, células precursoras de fotorreceptores; EPR, epitelio pigmentario de la retina; ESC, células madre embrionarias; iPSC, células madre pluripotentes inducidas; hPSC, células madre pluripotentes humanas; RCS, Royal College of Surgeons; ERG, electroretinograma.



R.1

Resultados

Terapia celular con células madre pluripotentes humanas derivadas a EPR para el tratamiento de distrofias de retina

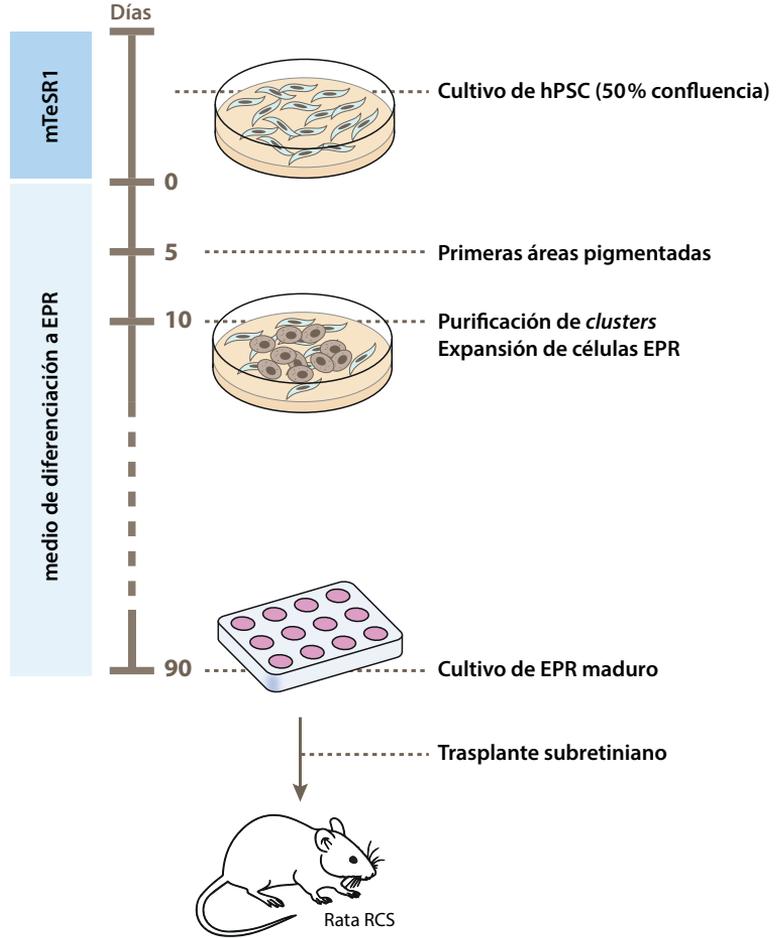
R.1.1 Diferenciación y caracterización de células de epitelio pigmentario de la retina (EPR) a partir de células madre embrionarias (hESC) y pluripotentes inducidas (hiPSC) humanas

R.1.1.1 Diferenciación de hPSC a EPR

Para estudiar el posible efecto terapéutico de la terapia celular en un modelo mudo de degeneración de retina, se eligieron dos fuentes distintas de células madre humanas a partir de las cuales se consiguieron diferenciar células de EPR.

Las dos líneas de células madre pluripotentes humanas (hPSC) se obtuvieron del banco de células madre de Barcelona (http://www.cmr.b.eu/banco-lineas-celulares/en_index.html). Como línea de células madre embrionarias se utilizó la ES4 y como línea de células madre pluripotentes inducidas se seleccionó la CBiPSC30-4F-5, ambas de disposición pública. El protocolo de diferenciación de hPSC a células EPR tuvo una duración de 12 semanas (figura R.1) y fue adaptado de Idelson *et al.*⁶⁸ El protocolo aplicado fue el mismo para hESC y para hiPSC. Se cultivaron las dos fuentes de hPSC en discos de matrigel con medio de diferenciación de EPR hasta que

Figura R.1. Protocolo de diferenciación de hPSC a EPR. Cronograma esquemático en el que se muestra la secuencia de eventos durante el proceso de derivación de células EPR a partir de una fuente de células madre pluripotentes humanas. hPSC, células madre pluripotentes humanas; EPR, epitelio pigmentario de la retina; RCS: Royal College of Surgeons.



se empezaron a observar células pigmentadas a partir de la quinta semana de diferenciación.

Aproximadamente una semana más tarde, durante la semana 6, estos *clusters* o áreas pigmentadas alcanzaron el tamaño adecuado para poder ser purificados manualmente (figura R.2 panel central) y cultivados para la obtención eventual de un cultivo celular de pigmentación homogénea. Después de 12 semanas de cultivo con medio de diferenciación de EPR y una vez seleccionadas manualmente las áreas de células pigmentadas, se obtuvo una monocapa de células pigmentadas que presentaban forma de empedrado, una de las características morfológicas típicas de las células de EPR (figura R.2 panel derecho). Así, después de tres meses en cultivo y posterior a su caracterización fenotípica y molecular (ver apartado sección R.1.1.2), se obtuvieron exitosamente cultivos de células de EPR maduras a partir de las dos fuentes de hPSC.

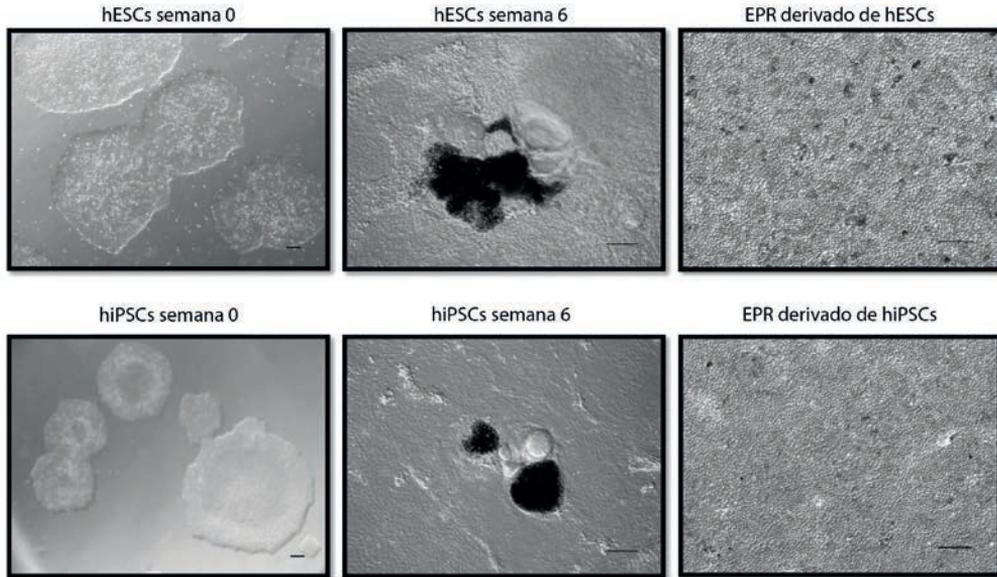


Figura R.2. Micrografías de contraste de fases que muestran el progreso de diferenciación morfológica de hESC e hiPSC a EPR. Panel izquierdo: en el inicio de protocolo de diferenciación las células no presentan ninguna característica morfológica típica de EPR. Panel central: en la semana 6 del protocolo de diferenciación se observan *clusters* pigmentados de células. Panel derecho: en la semana 12 se consigue una monocapa de células pigmentadas y dispuestas en forma de empedrado (Barras: 10 µm). hESC, células madre embrionarias humanas; hiPSC, células madre pluripotentes inducidas humanas; EPR, epitelio pigmentario de la retina

R.1.1.2 Caracterización de las células EPR obtenidas a partir de hPSC

Paralelamente al proceso de diferenciación de las células a EPR se llevó a cabo la caracterización de las mismas. Con tal de asegurar la obtención de células maduras y viables se estudió el aspecto y la morfología de las células a lo largo de las fases de diferenciación, así como la pérdida progresiva de la expresión de marcadores de pluripotencia y la adquisición gradual de la expresión de marcadores neurotróficos específicos del EPR. La pérdida de la capacidad proliferativa y la adquisición de un estado de diferenciación a EPR maduro son aspectos clave para la aplicación de una terapia celular segura y eficaz.

Mediante microscopía electrónica se verificó la morfología y estructura celular característica del EPR como la presencia de melanosomas (figura R.3B), la distribución de las células en monocapa polarizada con microvellosidades apicales (figura R.3A) y las uniones estrechas entre las células (figura R.3C).

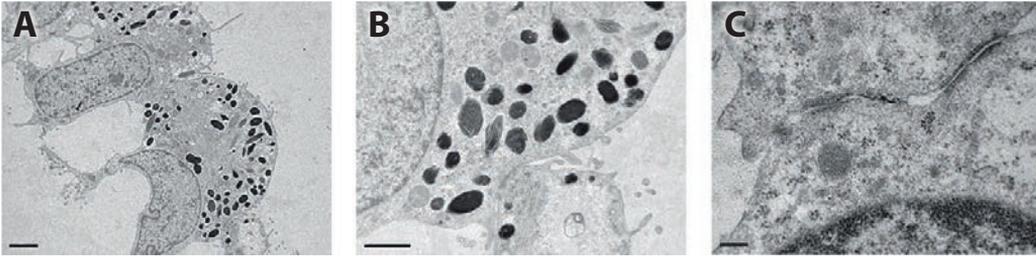


Figura R.3. Micrografías electrónicas de transmisión que muestran el fenotipo de las células de EPR a las 12 semanas de diferenciación. A: se aprecian los núcleos basales y las microvellosidades apicales típicas del EPR (Barra: 2 μm). B: gránulos de melanina intracelulares (Barra: 1 μm). C: uniones estrechas intercelulares (Barra: 0,2 μm).

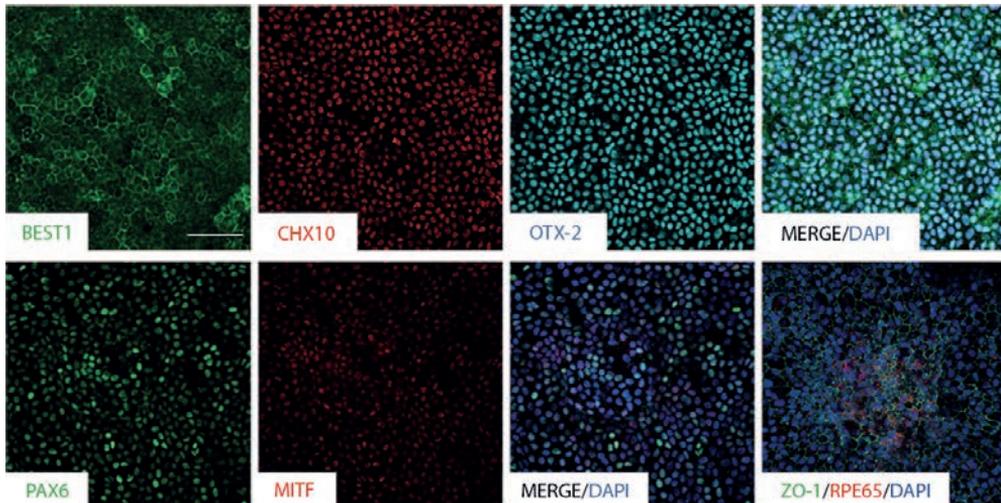


Figura R.4. Análisis de inmunocitofluorescencia de las células de EPR diferenciadas. Inmunotinciones que confirman la presencia de proteínas responsables del desarrollo de la retina neural y del EPR (PAX6, MITF, CHX10 y OTX2), así como de los marcadores de madurez del EPR (BEST1, RPE65 y ZO-1) (Barra: 50 μm ; DAPI: tinción nuclear).

Se determinó también el perfil de expresión de marcadores de diferenciación celular a través de análisis de inmunocitofluorescencia. Las células diferenciadas a EPR expresaron diversos marcadores neuroretinianos como PAX6, OTX2 y CHX10 y específicos de EPR como BEST1, MITF, RPE65 y el específico de uniones estrechas ZO-1 (figura R.4).

Las imágenes que se muestran en las figuras R.3 y R.4 fueron obtenidas a partir de células diferenciadas desde hiPSC. No obstante, estos hallazgos se obtuvieron de forma comparable con las células diferenciadas a partir de hESC y fueron reproducibles en diversos experimentos independientes (n=3).

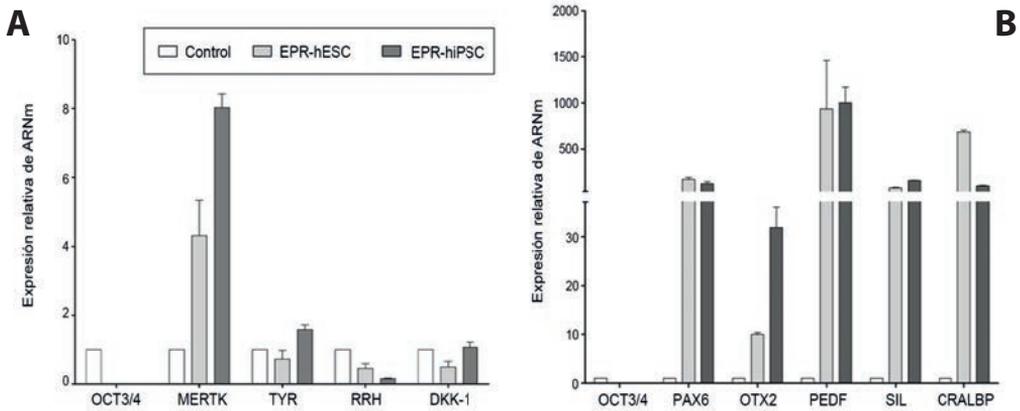


Figura R.5. Cambios en los niveles de ARN mensajero (ARNm) de diversos genes de proliferación y de diferenciación a EPR en la semana 12 del protocolo de diferenciación. El eje de ordenadas muestra los niveles de expresión génica en unidades arbitrarias (u.a.). El eje de abscisas corresponde a la expresión de cada gen estudiado en cada grupo celular: EPR-hESC, EPR-hiPSC y las células control (células madre indiferenciadas correspondientes al día 0 del protocolo de diferenciación). Todos los datos de expresión se normalizaron respecto a la expresión de la muestra control. Para facilitar la representación gráfica de los cambios de expresión de los genes estudiados se agrupan en dos gráficos siendo (A) los genes cuyos niveles fueron menores de 10 u.a., y (B) los genes cuyos niveles de expresión fueron mayores de 10 u.a. Después de 4 días de diferenciación el marcador de pluripotencia OCT4 disminuye su expresión y los genes de desarrollo ocular (PAX6, RX, DKK-1) y los específicos de EPR (CRALBP, MITF, OTX2, SIL, TYR, PEDF y MERTK) aumentan su expresión.

Paralelamente, se estudió también la expresión de genes relacionados tanto con estados proliferativos como con estados más diferenciados a través de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (PCRc) en tiempo real. Las células diferenciadas a EPR derivadas de hESC e hiPSC mostraron una disminución progresiva de la expresión del marcador de pluripotencia *OCT3/4* y un incremento de la expresión de genes fundamentales para el desarrollo ocular como *PAX6* y *RX* (marcadores neurales), *CRALBP* (gen implicado en el ciclo visual), *MITF* y *OTX2* (genes codificadores de factores de transcripción específicos del linaje celular de EPR), *SILVER* (SIL, gen relacionado con la síntesis de pigmento), *MERTK* (marcador fagocítico) y el gen codificador de PEDF (factor neurotrófico derivado del epitelio pigmentario). No se encontraron diferencias en los niveles de expresión de genes relacionados con el desarrollo retiniano-EPR entre las dos fuentes de hPSC a excepción del gen *OTX2*, el cual se detectó expresado aproximadamente tres veces más en la línea celular originada a partir de hiPSC que en la de hESC (figura R.5).

R.1.2 Trasplante de las células de EPR derivadas de hESC y hiPSC en un modelo animal de retinosis pigmentaria: la rata Royal College of Surgeons

A lo largo de la historia de la investigación biomédica, se han utilizado diversos modelos animales para el estudio de enfermedades humanas y la aplicación de terapias experimentales. La rata del Royal College of Surgeons (RCS) constituye un ejemplo de modelo preclínico para el estudio y la búsqueda de nuevas terapias para enfermedades degenerativas retinianas. La rata RCS fue descrita por primera vez en 1938 por Bourne *et al.*,⁶⁰ y es uno de los modelos más investigados en el campo de las terapias experimentales para las distrofias de retina. Es un modelo preclínico adecuado para este tipo de estudios debido a una mutación en el gen *MERTK*²⁶ que hace que el EPR de estos animales no sea funcional.

El gen *MERTK* codifica para una proteína transmembrana de la familia tirosin-quinasa (MER) esencial para la regulación de diversos procesos fisiológicos que incluyen la supervivencia celular, migración, diferenciación y fagocitosis de células apoptóticas. En ausencia de la proteína MER, el EPR presenta un defecto en la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores,⁷³ hecho que provoca una degeneración progresiva de conos y bastones que comienza a partir del día 21 de vida.⁶⁶

Utilizando este modelo, se evaluó la supervivencia de las células de EPR derivadas de hPSC en el espacio subretiniano y su grado de integración con el EPR endógeno. Se establecieron tres grupos de animales según el material que recibieran en el espacio subretiniano mediante inyección (para detalles sobre la técnica quirúrgica empleada consultar la sección M.4). Así, el primer grupo de animales fue inyectado con 2 μ l de una suspensión de células de EPR derivadas de hESC (100 000 células totales aproximadamente), el segundo grupo fue inyectado con la misma cantidad de células de EPR derivadas de hiPSC, y el tercer grupo fue inyectado con 2 μ l de medio de cultivo celular y constituyó el grupo de control (sin terapia celular).

A su vez, cada uno de los tres grupos de animales se subdividieron en dos grupos según el día posnatal de inyección. El primer grupo fue inyectado en el día 21 de vida (p21) coincidiendo con el momento en el que se inicia el proceso degenerativo de la retina en

Tabla R.1 Grupos de animales trasplantados. Para cada grupo se muestra el número de ojos (n), el tipo de material inyectado (EPR-hESC o EPR-hiPSC o medio), el día posnatal de inyección (p21 o p42) y la semana de eutanasia (5, 8 o 12 semanas PI).

Día de inyección	Eutanasia (semanas PI)	Material inyectado		
		EPR-hESC	EPR-hiPSC	Medio
p21	5	11	12	14
	8	12	15	4
	12	12	12	4
p42	5	4	4	4
Total (n)		39	43	26

la rata RCS. La aplicación de la terapia celular en ese momento del desarrollo permite determinar si dicha terapia puede frenar o disminuir el proceso degenerativo de la retina. El segundo grupo fue inyectado en el día 42 de vida (p42), momento en el que la degeneración ya se encuentra en un estadio avanzado, permitiendo así determinar si se produce una reversión parcial de la misma y estudiar el grado de preservación retiniana gracias a la terapia celular (tabla R.1).

Para poder realizar un seguimiento de la localización de las células trasplantadas dentro del ojo, existen diversas técnicas de marcaje celular. Con el fin de evitar los problemas generalmente asociados al marcaje basado en la transfección vírica, las células fueron teñidas transitoriamente antes de ser inyectadas con un marcador fluorescente verde (CellTracker™) que permite identificarlas *in vivo* durante los primeros 5-6 días después del trasplante. Una vez realizada la inyección, se tomaron fotografías del fondo de ojo con un filtro de fluorescencia verde para detectar la ubicación de las células trasplantadas marcadas y para verificar la formación de una burbuja subretiniana (figura R.6). No se incluyeron en el estudio los ojos que en el momento del trasplante presentaron cualquier complicación derivada del procedimiento (hemorragia masiva, inyección intravítrea o no formación de burbuja subretiniana).

Para estudiar el grado de integración de las células trasplantadas en los animales inyectados a p21, se enuclearon un total de 37 ojos a las 5 semanas posinyección (PI). De estos 37 ojos, 33 se embebie-

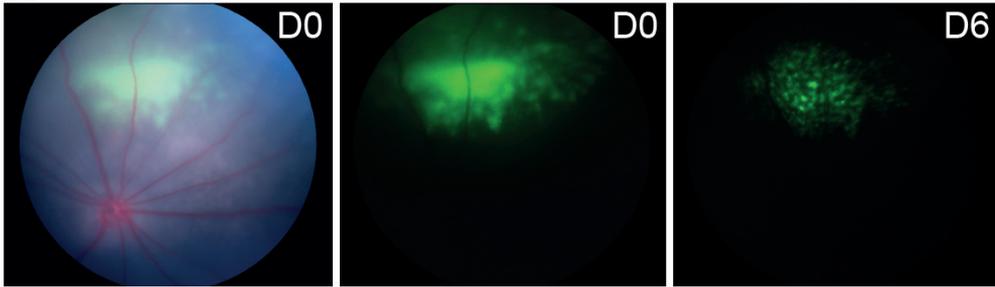


Figura R.6. Retinoscopias realizadas inmediatamente después del trasplante celular. Las imágenes fundoscópicas muestran la localización de las células trasplantadas dentro del espacio subretiniano de la ratona RCS minutos después del trasplante (paneles izquierdo y central) y 6 días más tarde (panel derecho). La fluorescencia verde que se observa es emitida por el fluoróforo CellTracker™ que fue usado para marcar las células trasplantadas de forma transitoria.

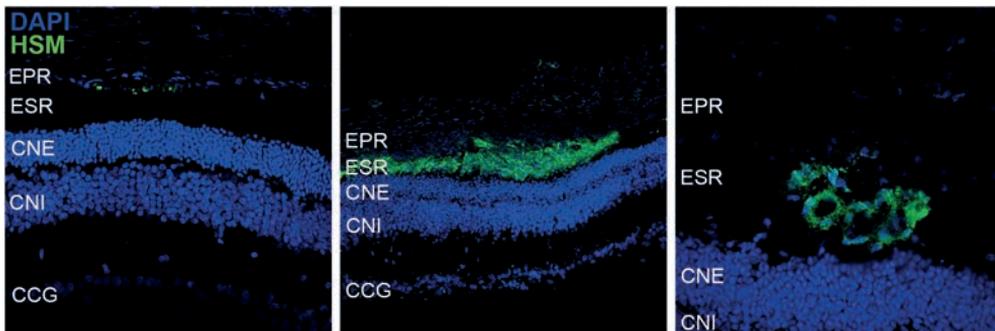


Figura R.7. Tinción inmunofluorescente donde se aprecia la distribución de las células hiPSC diferenciadas a EPR en el espacio subretiniano. Las células humanas se muestran en verde, teñidas con un cóctel de marcadores humanos específicos (HSM). Se encontraron las células humanas en tres localizaciones diferentes: adyacente al EPR nativo (panel izquierdo), en el espacio subretiniano adoptando una estructura laminar (panel central) o en roseta (panel derecho). Resultados similares se obtuvieron con la línea celular derivada de hESC. Análisis realizados a las 5 semanas PI. (DAPI: tinción nuclear). EPR, epitelio pigmentario de la retina; ESR, espacio subretiniano; CNE, capa nuclear externa; CNI, capa nuclear interna; CCG, capa de células ganglionares.

ron en solución OCT (del inglés *Optimum Cutting Temperature*) para posteriormente ser cortados en microsecciones y realizar tinciones inmunofluorescentes. Los cuatro ojos restantes se destinaron a inmunotinciones en *flat mount*.

Un cóctel de tres anticuerpos primarios específicos de humanos (detección de núcleo, mitocondria y membrana plasmática) fue utilizado para detectar la presencia de células humanas en la muestra de tejido de ratona RCS. Mediante la tinción con este cóctel de marcadores específicos de humano (HSM, del inglés *human specific marker*) se observó la integración de las células trasplantadas en el espacio subretiniano de la ratona, bien distribuidas como unidades dispersas de células individuales u ocupando el espacio subretiniano como

láminas extensas o en formaciones en roseta (figura R.7). Nunca se observaron ocupando las capas de la retina neurosensorial. Estos resultados fueron observados de forma similar tanto con células derivadas de hiPSC como de hESC.

De esta forma, se confirmó que las células de EPR derivadas de las dos fuentes de hPSC trasplantadas sobreviven y son capaces de ocupar el espacio correspondiente al de sus análogas endógenas.

R.1.3 Integración de las células derivadas de hPSC en la monocapa de EPR endógena de la rata

Para determinar la distribución de las células trasplantadas y si estas eran capaces de establecer uniones intercelulares entre ellas mismas y con las células nativas, se enuclearon ojos de animales inyectados a p21 y se aislaron los polos posteriores. A continuación, se descartaron las retinas con el objetivo de exponer la monocapa de EPR en toda su extensión (preparación en *flat mount*). Las muestras fueron fijadas con metanol y preparadas para realizar análisis de inmunofluorescencia.

En todos los ojos inyectados con EPR y estudiados mediante inmunofluorescencia en *flat mount* (5 semanas PI, n=4; 8 semanas PI, n=6 y 12 semanas PI, n=8) el trasplante de EPR humano cubrió un área comparable a la de la burbuja original observada en la retinografía realizada inmediatamente después de la inyección (figura R.8). Cabe destacar que también se observaron las células humanas formando uniones estrechas entre ellas y asociándose con el tejido nativo en todos los casos estudiados hasta la semana 12 PI. Estos patrones de distribución e integración se describieron de forma similar tanto en los trasplantes derivados de hESC como en los derivados de hiPSC (figura R.9).

R.1.4 Las células trasplantadas expresan marcadores específicos de EPR y presentan capacidad fagocítica

Una vez verificada la adecuada integración de los trasplantes en la retina de las ratas RCS, se determinó si el estado de diferenciación de las células trasplantadas se había visto alterado durante el tiempo transcurrido en el nuevo entorno *in vivo*. Como prueba de concep-

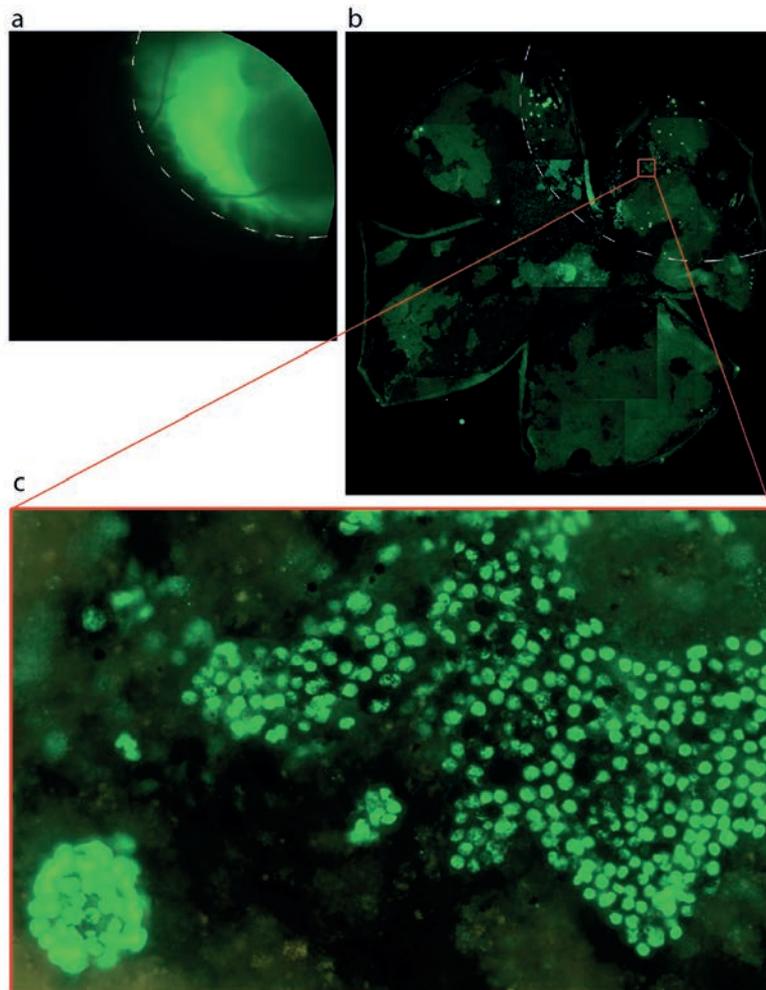


Figura R.8. Retinografía y tinción inmunofluorescente del tejido preparado en flat mount. (a) En la retinografía se muestra la burbuja subretiniana de células en suspensión marcadas con CellTracker™ inmediatamente después de la inyección. La línea blanca discontinua delimita la extensión de la burbuja. (b) Inmunotinción con un anticuerpo específico de los núcleos de células humanas (*human nuclei*, en verde) donde se observa el área cubierta por el trasplante después de 12 semanas de su realización. La línea blanca discontinua delimita el área donde el EPR derivado de hPSC sobrevivió y se integró en el tejido endógeno, coincidiendo con la extensión de la burbuja observada inicialmente. (c) Detalle de las diversas distribuciones del EPR derivado de hPSC trasplantado en el EPR nativo: estructura en roseta (abajo izquierda) y en lámina (centro-de-cha).

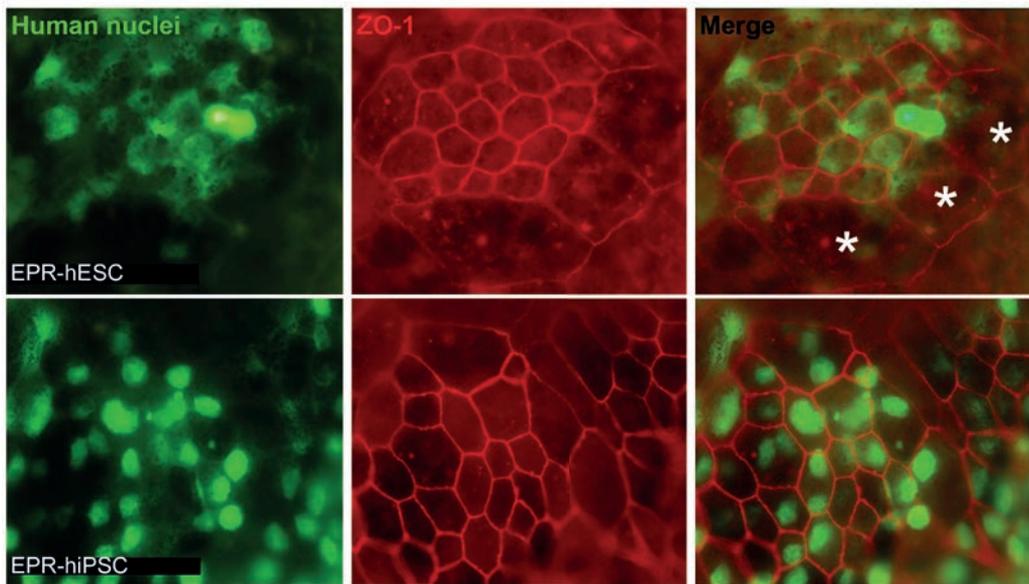


Figura R.9. Tinción inmunofluorescente de preparaciones en *flat mount* del EPR de ojos inyectados con hPSC. El marcaje específico de los núcleos de células humanas se observa en verde (*human nuclei*). El marcaje específico de las zónulas ocludens (ZO-1) en rojo demuestra el establecimiento de uniones estrechas entre las mismas células humanas y las células de rata. Los asteriscos identifican las células de EPR de origen místico, más grandes y no teñidas con el anticuerpo específico para los núcleos humanos. EPR, epitelio pigmentario de la retina. hESC-derived RPE, EPR derivado de hESC (traducción del inglés); hiPSC-derived RPE, EPR derivado de hiPSC (traducción del inglés).

to, se evaluó la expresión del marcador específico de EPR, CRALBP. *CRALBP* es un gen que codifica para una proteína del ciclo visual (participa en la regeneración del 11-*cis*-retinol activo y 11-*cis*-retinaldehído procedentes de los productos inactivos 11-*trans* del ciclo de la rodopsina, así como en la síntesis *de novo* de estos retinoides a partir de precursores metabólicos 11-*trans*). Durante la caracterización *in vitro* de las células hiPSC derivadas a EPR se observa la expresión de CRALBP al final del proceso de diferenciación *in vitro*, constituyendo uno de los marcadores de madurez del EPR utilizados en este estudio. En animales vertebrados CRALBP se expresa en el EPR de forma abundante y también se ha detectado su expresión en las células de Müller de la retina y en la glándula pineal.

Mediante tinciones de inmunofluorescencia se observó que tanto el EPR derivado de hESC como el derivado de hiPSC expresaba CRALBP a la quinta semana PI (figura R.10, arriba). Además, mediante la detección del marcador de proliferación Ki67 (figura R.10, abajo), se concluyó que la mayoría de células de EPR eran ca-

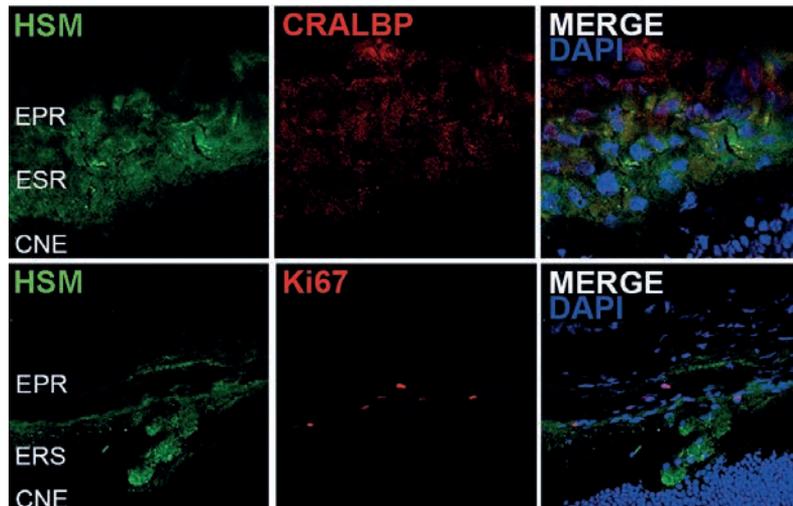


Figura R.10. Tinción inmunofluorescente que muestra la expresión de CRALBP y Ki67 en las células trasplantadas. Las células humanas se muestran en verde, detectadas con el cóctel de HSM. Las células injertadas son positivas para CRALBP y mayoritariamente negativas para Ki67 (tinciones en rojo). Las imágenes mostradas corresponden a ojos inyectados con EPR-hiPSC pero resultados similares se obtuvieron en los ojos inyectados con EPR-hESC. Análisis realizados a las 5 semanas PI. (DAPI: tinción nuclear). HSM, cóctel de marcadores humanos específicos; EPR, epitelio pigmentario de la retina; ESR, espacio subretiniano; CNE, capa nuclear externa.

paces de mantener su estado diferenciado sin revertir hacia el perfil proliferativo original de las células madre de las que provienen.

Por otro lado, para conocer la funcionalidad del trasplante *in vivo*, y por tanto, su capacidad de fagocitar los segmentos externos (SE) de los fotorreceptores, se identificaron las células trasplantadas con el cóctel de HSM y se evaluó si éstas contenían rodopsina. La rodopsina es una proteína fotosensible presente en los SE de los bastones, que se fotoactiva con la luz incidente en el ojo. La rodopsina activa inicia una cascada de fototransducción en la que se suceden una serie de reacciones bioquímicas capaces de transformar los fotones en una corriente catiónica que el circuito de segundas neuronas recibe, integra y envía al cerebro para que dicha información sea interpretada como una imagen. La rodopsina también es una proteína integral de los procesos de formación y de mantenimiento estructural de los discos contenidos en los SE.²

A través de la detección de rodopsina con inmunotinciones, se demostró que las células de EPR humano trasplantadas son capaces de endocitar los detritus “rodopsina-positivos” provenientes de los SE de los fotorreceptores adyacentes (figura R.11).

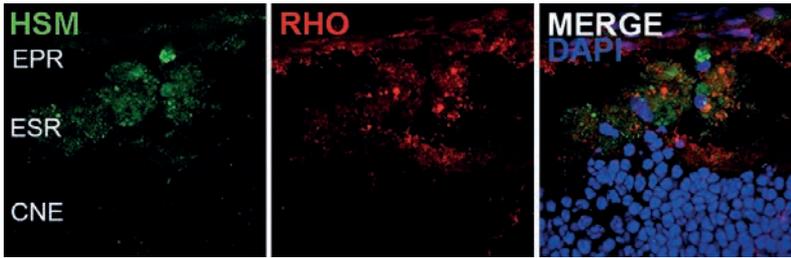


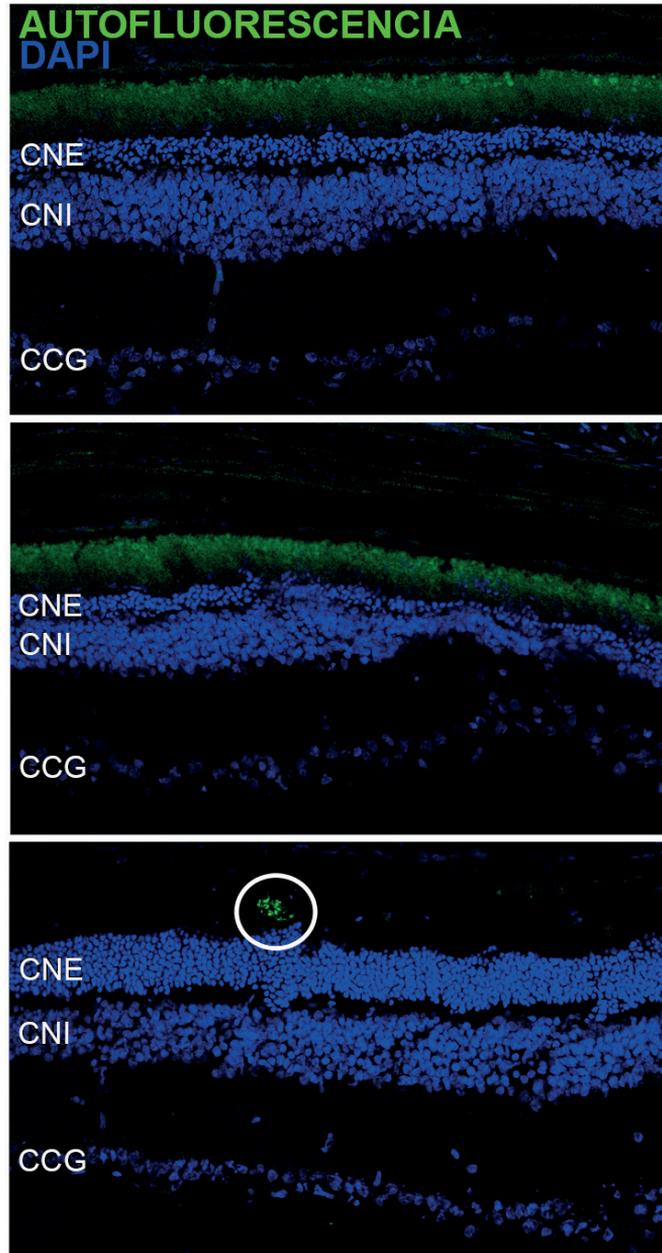
Figura R.11. Tinción inmunofluorescente de rodopsina que demuestra la capacidad fagocítica de rodopsina por parte de las células trasplantadas. Los detritos rodopsina-positivos (RHO) son detectados en el citoplasma de las células humanas. Las imágenes mostradas corresponden a ojos inyectados con EPR-hiPSC pero resultados similares se obtuvieron en los ojos inyectados con EPR-hESC. Análisis realizados a las 5 semanas PI. (DAPI: tinción nuclear). HSM, marcadores humanos específicos; EPR, epitelio pigmentario de la retina; ESR, espacio subretiniano; CNE, capa nuclear externa.

R.1.5 Valoración de la funcionalidad del EPR trasplantado a través de la autofluorescencia

Otro método de validación funcional del trasplante de EPR humano en la retina de la rata, es la monitorización de la autofluorescencia (AF) considerada como un marcador de la fagocitosis y del ciclo visual.

El estudio de la AF permite mapear los fluoróforos presentes de forma natural o patológica en la retina. Algunos de estos fluoróforos forman la lipofuscina, un pigmento ocular compuesto por diversos fluoróforos que se encuentra en forma de gránulos dentro del citoplasma de la célula de EPR y representa una forma alterada de digestión lisosomal de los SE de los fotorreceptores fagocitados. En condiciones normales el EPR no es completamente eficiente en degradar la totalidad de SE que se desprenden de los fotorreceptores activos.⁷⁴ La acumulación progresiva de lipofuscina ocurre de forma natural con el envejecimiento y por tanto constituye un marcador de envejecimiento celular. En este sentido, un aumento pronunciado de AF por exceso del acúmulo de gránulos de lipofuscina en las células del EPR puede deberse a, (i) un recambio anormalmente alto de los SE de los fotorreceptores o a, (ii) un deterioro del proceso de degradación lisosomal de sustratos moleculares fagocitados por el EPR. En el modelo de rata RCS, la lipofuscina se acumula en el espacio subretiniano junto a los fotorreceptores degenerados debido a esta segunda opción, en la que el EPR es incapaz de fagocitar los SE. Este material acumulado es altamente autofluorescente.⁷⁵

Figura R.12. Imágenes representativas del patrón de autofluorescencia (AF) de cada área/grupo de estudio. En las áreas no trasplantadas (panel superior) y en los ojos inyectados con medio (panel central) se observó un patrón de AF disperso por todo el espacio subretiniano, mientras que en las áreas trasplantadas (panel inferior) la AF se observó restringida en puntos discretos de la capa del EPR. Las células humanas trasplantadas se indican en la imagen inferior con un círculo blanco y se detectaron con el anticuerpo anti-núcleo humano. Las imágenes mostradas corresponden a ojos inyectados con EPR-hiPSC pero resultados similares se obtuvieron en los ojos inyectados con EPR-hESC. Análisis realizados a las 5 semanas PI. (DAPI: tinción nuclear). CNE, capa nuclear externa; CNI, capa nuclear interna; CCG, capa de células ganglionares.



En este escenario, se observó una marcada diferencia en el patrón de distribución de la AF entre las regiones trasplantadas y las no trasplantadas por un lado y entre las regiones trasplantadas y los ojos inyectados con medio por el otro. Las áreas trasplantadas con EPR humano (independientemente del origen embrionario o pluripotente inducido) mostraron unos niveles menores de AF (patrón punteado localizado cerca de la capa de EPR), en comparación con las áreas no trasplantadas o las áreas inyectadas con medio, que pre-

sentaron unos niveles de AF remarcablemente superiores (patrón amplio y difuso ocupando todo el espacio subretiniano) (figura R.12).

R.1.6 Efecto de la terapia celular sobre la gliosis y la apoptosis de la retina patológica

Con el fin de determinar si el reemplazo de células de EPR protege a la neuroretina de la rata RCS frente a los procesos de gliosis y la muerte celular programada, se estudió la expresión y distribución de la proteína GFAP (del inglés glial *fibrillary acidic protein*), indicadora de estrés glial,⁷⁶ así como la presencia/ausencia de células apoptóticas en retinas después de 5 semanas del trasplante. Mediante inmunotinción de las retinas, se detectó que los niveles de expresión de GFAP se encontraban disminuidos en las áreas trasplantadas comparados con las áreas no trasplantadas del mismo ojo y con los ojos inyectados con medio (figura R.13a). Además, se observó que la expresión de esta proteína en las áreas trasplantadas se limitaba solo a la capa de fibras del nervio óptico, la capa de células ganglionares y la capa plexiforme interna; mientras que en las áreas no trasplantadas y en los ojos inyectados con medio también se localizó en las capas nuclear interna y externa mostrando una gliosis más severa en las zonas no tratadas con la terapia celular.

Debido a la mutación en el gen *MERTK*, el EPR de la rata RCS es incapaz de ofrecer el soporte y la manutención que los fotorreceptores requieren. Por ello, en etapas muy tempranas del desarrollo posnatal de las crías RCS, los fotorreceptores son las primeras células de la retina que mueren por apoptosis.⁶¹ La pérdida de células fotorreceptoras en la rata RCS se inicia a los 21 días de vida y se trata de una pérdida progresiva, alcanzando una degeneración total de la capa de fotorreceptores hacia los 7 meses de vida.⁷³ Considerando lo anterior, se evaluaron los niveles de apoptosis de los fotorreceptores mediante el análisis de criosecciones de retina con la técnica de TUNEL, que permite detectar la fragmentación del ADN.

De forma remarcable, las áreas que recibieron el trasplante presentaban un menor número de fotorreceptores apoptóticos en comparación con las áreas localizadas lejos del trasplante y los ojos inyectados con medio (figura R.13b). De esta forma, se determinó que la terapia celular era capaz de enlentecer la muerte de los fotorreceptores y por tanto la degeneración de la retina.

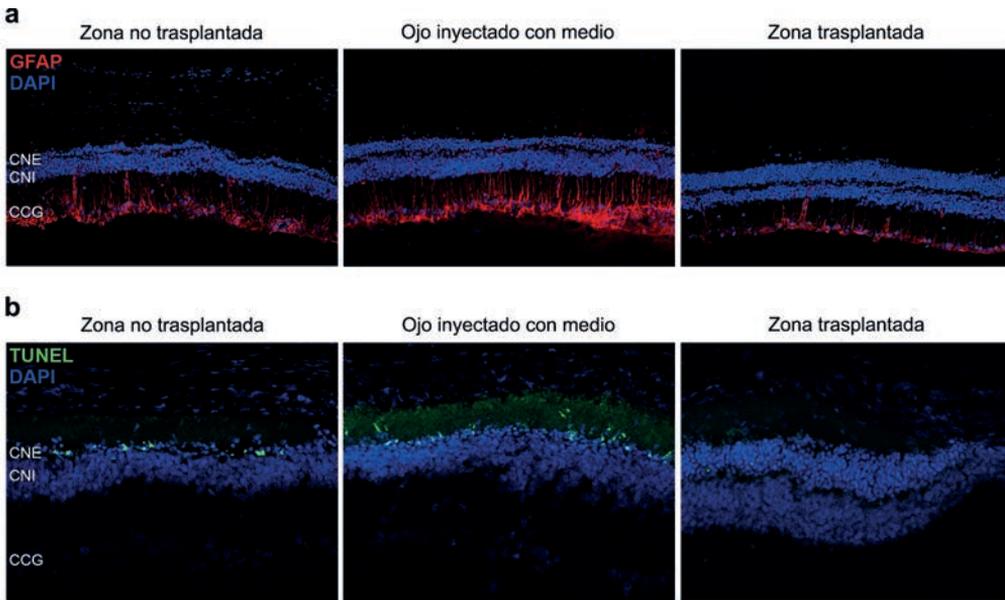


Figura R.13. Inmunofluorescencia donde se aprecia la reducción de gliosis y apoptosis de la retina murina gracias a las células humanas trasplantadas. (a) Gliosis reactiva reducida en las zonas de la retina cercanas al trasplante (derecha) en comparación con zonas alejadas del mismo (izquierda) o en ojos sin trasplante (centro). Para su estudio mediante inmunofluorescencia se utilizó un anticuerpo contra GFAP (rojo). (b) El análisis TUNEL (verde) muestra una reducción acusada del número de núcleos de fotorreceptores apoptóticos en las regiones trasplantadas con EPR (panel derecho). Todas las fotografías se obtuvieron usando la misma intensidad de rayo. (DAPI: tinción nuclear). CNE, capa nuclear externa; CNI, capa nuclear interna; CCG, capa de células ganglionares.

El efecto protector que el trasplante ejerció frente al estrés glial y a la muerte celular programada fue similar en ojos tratados con células derivadas de hESC y con células derivadas de hiPSC. Todos los ojos estudiados mostraron una mayor protección en las áreas trasplantadas.

R.1.7 Análisis ultraestructural del efecto de la terapia celular en la retina trasplantada

Después de 12 semanas de haberse aplicado la terapia celular, se compararon las áreas trasplantadas con las áreas de ojos sin trasplante bajo el microscopio óptico y el microscopio electrónico de transmisión (MET) con el fin de estudiar los posibles cambios producidos por la terapia a nivel ultraestructural.

Por una parte, se realizaron cortes semifinos que fueron teñidos con azul de metileno para ser examinados bajo microscopía óptica y, por otra parte, cortes ultrafinos que fueron teñidos con acetato de uranilo acuoso y citrato de plomo para ser examinados bajo MET.

A su vez, para poder comparar dichos cambios histológicos y ultraestructurales con un control sano, se incluyó también en el estudio un ojo de la cepa de rata salvaje Long-Evans, un control sin distrofia retiniana con aproximadamente 12 filas de núcleos celulares en su capa nuclear externa (CNE) invariables durante toda su vida⁷⁷ que contrasta con nuestro modelo que presenta 2-3 filas en la CNE.

Al examinar los cortes de los ojos inyectados con medio bajo el microscopio óptico, se observó una pérdida acusada del número de núcleos de los fotorreceptores y un engrosamiento de la capa de detritus formado por material de desecho membranoso no fagocitado originario de los SE de los conos y bastones (figura R.14a). En los análisis con MET se observaron alteraciones en la ultraestructura de la retina en comparación con la del control sano (rata salvaje Long-Evans) como la disminución del número de invaginaciones basales y un elevado número de espacios vacuolares que contenían organelas degeneradas unidas a membrana (figura R.14b, c y figura R15). No se observó ninguna alteración ultraestructural en de la membrana de Bruch en ninguno de los ojos estudiados.

Por otro lado, en las áreas que recibieron el trasplante celular se observó que el número de invaginaciones basales y la morfología celular se recuperaba parcialmente en el área adyacente a las células trasplantadas (figura R.14b, c). Además, hubo una mejoría en la distribución y organización de los discos de los SE. De igual forma, se detectó un número evidente de fagosomas llenos de membranas de los discos de los SE indicando así la recuperación, por lo menos parcial, de la función fagocítica del EPR. Estos datos son consistentes con los hallazgos sobre los niveles de autofluorescencia realizados en el apartado anterior. Dicho efecto no se observó en los ojos inyectados con medio (figura R.14d).

R.1.8 Impacto de la terapia celular en la preservación de las capas celulares de la retina

Para investigar el efecto del trasplante de células de EPR sobre la pérdida de células en cada capa de la retina y descartar la posible formación de tumores derivada del trasplante, se estudió la histología de las zonas tratadas y no tratadas a diferentes tiempos PI.

Uno de los inconvenientes que presenta el diagnóstico de la retinosis pigmentaria es que cuando se realiza, el proceso degenerativo de la retina ya se ha iniciado o incluso se puede encontrar en un

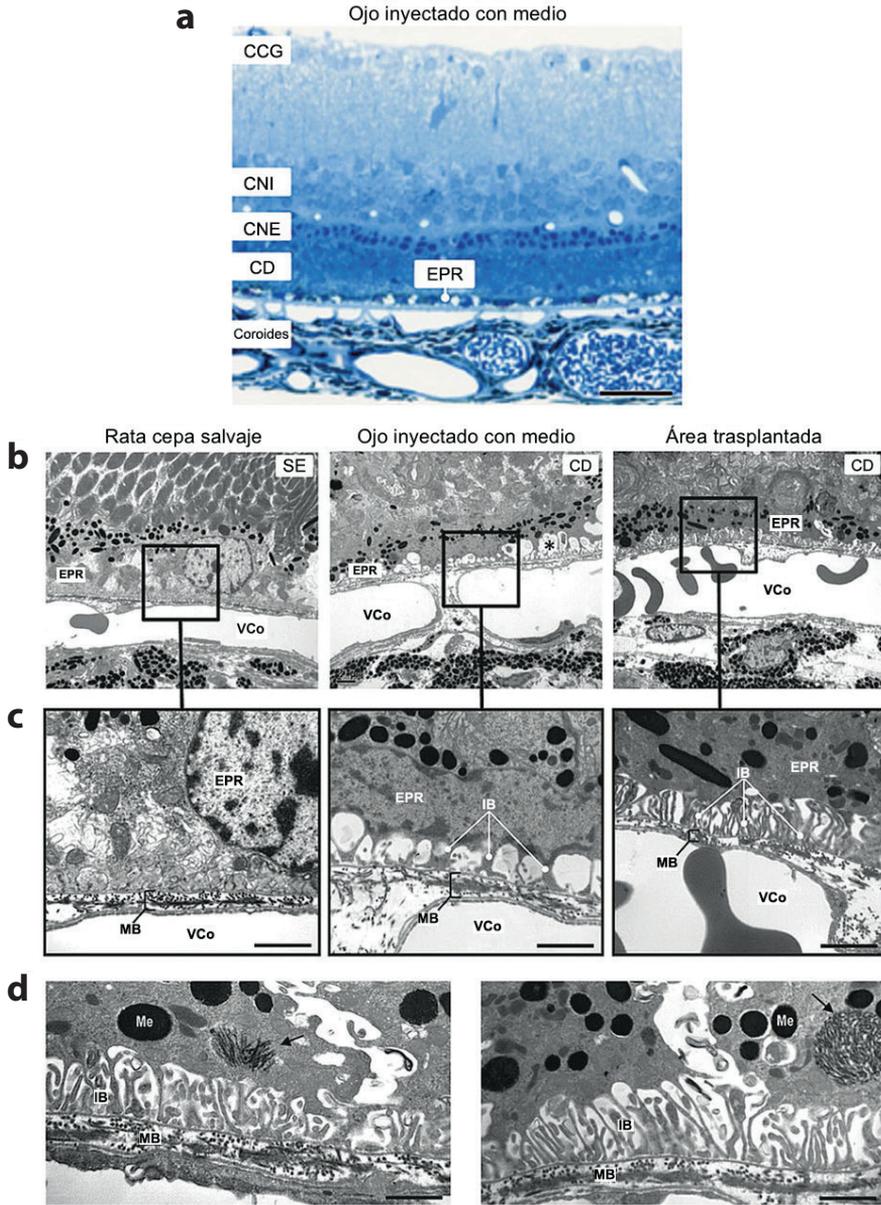


Figura R.14. Secciones de microscopía óptica y electrónica de transmisión de ojos de rata salvaje y ojos de rata RCS con y sin terapia celular. (a) Sección semifina teñida con azul de metileno que muestra un adelgazamiento de la CNE y un engrosamiento de la capa de detritus de los SE de los bastones sin fagocitar en una rata RCS inyectada con medio (barra: 27 μ m). (b,c) Disminución de las invaginaciones basales del EPR y presencia de espacios vacuolares (asterisco) apreciadas a nivel ultraestructural en los ojos inyectados con medio (paneles centrales) versus los ojos de rata salvaje (paneles de la izquierda). Este fenotipo degenerativo se observa parcialmente restaurado en los ojos de ratas RCS inyectadas con EPR (barra c: 1,2 μ m). (d) Autosomas (flechas) que contienen membranas de los discos de los SE en los ojos inyectados con EPR (barra: 0,97 μ m). IB, invaginaciones basales; MB, membrana de Bruch; VCo, vasos coroides; Me, melanosomas; CCG, capa de células ganglionares; CNI, capa nuclear interna; CNE, capa nuclear externa; CD, capa de detritus; EPR, epitelio pigmentario de la retina; SE, segmento externo.

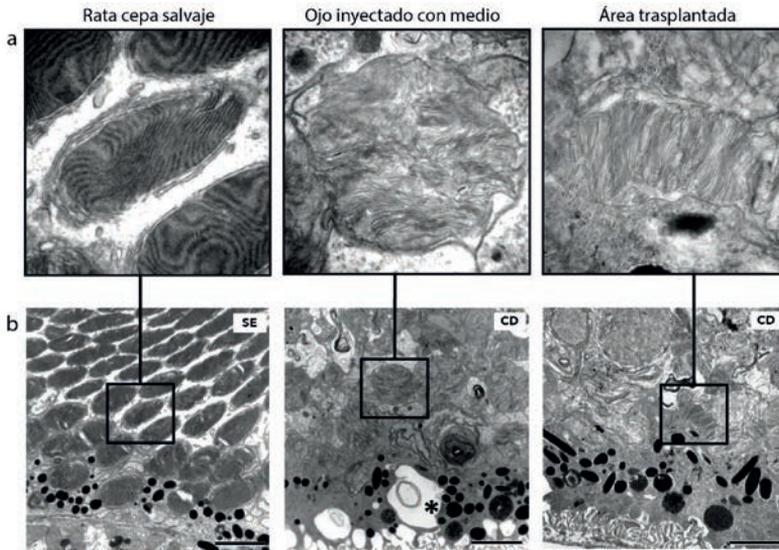


Figura R.15. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión representativas de los segmentos externos de cada área/grupo estudiados. (a) Imagen ampliada de los SE donde se muestra una restauración parcial de las membranas de los discos que componen dichos SE en las áreas trasplantadas de las ratas RCS (panel derecho) respecto a los ojos inyectados con medio (panel central). Se muestra también la imagen de los fotorreceptores en la cepa salvaje de rata (panel izquierdo) sin degeneración como patrón de comparación. (b) Imagen sin ampliar. El asterisco del panel central muestra un espacio vacuolar que contiene detritus unidos a membrana. Barras = 2,3 μm . Abreviaturas: SE, segmentos externos; CD, capa de detritus.

estado avanzado. Por esta razón, se decidió no solo testar el efecto terapéutico del trasplante celular en animales que aún poseen una retina sana (p21) sino que también se trasplantaron animales en un estadio más avanzado del proceso degenerativo. Para ello también se realizaron trasplantes a día posnatal 42 (p42). En esta fase tardía de la degeneración retiniana se ha perdido la mayoría de las filas de células fotorreceptoras (quedando solo de 2 a 4 filas), el espacio subretiniano es ocupado en su totalidad por una masa homogénea de desechos celulares que posteriormente es reemplazada por un entramado de tejido glial secundario a la proliferación de fibras de Müller. Finalmente se produce una fusión de dicho tejido al EPR.⁷³

R.1.8.1 Impacto de la terapia celular en retinas trasplantadas a día p21

Los fotorreceptores son las primeras células de la retina en mostrar signos de degeneración en este modelo animal⁷³ (figura R.13b). Por ello, se decidió cuantificar el número de filas de células

fotorreceptoras, así como el grosor de la capa de segmentos internos y externos (SI/SE) de retinas de animales con y sin trasplante. Se realizaron tinciones histológicas con hematoxilina y eosina, que permiten distinguir entre el núcleo y el citoplasma de las células y, por tanto, determinar el grosor de las capas de la retina y el número de células de cada una de ellas.

Las características histológicas de las áreas de la retina que recibieron el trasplante a los 21 días de vida del animal se examinaron después de 5, 8 y 12 semanas de la aplicación de la terapia. Se observó que las capas retinianas se hallaban mejor preservadas en las zonas trasplantadas que en las no trasplantadas. Además, el alcance de este efecto no se restringía únicamente a la zona física en la que se localizaba el trasplante, sino que se extendía más allá del área cubierta por el mismo (figura R.16a, b), y alcanzando aproximadamente un tercio de la superficie total de la retina (datos no mostrados). Particularmente, las áreas de la retina con trasplante presentaron un grosor de la capa de SI/SE mayor que el hallado en las áreas de retinas no tratadas o inyectadas con medio de cultivo celular. Estos hallazgos se observaron en los dos tipos celulares inyectados y en los tres tiempos posinyección evaluados.

A pesar de la progresión de la degeneración, las áreas trasplantadas se mantuvieron preservadas de forma similar a lo largo del estudio, mostrando aproximadamente un 30-40 % de conservación del grosor de las capas tanto en la semana 5 PI como en la 8 y en la 12 (figura R.16c).

De acuerdo con estos hallazgos, también se determinó que el número de filas de la capa nuclear externa (CNE) se conservaba más en las zonas tratadas y hasta la semana 12 PI. Las áreas trasplantadas presentaron hasta un 70 % más de preservación en comparación con las zonas no trasplantadas. Particularmente, después de cinco semanas de haber realizado el trasplante, una media de diez filas de núcleos de fotorreceptores se mantenía preservadas en las zonas tratadas versus una media de solo tres filas observadas en las zonas no trasplantadas o inyectadas con medio de cultivo celular. Estos resultados fueron observados en trasplantes de EPR derivado tanto de hESC como de hiPSC y en los tres tiempos posinyección analizados.

Este efecto celular permaneció estable hasta la semana 8 PI, ya que no se observaron mayores cambios en el número de filas nucleares de la CNE respecto a la semana 5 PI. Sin embargo, a partir de la semana 12 PI se hizo evidente la disminución del número de filas

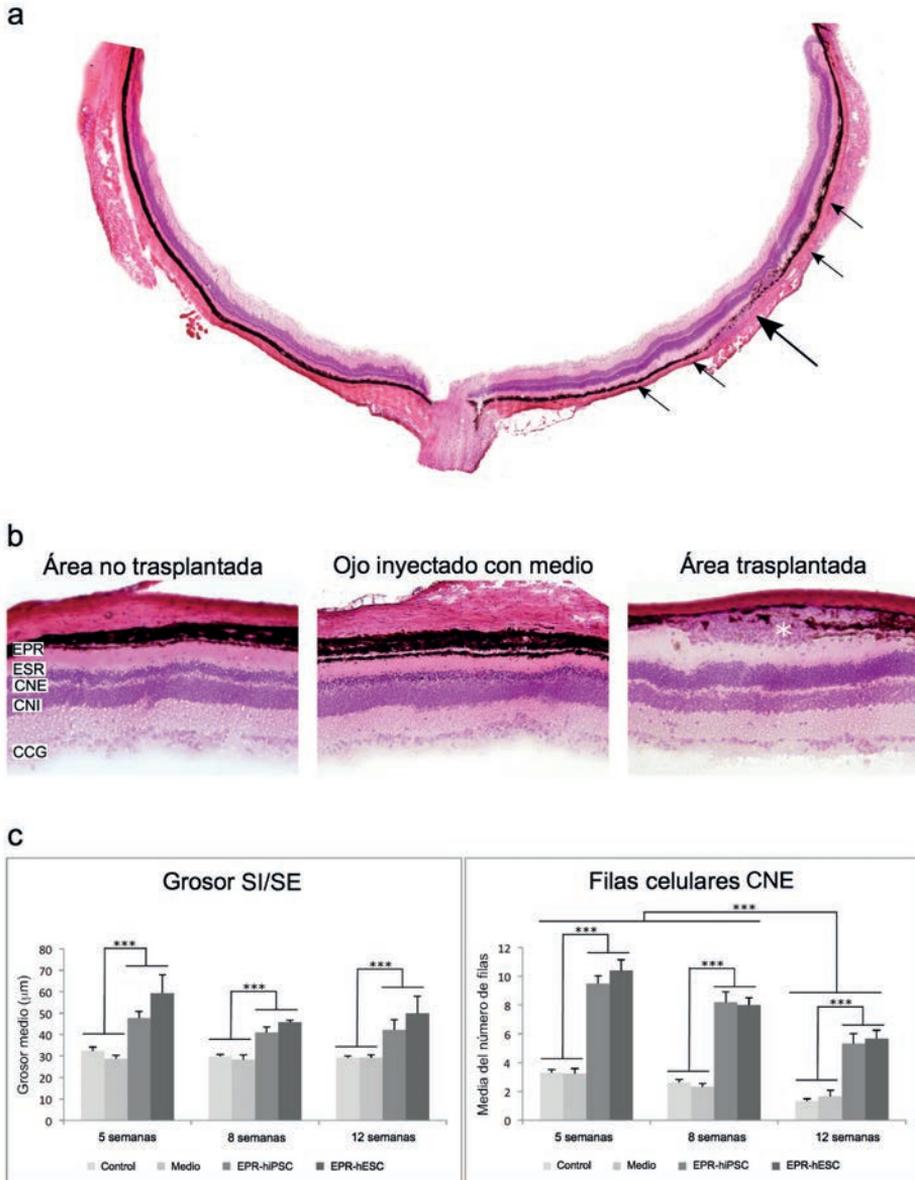


Figura R.16. Estudio histológico de las retinas trasplantadas a p21. (a) Imágenes de microsecciones teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) que muestran la preservación de las capas en proximidad al área del trasplante de EPR (flechas) comparado con capas delgadas distantes al trasplante. (b) En la magnificación se muestra la preservación de las capas retinianas próximas al trasplante (asterisco) (barra: 100 µm). (c) Se observa un mayor grosor de la capa de SI/SE, así como un incremento del número de filas celulares de la CNE en las áreas trasplantadas comparado con las áreas distantes al trasplante o con los ojos inyectados con medio más allá de la semana 12 PI. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grosores de las capas de los ojos inyectados con hiPSC (n=8) o hESC (n=5). Datos presentados como media ± SEM, ***p < 0,0001. EPR, epitelio pigmentario de la retina; ESR, espacio subretiniano; CNE, capa nuclear externa; CNI, capa nuclear interna; CCG, capa de células ganglionares; SI, segmento interno; SE, segmento externo.

nucleares de la CNE, pasando de una media de diez a una media de cinco filas. A pesar de esta disminución, en las áreas tratadas se mantuvo un número mayor de filas nucleares en comparación con las áreas no tratadas o en los ojos inyectados con medio, donde se observó una única fila de núcleos discontinuos (figura R.16c).

No se encontraron diferencias significativas en cuanto al grosor de la capa de SI/SE o al número de filas de núcleos de la CNE entre los ojos inyectados con células derivadas de hESC y de hiPSC.

Cabe resaltar que en las áreas inyectadas con EPR de los animales inyectados a p21 se pudieron delinear con precisión las tres capas nucleares (nuclear externa, nuclear interna y de células ganglionares) y las dos capas plexiformes (interna y externa) hasta la semana 12 PI. En contraposición, en las áreas no trasplantadas y en los ojos inyectados solo con medio se observó un solapamiento de las capas nucleares interna y externa a partir de la semana 8 PI (figura R.17a, b).

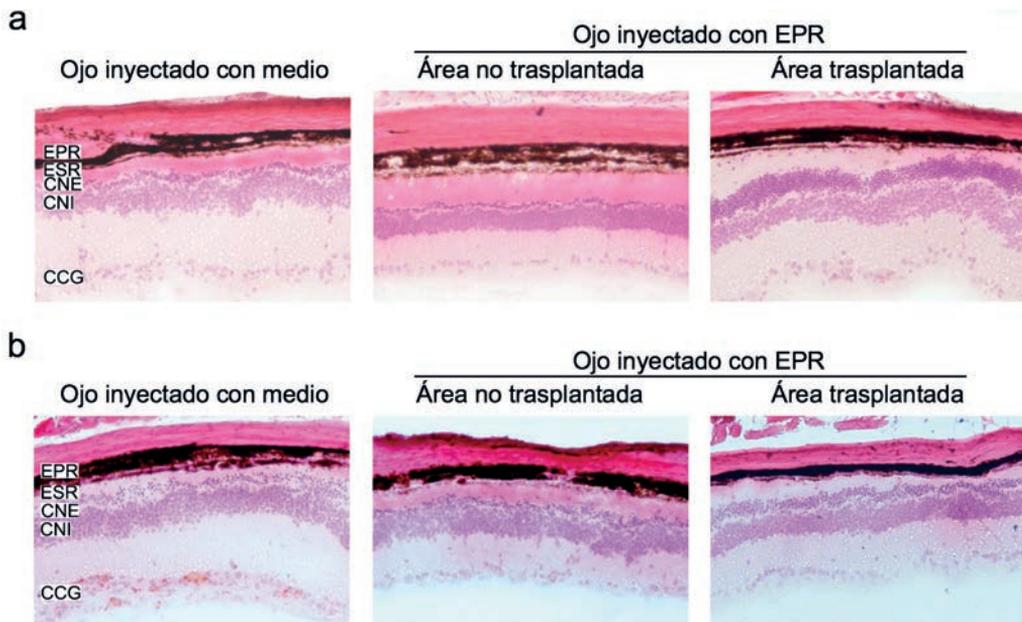


Figura R.17. Cortes histológicas de copas oculares de animales inyectados a p21 teñidos con hematoxilina y eosina (H&E). La neurorretina mantiene su organización multicapa hasta la 12 semana PI en las áreas trasplantadas de los animales a p21, mientras que la CNE y la CNI se superponen en las áreas no trasplantadas y en los ojos inyectados con medio, ambos a las 8 semanas (a) y a las 12 semanas (b) PI. EPR, epitelio pigmentario de la retina; ESR, espacio subretiniano; CNE, capa nuclear externa; CNI, capa nuclear interna; CCG, capa de células ganglionares.

R.1.8.2 Impacto de la terapia celular en retinas trasplantadas a día p42

Con la tentativa de valorar los posibles beneficios de la terapia celular aplicada en estadios avanzados de degeneración retiniana se inyectaron también ratas a día p42 de vida. Realizando la misma valoración histológica desarrollada en el apartado anterior, se estudiaron las retinas 5 semanas después de la inyección. No obstante, en este caso no se percibieron diferencias significativas en el grosor de la capa de SI/SE entre los grupos, pero sí que se observó un cierto grado de preservación de las filas de la CNE en las áreas trasplantadas tanto con EPR derivado de hESC como de hiPSC. Más de cuatro filas se mantuvieron en los ojos trasplantados versus una única fila observada en las áreas no trasplantadas o en los ojos inyectados con medio (figura R.18a, b). Aún y así, el efecto terapéutico del trasplante celular no alcanzó el mismo grado de enlentecimiento del proceso degenerativo que el observado con el trasplante efectuado a p21.

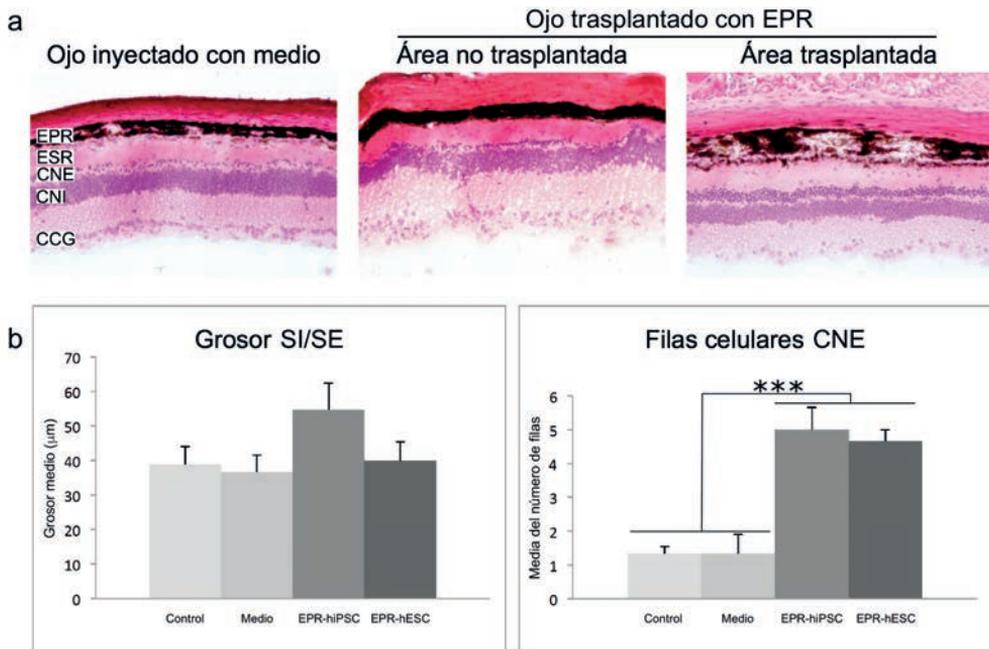


Figura R.18. Análisis histológico con tinción de hematoxilina y eosina (H&E) de las retinas de los animales inyectados a p42 que demuestran la preservación de las filas de la CNE. (a) Las filas celulares de la CNE están preservadas cuando las células humanas del EPR son trasplantadas a estadios tardíos de la enfermedad (p42), mientras que el grosor de la línea SI/SE no muestra diferencias entre las zonas trasplantadas y las no trasplantadas (b). Los datos son presentados como media \pm SEM, ***p < 0,0001. Barra= 100 μm . EPR, epitelio pigmentario de la retina; ESR, espacio subretiniano; CNE, capa nuclear externa; CNI, capa nuclear interna; CCG, capa de células ganglionares. SI/SE, segmentos internos/segmentos externos.

Se puede concluir entonces que esta terapia es más eficaz en procesos precoces de degeneración retiniana donde hay más tejido sano que degenerado sobre el cual la terapia celular puede tener más capacidad de frenar parcialmente la degeneración, porque hay menos alteraciones estructurales y funcionales, y ejercer algún efecto citoprotector. Asimismo, se ha demostrado que es una terapia segura, ya que durante todo el estudio histológico e *in vivo* no se observó ningún caso de formación tumoral.

R.1.9 Evaluación de la actividad electrorretinográfica de las ratas RCS con y sin terapia celular con EPR derivado de hPSC

La función visual consiste en la capacidad de la retina para convertir la información recibida del espectro visible en señales inteligibles para el sistema nervioso central. Esta capacidad está determinada por procesos de fototransducción en los fotorreceptores y sinapsis entre el resto de neuronas de la vía visual que terminan en la generación de un potencial eléctrico que será conducido hasta el cerebro para ser traducido en una imagen.

El electrorretinograma (ERG) es una técnica no invasiva que registra el potencial eléctrico generado por los cambios de los potenciales extracelulares de las neuronas de la retina en respuesta a los cambios de iluminación.² La señal resultante se interpreta en términos de amplitud de voltaje y duración. Existen diversos tipos de electrorretinograma según el tipo de estímulo. Dentro de los principales se destacan el Ganzfeld o campo lleno (respuesta generada por las células de toda la retina), el focal (respuesta generada por las células del área estimulada específicamente), el multifocal (registro realizado simultáneamente de varias localizaciones retinianas durante una sola sesión utilizando técnicas de correlación cruzada) y el *pattern* (respuesta generada frente a un estímulo estructurado como por ejemplo una rejilla en blanco y negro o en damero).

Para evaluar el posible efecto del trasplante de EPR humano sobre la función visual de las ratas RCS se llevaron a cabo electrorretinogramas focales en condiciones escotópicas y con distintas intensidades de estimulación lumínica. Utilizamos este tipo de ERG ya que permite comparar dos regiones diferentes dentro de la misma retina y teniendo localizado el trasplante se puede valorar la función visual en la región trasplantada versus una región alejada del tras-

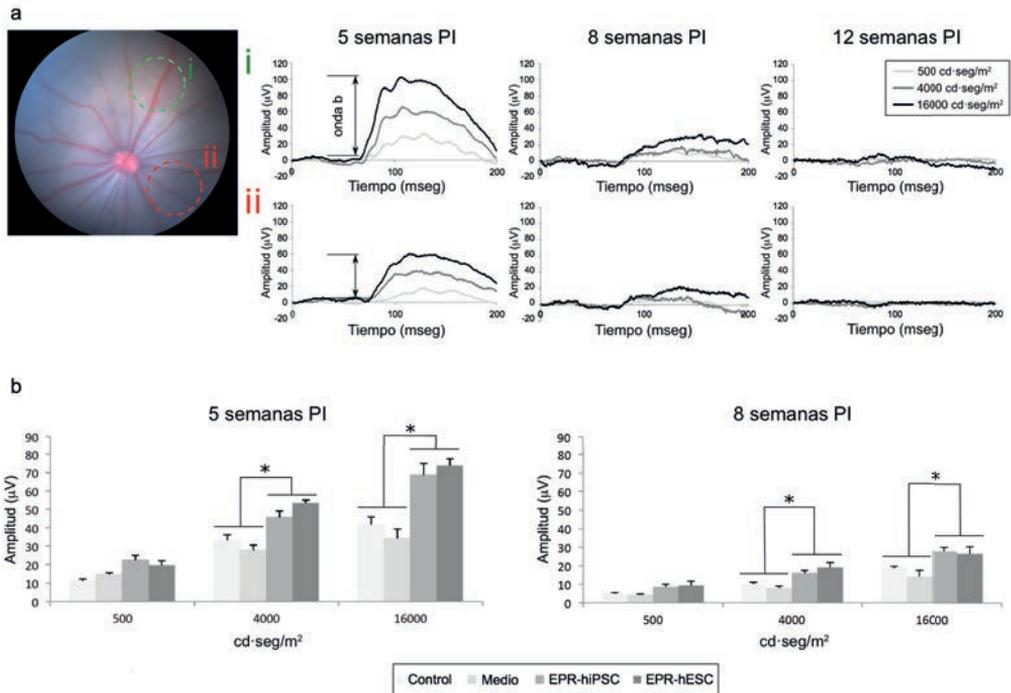


Figura R.19. Conservación de la función visual en las áreas con y sin trasplante. (a) Se muestra una imagen fundoscópica de una rata RCS inyectada con EPR y su respuesta electroretinográfica como un ejemplo representativo. El ERG focal se usó para evaluar el rescate funcional de las células trasplantadas a 5, 8 y 12 semanas PI. Para cada ojo trasplantado se utilizaron tres intensidades de luz diferentes (500, 4000 y 16000 cd·seg/m²) para medir la actividad eléctrica, que fue registrada sobre dos puntos distintos en cada ojo: uno sobre el área trasplantada (i, círculo verde) y otro sobre una zona alejada del trasplante, el área no trasplantada (ii, círculo rojo). (b) Las áreas trasplantadas mostraron amplitudes de onda *b* significativamente mayores que las no trasplantadas o los ojos inyectados con medio cuando fueron estimuladas con 4000 y 16000 cd·seg/m². Se obtuvieron amplitudes mayores de la onda *b* se obtuvieron en las zonas trasplantadas después de 5 (n=9) y 9 (n=7) semanas PI, mientras que después de las 12 semanas PI no se detectaron diferencias significativas. A las 8 semanas PI, la amplitud de la onda *b* se observó claramente atenuada pero aún se consiguió detectar un cierto grado de preservación de la función visual. No se observaron diferencias entre los ojos inyectados con hESC y con hiPSC. Los datos se presentan como media ± SEM, *p < 0,01.

plante siendo esta última el mejor control posible, ya que se trata del mismo ojo.

Los resultados de los ERG se clasificaron y analizaron teniendo en cuenta (i) el estadio de degeneración retiniana (animales inyectados a p21 en los que la degeneración aún no se ha iniciado, o animales inyectados a p42 en los que la degeneración es avanzada), (ii) el momento del trasplante (5, 8 o 12 semanas PI) y (iii) el tipo de material inyectado (EPR derivado de hESC o de hiPSC o medio de cultivo celular o ausencia de inyección en zonas no trasplantadas).

El estudio de animales inyectados a p21 reveló que, a las 5 semanas PI, la función visual se perdía más lentamente en los animales inyectados con la terapia celular que en los animales inyectados con medio de cultivo celular o en comparación con las áreas no inyectadas (figura R.19). Las ratas inyectadas con EPR derivado de células embrionarias y pluripotentes inducidas que fueron estimuladas con 500, 4000 y 16000 cd·seg/m² (candelas por segundo y metro cuadrado). El registro de la respuesta visual causada por las intensidades de luz más altas demostró una amplitud media de la onda *b* mayor en las regiones inyectadas que en las regiones no trasplantadas y en los ojos inyectados con medio. Esta diferencia fue aproximadamente un 40 % más elevada a 4000 cd·seg/m², y un 46 % más elevada a 16000 cd·seg/m².

A partir de la octava semana PI, las ondas *b* del registro electroretinográfico disminuyeron drásticamente. A pesar de ello, continuaron mostrando una respuesta visual significativamente mayor en las áreas trasplantadas versus las áreas no trasplantadas. Sin embargo, a las 12 semanas PI las ondas *b* fueron indetectables en los tres grupos de estudio.

En los animales inyectados a p42 no se registró ninguna respuesta visual a la semana 5 PI ni en las zonas trasplantadas ni en las no trasplantadas ni en los ojos inyectados con medio.

R.1.10 Inmunosupresión de las ratas RCS con ciclosporina A

Una de las desventajas inherentes a las terapias con trasplante heterólogo es el posible rechazo del material trasplantado por parte del sistema inmunitario del receptor. Para minimizar este riesgo en los estudios llevados a cabo en el modelo de rata RCS, se decidió inmunosuprimir a los animales con una dosis diaria de ciclosporina A (CsA).

La CsA es un inmunosupresor ampliamente utilizado en humanos que reciben un trasplante de órganos. Este fármaco reduce la capacidad del sistema inmune inhibiendo competitivamente la calcineurina lo que conduce a la disminución de la transcripción de genes de citoquinas implicadas en la respuesta inmune temprana como la interleucina 2 y 4, el factor de necrosis tumoral alfa y el interferón gamma. El resultado final es la inhibición de la activación de los linfocitos T, así como la inhibición de la respuesta inmune dependiente de estas mismas células.

La sucralosa es un edulcorante 600 veces más dulce que el azúcar, sin contenido calórico, utilizado para endulzar productos de bajas calorías y alimentos procesados. Es un compuesto que está aprobado desde 1998 por la agencia americana de alimentos y medicamentos (FDA, siglas en inglés de Food and Drug Administration) y desde 2004 por la Agencia Europea de Medicamentos (EMEA).

Con el objetivo de evitar un posible rechazo del trasplante celular, las ratas fueron inmunosuprimidas con una mezcla de CsA (21 mg/kg/día) y de sucralosa para mejorar el sabor y asegurar el consumo por parte de los animales. El tratamiento con CsA se inició dos días antes de que los animales recibieran el trasplante subretiniano de células y se mantuvo durante todo el experimento hasta su eutanasia. Cada dos semanas desde el inicio de la inmunosupresión, se realizó un conteaje completo de células hematológicas de la línea blanca en sangre periférica para verificar dicho estado de inmunosupresión.

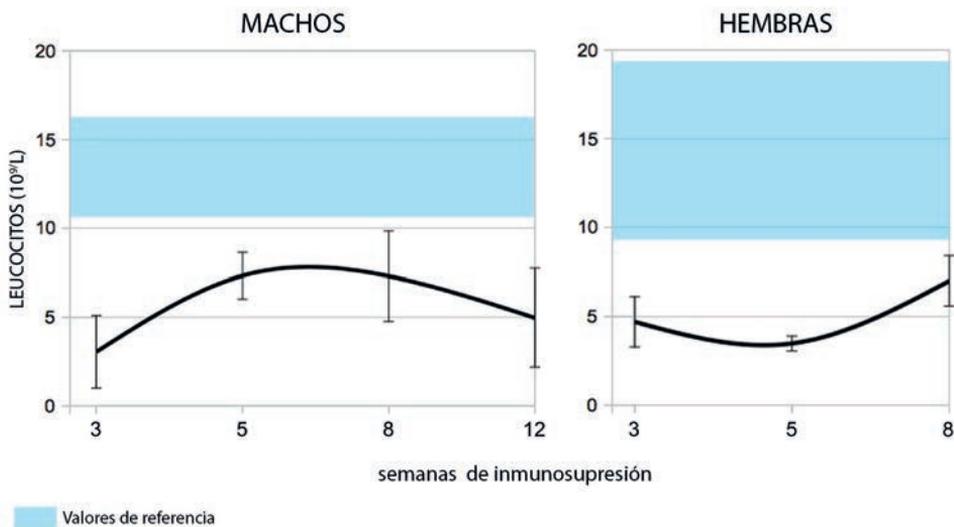


Figura R.20. Recuento de leucocitos en sangre periférica en ratas RCS tratadas con ciclosporina A como un indicador del grado de inmunosupresión. Los datos están presentados en dos gráficas según el sexo del animal, ya que los valores de referencia divergen entre machos y hembras. Los animales fueron inmunosuprimidos con ciclosporina A durante 12 semanas y las muestras sanguíneas fueron analizadas para cada grupo animal ($n = 2-6$ por grupo) en función del sexo y del momento del tratamiento inmunosupresor. Durante la duración completa del tratamiento ninguno de los valores de leucocitos fue observado dentro del rango de valores de referencia en las ratas menores de 16 semanas de edad, sino por debajo del mismo. Los datos están presentados como media \pm DS.

Todos los animales fueron exitosamente inmunosuprimidos independientemente del período de tratamiento, demostrado así por los niveles de leucocitos por debajo del rango de valores de referencia sin mayores alteraciones en el resto de parámetros hematológicos (figura R.20).

R.2

Resultados

Terapia celular combinada con células de EPR y CPF para el tratamiento de distrofias de retina

R.2.1 Diferenciación y caracterización de hPSC a células precursoras de fotorreceptores

R.2.1.1 Diferenciación de hPSC a células precursoras de fotorreceptores

Para estudiar el posible efecto terapéutico de la terapia celular combinada con células de EPR y células precursoras de fotorreceptores (CPF) en el modelo animal de degeneración de retina de la rata RCS, se eligió una fuente de células madre humanas a partir de la cual se logró diferenciar CPF para trasplantarlas junto con las células de EPR obtenidas en la primera parte del estudio.

Las líneas de hPSC a partir de las cuales se obtuvieron las CPF fueron las mismas utilizadas para la diferenciación de células EPR. Como línea de hiPSC se seleccionó la CBiPSC30-4F-5 P y como línea de hESC la ES4, ambas de disposición pública en el banco de líneas celulares del Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona.

La diferenciación a CPF se realizó a partir de la adaptación de los trabajos descritos por Yanai *et al.*,⁶⁹ y Tucker *et al.*,⁷⁰ (figura R.21). La línea celular elegida fue cultivada en discos de matrigel en medio comercial mTeSR™ hasta obtener una confluencia del 70% para generar cuerpos embrionarios en placas de baja adherencia.

Los cuerpos embrionarios se mantuvieron en un medio de diferenciación a retina durante cuatro días y posteriormente se seleccionaron dichos cuerpos embrionarios mediante filtración. Este protocolo describe una eficiencia superior para la generación de célu-

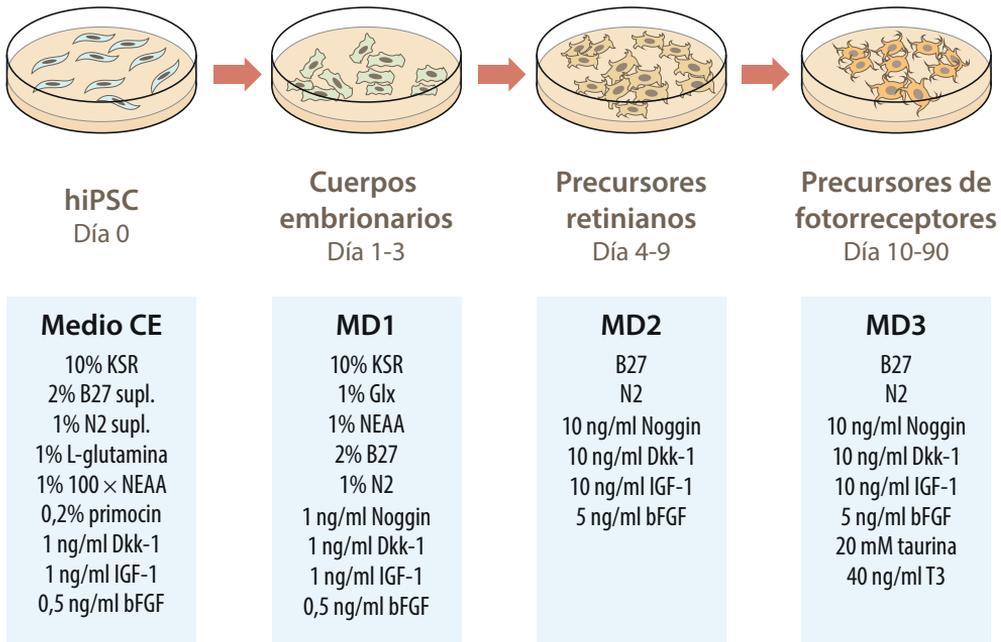


Figura R.21. Protocolo de diferenciación simplificado de precursoras de fotorreceptores a partir de hiPSC. Las células precursoras de fotorreceptores fueron diferenciadas a partir de la línea hiPSC CB30-4F-5. hiPSC, células madre pluripotenciales humanas inducidas; CE, cuerpos embrionarios; MD, medio de diferenciación. Para más detalles sobre el proceso de diferenciación consultar el apartado M.2.

las positivas para CRX (marcador específico del linaje de células fotorreceptoras). Los cuerpos embrionarios seleccionados se colocaron en cultivo adherente con BD matrigel. A día 16 del proceso de diferenciación se añadió al medio taurina y hormona T3 para inducir la diferenciación de fotorreceptores y continuar con el proceso de cultivo hasta los días 21, 41 o 90 según el protocolo experimental establecido para llevar a cabo este estudio.

Durante el proceso de diferenciación celular se evaluó diariamente la morfología de las células mediante su observación con microscopía óptica.

Una vez obtenidas las CPF, se estudiaron las células en distintos momentos del protocolo de diferenciación *in vitro* en función del momento escogido de diferenciación para inyectar las células en el espacio subretiniano de la rata RCS. Las células precursoras de fotorreceptores con una menor diferenciación conservan aún cierto grado de plasticidad, con lo que se espera una mayor tasa de integración en la retina huésped de aquellas células con menos días de diferenciación *in vitro* en comparación con las células que hayan sido diferenciadas *in vitro* durante más tiempo.⁷⁸

Por ello en primer lugar, se obtuvieron CPF diferenciadas durante 41 días, y en segundo lugar se obtuvieron CPF en un estadio más temprano de madurez, diferenciadas durante 21 días.

Por otra parte, y de forma paralela, se continuó el protocolo de diferenciación *in vitro* de células madre a fotorreceptores maduros durante 90 días para determinar si el grado de madurez logrado en este período de tres meses impediría a los fotorreceptores maduros integrarse correctamente en la retina huésped.

Por último, también se creó una línea de CPF que expresaba proteína verde fluorescente (GFP) para inyectar en un grupo de ratas control para facilitar su detección.

R.2.1.2 Caracterización de las células precursoras de fotorreceptores obtenidas a partir de hPSC

Una vez diferenciadas las CPF, se estudió la presencia de diversos marcadores de diferenciación retinianos. Mediante técnicas de inmunocitoquímica efectuadas a días 20, 40 y 90 se constató la expresión de los marcadores NRL (factor de transcripción de fotorreceptores, bastones), PAX6 (marcador de tejido neural), CRX (marcador de progenitores de los fotorreceptores) y Rodopsina (marcador de pigmento presente en fotorreceptores maduros).

Los resultados del día 20 concluyeron que ya no había expresión del marcador de pluripotencia OCT4, o lo que es lo mismo, que las células habían perdido capacidad de pluripotencia y habían entrado en proceso de diferenciación. Al mismo tiempo, aumentaba la expresión de PAX6, una proteína clave en el desarrollo de tejidos neurales y específicamente del tejido neural del ojo.

También se detectó la expresión de OTX2 (solo a día 40) y de CHX10 (a partir del día 20), factores de transcripción específicos de la retina. Igualmente se detectaron células que expresaban NRL, un regulador del desarrollo de los fotorreceptores y en un porcentaje menor se encontraron grupos de células que ya comenzaban a expresar CRX, un factor de transcripción específico de fotorreceptores, esencial para el mantenimiento normal de conos y bastones. El porcentaje de células que expresaban CRX aumentó significativamente a partir del 40 de diferenciación.

Por otro lado, la caracterización de las células diferenciadas durante 90 días determinó la expresión marcada de los marcadores de la neurorretina como OTX2 y CHX10, y específicos de fotorreceptores como CRX y recoverina (figura R.22).

De la misma forma se realizó un análisis de la expresión génica mediante PCRc en tiempo real a día 20 y 41, de los marcadores *RHO*,

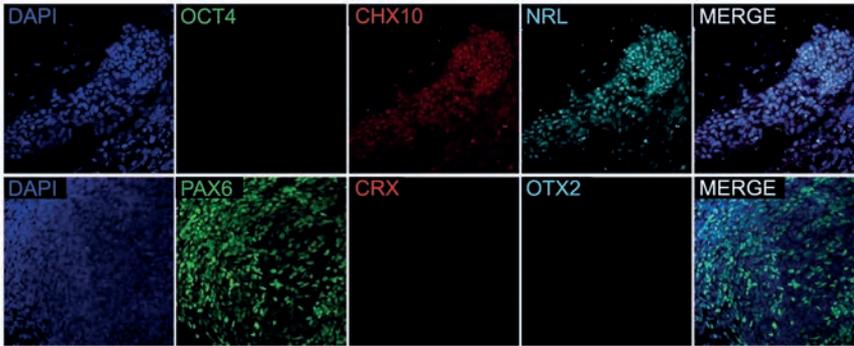
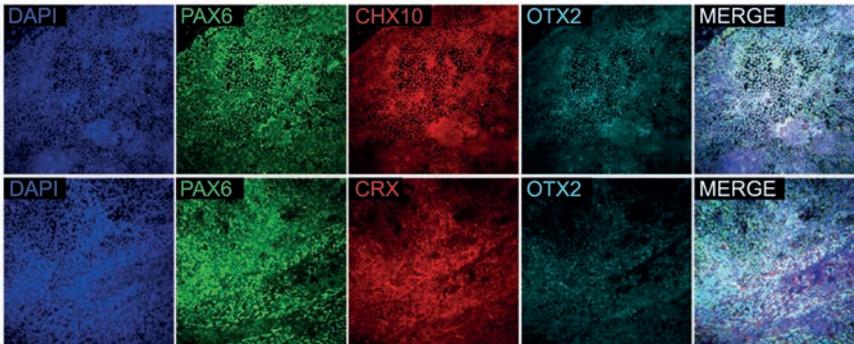
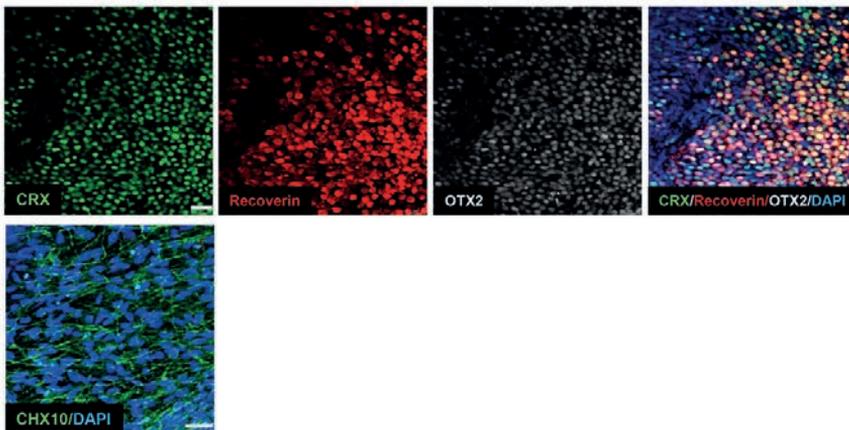
Día 20**Día 40****Día 90**

Figura R.22. Expresión de marcadores de pluripotencia y diferenciación a linaje neural y fotorreceptores. Imágenes de fluorescencia obtenidas mediante microscopía confocal, resultado de técnicas de inmunocitoquímica sobre las CPF diferenciadas. Confirmación de la presencia de marcadores de tejido neural (PAX6, OTX2, CHX10) y de factores de transcripción específicos de fotorreceptores (CRX, NRL) que se detectan a partir del día 40 de diferenciación y cuya expresión se acentúa a día 90, junto con la detección de la expresión de recoverina. (DAPI: tinción nuclear).

NRL, CRX, Recoverina, Opsina, RX, PAX6, GAPDH, CRALBP, OCT3/4 y MITF.

En ninguno de los estadios de diferenciación las CPF expresaron los marcadores de pluripotencia OCT4 y Nanog y sí los genes específicos de la línea neural de retina PAX6, OTX2, NRL, CHX10 y los específicos de fotorreceptores CRX, recoverina y opsina.

Cabe destacar que a día 41, la expresión de los genes CHX10, CRX, Recoverina, MITF, RX, Opsina y Rodopsina aumentó con respecto a las expresiones registradas a día 21 (figura R.23).

De forma similar a lo observado después de 40 días de diferenciación, a los 90 días de diferenciación las células mantuvieron los niveles nulos de expresión de los marcadores de pluripotencia OCT4 y Nanog y continuaron expresando los genes específicos de

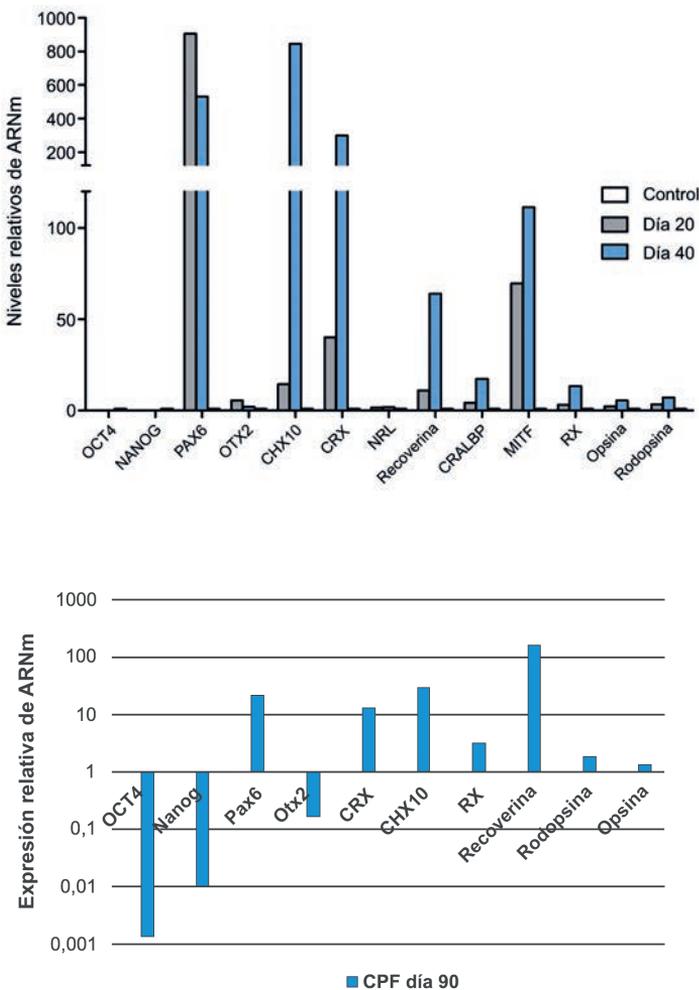


Figura R.23. Niveles de ARN mensajero (ARNm) de diversos genes relacionados con los procesos de proliferación y diferenciación a fotorreceptores en dos puntos temporales del protocolo de diferenciación (día 20 y 40). Las CPF generadas no poseen el perfil de célula madre al no expresar los marcadores de pluripotencia OCT4 y NANOG. De forma paralela se comprueba su especificidad neural de retina (expresión muy marcada de PAX6/OTX2/CHX10/CRX) y su diferenciación a fotorreceptores (aumento progresivo de RX, Opsina y Rodopsina del día 20 versus día 40).

Figura R.24. Niveles de ARN mensajero de los genes expresados en las CPF a 90 días de diferenciación. Datos expresados en escala logarítmica base 10. ARNm, ARN mensajero; CPF, células precursoras de fotorreceptores.

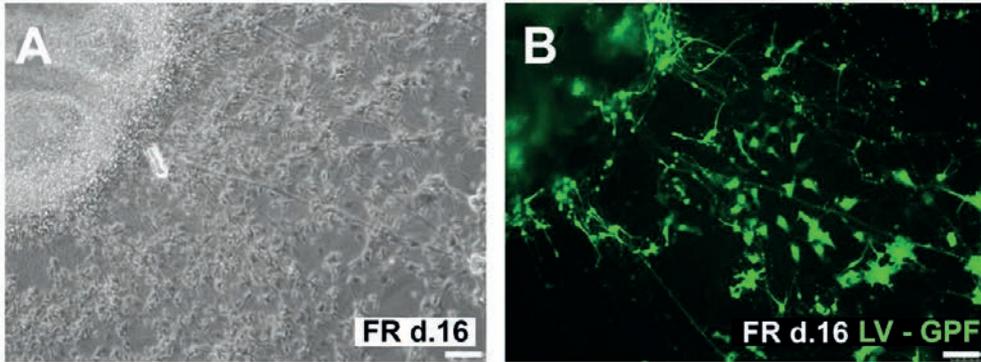


Figura R.25. Identificación de células precursoras de fotorreceptores mediante la observación de GFP. (A) Imágenes obtenidas con microscopía de contraste de fases donde se observan el cultivo celular de las CPF a día 16 de diferenciación formando rosetas neurales. (B) Imágenes de fluorescencia de las CPF expresando la proteína verde fluorescente. FR, fotorreceptores; LV-GFP, lentivirus-proteína verde fluorescente. Barra: 100 µm.

la línea neural de retina PAX6, OTX2, NRL, CHX10, así como los específicos de fotorreceptores, particularmente CRX y recoverina (figura R.24).

Uno de los factores limitantes a la hora de analizar las células precursoras de fotorreceptores (CPF) inyectadas en la retina de las ratas es localizar estas células por técnicas de inmunotinción en secciones de tejido previamente fijado. Para facilitar la detección y estudio de las células humanas fotorreceptoras en la retina de rata, se les integró el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control del promotor EF1 en el genoma de las CPF mediante el uso de lentivirus. De esta forma, se pudieron detectar las células trasplantadas en los análisis histológicos *post mortem* sin necesidad de utilizar anticuerpos específicos (figura R.25).

R.2.2 Trasplante combinado de células derivadas a EPR y a precursores de fotorreceptores a partir de hiPSC y hESC en el modelo de rata RCS

Después de evaluar el efecto terapéutico de la terapia celular con EPR derivado de células madre humanas (hPSC) en la retina del modelo animal de retinosis pigmentaria (rata RCS), se estudió la supervivencia e integración de las CPF obtenidas a partir de células madre humanas (hiPSC y hESC) siendo trasplantadas conjuntamente con células de EPR derivadas de hPSC y su capacidad

Tabla R.2 Grupos experimentales de animales trasplantados. Para cada grupo se muestra el número de ojos según el tipo celular trasplantado (EPR o EPR + CPF) y su origen (hESC o hiPSC) para el experimento 1 (CPF a 41 días de diferenciación + EPR) y para el experimento 2 (CPF a 21 días de diferenciación + EPR). Al pie de cada tabla se especifica el número de ojos inyectados con medio. Ambos grupos fueron inyectados a los 21 días de vida del animal (p21).

Ojos inyectados con células derivadas del experimento 1: CPF a 43 días de diferenciación + EPR			Ojos inyectados con células derivadas del experimento 2: CPF a 21 días de diferenciación + EPR		
Tipo celular	Origen		Tipo celular	Origen	
	hiPSC	hESC		hiPSC	hESC
EPR	10	12	EPR	9	0
EPR + CPF	26	25	EPR + CPF	49	0

Ojos inyectados con medio: 21

Ojos inyectados con medio: 6

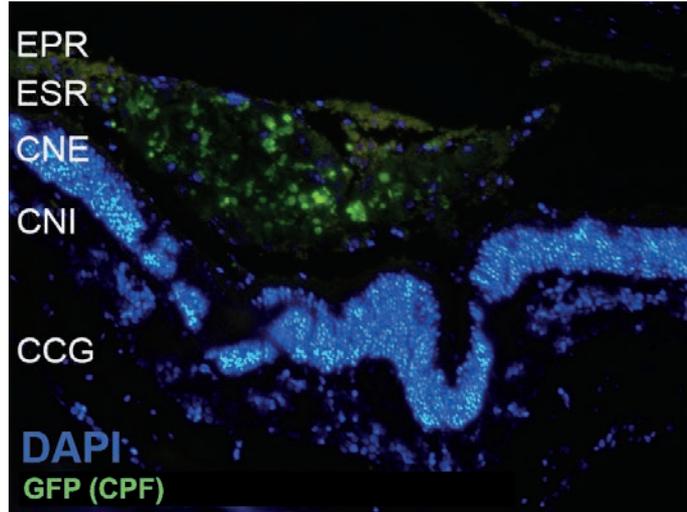
de enlentecer la degeneración retiniana. Para realizar el trasplante combinado se siguió la misma técnica quirúrgica que para el trasplante único de EPR, detallado en la sección M.4.

Se realizaron dos experimentos independientes, cada uno de ellos con tres grupos de animales. Para el experimento 1, al primer grupo se le realizó un cotrasplante de CPF a 43 días de diferenciación y de EPR, al segundo grupo se le realizó el trasplante con solo EPR y al tercer grupo no se le realizó trasplante, pero se le inyectó con medio de cultivo celular (grupo control).

Para el experimento 2, al primer grupo se le realizó un cotrasplante de CPF a 21 días de diferenciación y de EPR, al segundo grupo se le realizó el trasplante con solo EPR y al tercer grupo no se le realizó trasplante, pero se inyectó con medio de cultivo celular (grupo control).

Las ratas RCS de los dos experimentos se cotrasplantaron al día 21 de vida (p21), cuando los primeros cambios morfológicos degenerativos se observan en la retina. En la tabla R.2 se indican el número de ojos trasplantados de acuerdo al tipo celular (hiPSC o hESC) u otro material inyectado (medio).

Figura R.26. Presencia de CPF en el espacio subretiniano de la retina de la rata RCS dos semanas después del trasplante. Tinción con DAPI de un corte histológico de una retina trasplantada con EPR y CPF que expresaban GFP. (DAPI: tinción nuclear). EPR, epitelio pigmentario de la retina; ESR, espacio subretiniano; CNE, capa nuclear externa; CNI, capa nuclear interna; CCG, capa de células ganglionares; GFP, proteína verde fluorescente; CPF, células precursoras de fotorreceptores.



Las células obtenidas a partir del experimento 1 se diferenciaron *in vitro* durante 43 días. Los resultados expuestos en los siguientes apartados corresponden a las fases *in vivo* y *post mortem* del trasplante de las células provenientes del experimento 1.

Para realizar el experimento 2 las células se diferenciaron durante 21 días. Desafortunadamente en este último caso, las células no fueron capaces de sobrevivir e integrarse en la retina huésped (datos no mostrados).

Una parte de los ojos inyectados recibieron CPF con la GFP integrada en su genoma y bajo el control del promotor viral EF1. Utilizando las CPF que expresaban GFP, se pudieron visualizar las células en la zona trasplantada sin necesidad de recurrir a técnicas de inmunohistoquímica, para estudiar si estas habían sobrevivido y su lugar de integración (figura R.26). Sin embargo, la detección de las CPF por este método solo se pudo llevar a cabo durante las dos primeras semanas posteriores a la inyección, probablemente debido al silenciamiento del transgen.

R.2.3 La terapia celular combinada es más efectiva que la terapia celular con EPR en el enlentecimiento de la degeneración de retina

Para evaluar el posible efecto terapéutico sobre la degeneración retiniana de las células trasplantadas se estudió el grosor de la capa de fotorreceptores teniendo en cuenta el número de filas de núcleos

de la capa nuclear externa (CNE). Para llevar a cabo este estudio, se perfundieron los animales con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos y se enuclearon los ojos para su posterior inclusión en bloques de parafina y corte de microsecciones de tres micras con un microtomo.

Inmediatamente antes de la enucleación, se realizó un punto de sutura en la conjuntiva del ojo correspondiente a la zona donde se realizó el trasplante con anterioridad. Este método permitió la correcta localización del área trasplantada y por tanto la orientación idónea de la muestra en el montaje de los bloques de parafina.

A través de tinciones histológicas con hematoxilina y eosina, fue posible distinguir cada una de las células de la retina. Se observó una reducción menos acusada del número de filas de núcleos de la CNE en áreas cercanas al trasplante en comparación con las áreas alejadas del injerto, tanto dentro del propio ojo (comparativa entre el área trasplantada y el área no trasplantada) como en comparación con ojos control inyectados con medio (áreas inyectadas con medio) (figura R.27).

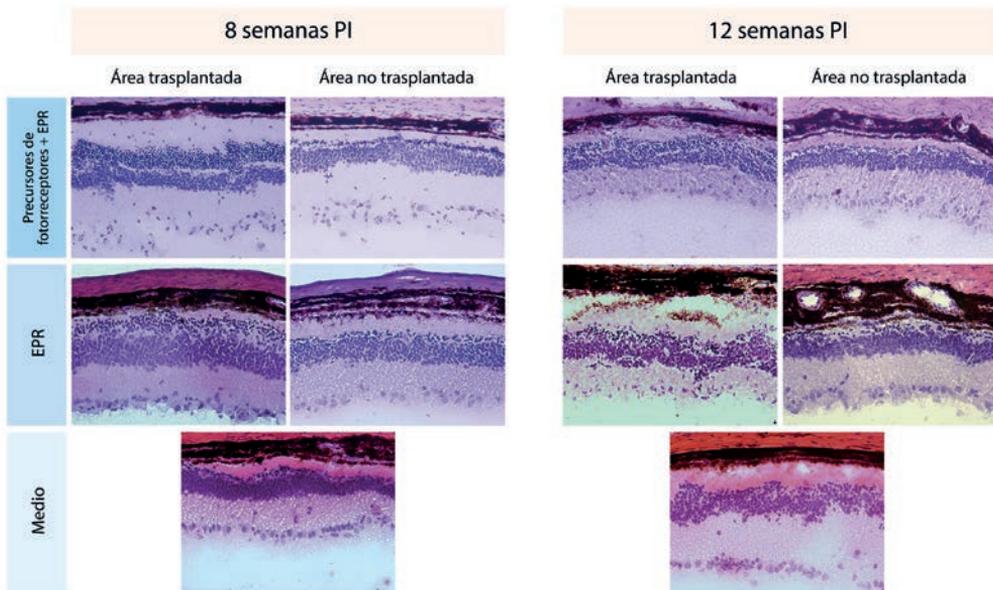


Figura R.27. Análisis histológico de las retinas trasplantadas. Crio-secciones representativas teñidas con hematoxilina y eosina. La capa de fotorreceptores presenta un mayor número de células y por tanto una mayor preservación, en las áreas trasplantadas con la combinación de precursores de fotorreceptores y EPR, y en las áreas trasplantadas con solo EPR en comparación con las áreas inyectadas con medio. EPR, epitelio pigmentario de la retina; PI, posinyección.

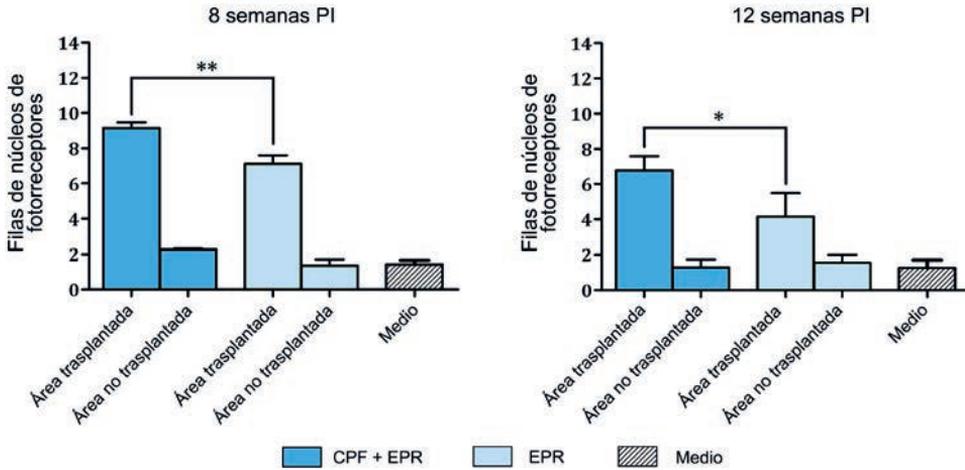


Figura R.28. Cuantificación del número de filas de núcleos de fotorreceptores en áreas cercanas al trasplante, en áreas no trasplantadas y en áreas inyectadas con medio. A las 8 semanas del trasplante celular las áreas que recibieron la terapia combinada presentaron una media de 9 filas de núcleos en la CNE, mientras que las áreas trasplantadas con solo EPR mostraron una media de 7 filas. A las 12 semanas del trasplante las áreas trasplantadas con la terapia combinada preservaron una media de 7 filas de núcleos en la CNE, mientras que las áreas trasplantadas con solo EPR preservaron una media de 4 filas. Los datos se representan como las medias de todos los valores ($n = 4$ ojos para cada grupo de datos) y las barras de error muestran la desviación estándar (DE). El análisis estadístico se ha realizado aplicando el test ANOVA simple y los asteriscos representan unos p valor de $* \leq 0,05$ y $** \leq 0,01$. Por motivos de simplificación gráfica no se muestran las significancias que existen entre los dos grupos de "áreas trasplantadas" y los grupos "áreas no trasplantadas" y "medio". CPF, células precursoras de fotorreceptores; EPR, epitelio pigmentario de la retina; PI, posinyección.

Tanto si se trata de un trasplante combinado (de EPR y CPF) como de un trasplante únicamente con EPR, la terapia celular permitió el mantenimiento de un mayor número de fotorreceptores en la retina huésped, en comparación con los ojos inyectados solo con medio (ojos control).

No obstante, el efecto sobre la preservación de la CNE también manifestó diferencias entre la terapia con EPR y CPF y la terapia única con EPR. Tanto después de 8 semanas desde el trasplante como después de 12 semanas, la terapia celular combinada fue capaz de preservar más filas de núcleos de fotorreceptores que la terapia única con EPR (figura R.28).

R.2.4 Los ojos que reciben la terapia celular combinada responden mejor a los estímulos lumínicos que los ojos trasplantados con terapia celular única con EPR

Mediante la técnica de electroretinografía Ganzfeld (ERG), que registra los cambios de potencial eléctrico de la retina completa tras recibir un estímulo lumínico, se caracterizaron las respuestas visuales de ojos clasificados en tres grupos (i) inyectados con la terapia celular combinada, (ii) inyectados únicamente con EPR y (iii) control inyectados con medio.

Los registros se obtuvieron mediante la plataforma Micron III (Phoenix Research Laboratories). Previamente a la grabación electroretinográfica, las ratas se adaptaron a la oscuridad durante un período de 16 horas (condiciones escotópicas). Bajo condiciones de

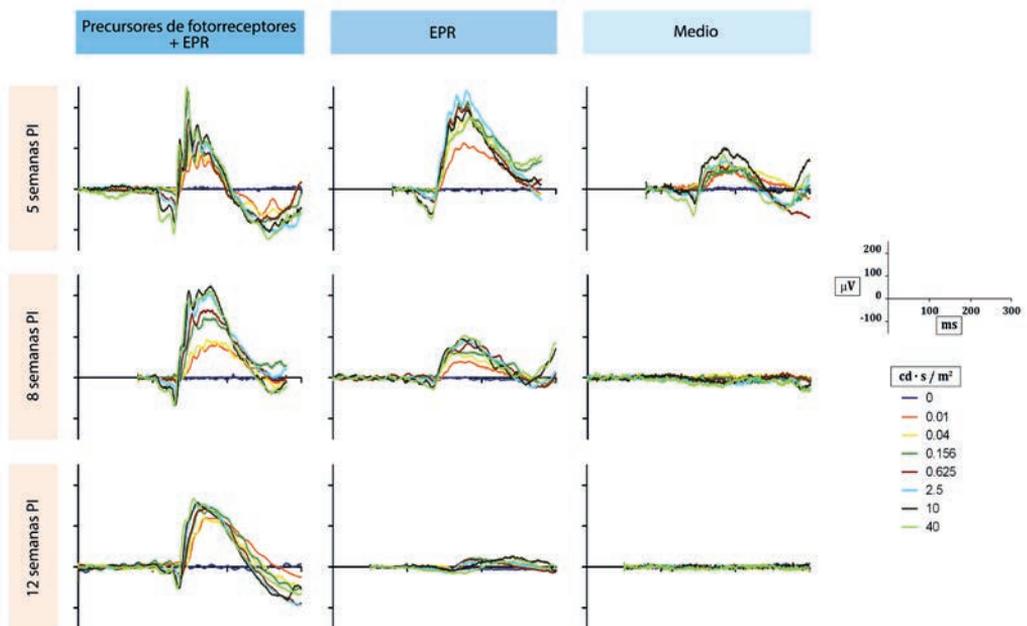


Figura R.29. Actividad electroretinográfica representativa de cada grupo de animales y según las ventanas de tiempo estudiadas. Los gráficos muestran las respuestas visuales según la estimulación lumínica a varias intensidades de luz. La respuesta eléctrica de la retina es medida en microvoltios (μV) y la intensidad de luz se expresa en candelas por segundo y metro cuadrado ($\text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$). El eje de las x muestra el tiempo transcurrido para cada respuesta en milisegundos (ms). EPR, epitelio pigmentario de la retina; PI, posinyección.

luz roja se anestesiaron los animales y las pupilas fueron dilatadas siguiendo el procedimiento presentado en el apartado M.9.

Seguidamente se colocaron tres electrodos en el animal: uno sobre la córnea a través del contacto directo de la lente del electroretinógrafo con esta parte del ojo, otro subcutáneo entre los dos ojos y un tercero subcutáneo en la base de la cola del animal. Las retinas se estimularon con intensidades de entre 0,01 y 40 cd·seg/m² (figura R.29).

Tras obtener las señales electroretinográficas, las amplitudes de las ondas *a* (desviación negativa inicial producida exclusivamente por los fotorreceptores) y *b* (desviación positiva posterior a la onda *a* producida por la respuesta del resto de tipos celulares de la neurorretina) fueron calculadas mediante el software Labscribe2. Los datos obtenidos se utilizaron para calcular los valores medios.

Las pruebas electroretinográficas pusieron en relieve que los ojos que recibieron cualquiera de las dos terapias celulares (única con EPR o combinada con EPR y CPF) presentaron un proceso de pérdida de visión más ralentizado que los ojos control. Tanto es así que después de 5 semanas de haberse realizado las inyecciones, los ojos control mostraron una respuesta de ERG inferior a la respuesta observada en los ojos tratados con cualquiera de las dos terapias celulares (figura R.29 fila superior).

Cabe destacar que a partir de las 8 semanas posinyección fue cuando se empezaron a manifestar las primeras diferencias electroretinográficas entre los ojos trasplantados con EPR y CPF y los ojos únicamente trasplantados con EPR. Aunque los ojos tratados únicamente con EPR todavía respondían a los estímulos visuales (a diferencia de los ojos control, que a las 8 semanas ya habían perdido completamente la función visual), la respuesta electroretinográfica observada fue menor a la observada en ojos tratados con la terapia celular combinada (figura R.29 fila central).

Las diferencias entre el grupo de animales trasplantados con la terapia combinada y única se hicieron aún más evidentes 12 semanas después del trasplante, cuando los únicos ojos que mostraron la preservación de la función visual fueron los ojos tratados con la terapia combinada. Tanto los ojos tratados únicamente con EPR como los ojos control presentaron electroretinograma planos (figura R.29 fila inferior).

En cuanto a la cuantificación y análisis de estas diferencias en las respuestas visuales según el tratamiento recibido y el tiempo trans-

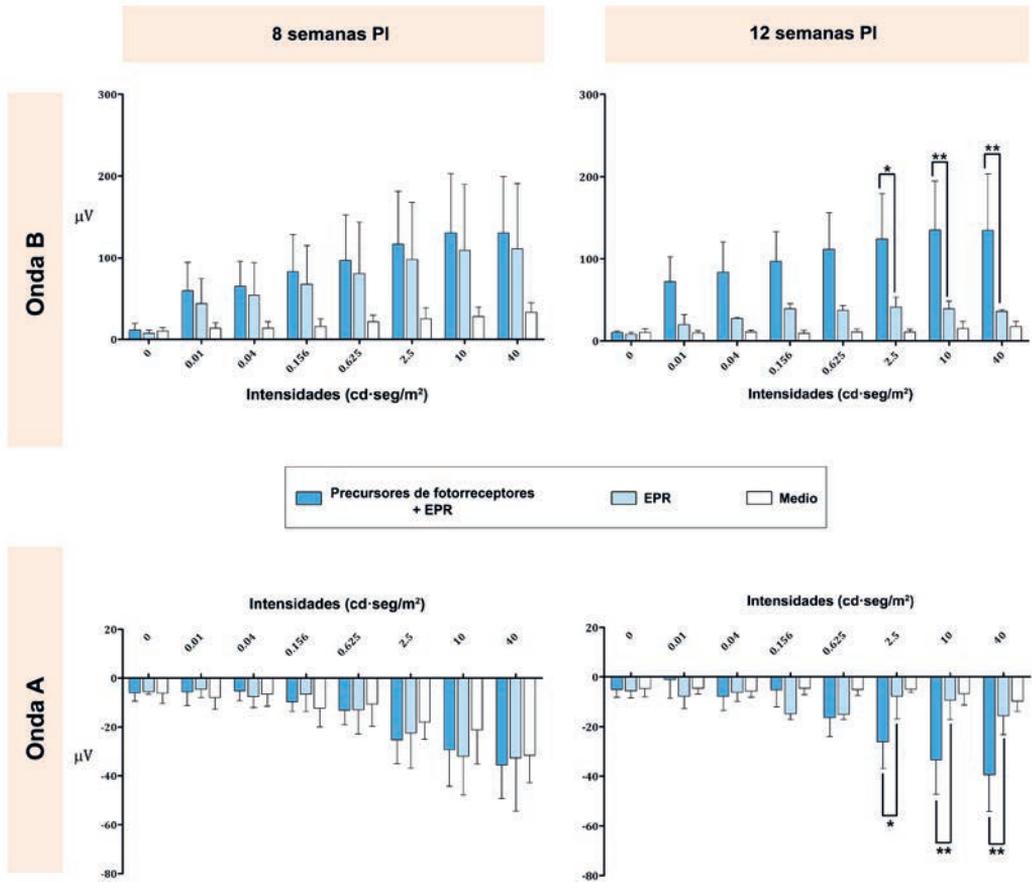


Figura R.30. Análisis estadístico de los registros de electroretinografía Ganzfeld. Los datos se representan como las medias de todos los valores ($n = 4$ ojos para cada grupo de datos) y las barras de error muestran la desviación estándar (DE). El análisis estadístico se realizó aplicando el test ANOVA simple y los asteriscos representan unos valores de $p^* \leq 0,05$ y $** \leq 0,01$. Por motivos de simplificación en los gráficos no se muestran las significancias que existen entre los dos grupos de terapia celular versus el grupo control o medio, pero se explican en el texto. CPF, células precursoras de fotorreceptores; EPR, epitelio pigmentario de la retina; PI, posinyección.

currido desde el día del trasplante, se manifestaron diferencias significativas a las 12 semanas de la inyección en las amplitudes de ondas *a* y *b* entre el grupo que recibió la terapia celular combinada versus el grupo que recibió la terapia única con EPR (figura R.30 columna de la derecha). Las diferencias en las respuestas visuales entre cualquiera de las dos terapias, única o combinada versus medio siempre fue significativa (datos no mostrados).

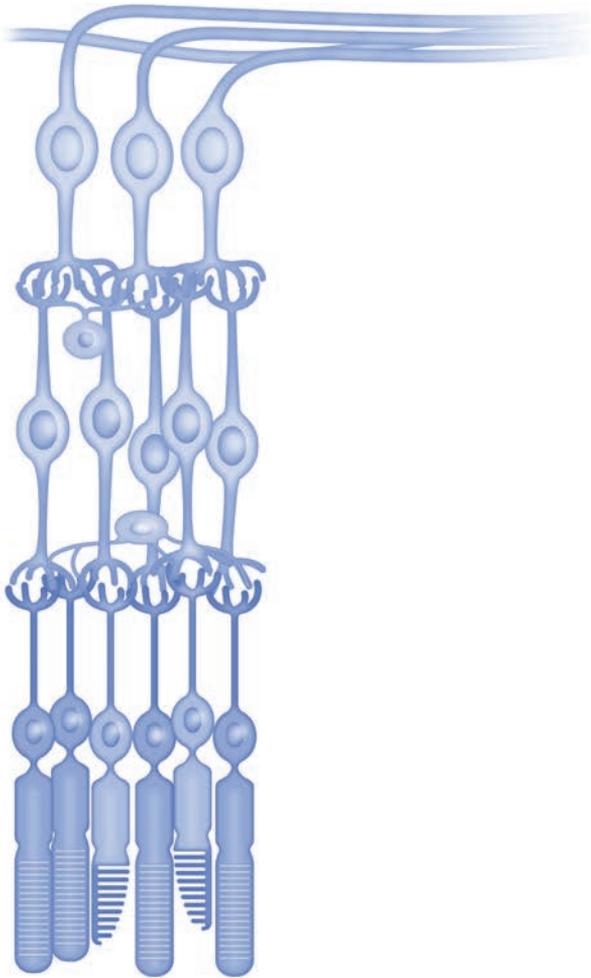
Los análisis de los datos registrados 8 semanas después del trasplante, no detectaron diferencias significativas entre las distintas terapias celulares. Únicamente se observaron diferencias en los valores

de la onda *b* de los ojos tratados con cualquiera de las dos terapias celulares, que se mostraron más elevados que la del grupo control (figura R.30 columna de la izquierda) cuando estos ojos fueron estimulados a elevadas intensidades de luz (a partir de $0,156 \text{ cd}\cdot\text{seg}/\text{m}^2$ en el caso de la terapia combinada versus medio y a partir de $2,5 \text{ cd}\cdot\text{seg}/\text{m}^2$ en el caso de la terapia única con EPR versus medio).

En conclusión, el desarrollo de esta parte del estudio ha permitido el establecer un método eficiente y reproducible para diferenciar EPR y CPF a partir de dos fuentes de células madre humanas: hESC y hiPSC. Además, se ha podido demostrar que la combinación de EPR y CPF es una terapia ideal para realizar trasplantes ya que las células sobreviven en la retina nativa y ralentizan el proceso degenerativo de este tejido.

Sin embargo, debido a que el proceso degenerativo de la retina en el modelo de rata RCS es severo, los beneficios de esta terapia celular combinada solo se mantienen en el tiempo hasta las 12 semanas posinyección. En este sentido, más estudios son necesarios para asegurar y optimizar la integración y funcionalidad de las células humanas precursoras de fotorreceptores en la retina nativa.

Discusión



Discusión

En los últimos años, el conocimiento, el desarrollo y la aplicación de las terapias celulares han avanzado a velocidad vertiginosa para el tratamiento de un gran abanico de patologías.⁷⁹ En los años 60 se iniciaron trabajos gracias a los cuales se pudieron identificar y estudiar las células madre, permitiendo clasificarlas según su origen y su potencial de diferenciación.

Las células madre embrionarias (ESC) fueron las primeras en ser utilizadas en el campo de la medicina regenerativa. Estas células jugaron un papel muy importante en el estudio de modelos de enfermedad y de terapias regenerativas. Sin embargo, el uso de dichas células se vio limitado por su reducida disponibilidad y por las implicaciones éticas asociadas al uso de células derivadas de blastocistos empleadas en fertilizaciones *in vitro*. De igual forma, se observaron diversos problemas de compatibilidad inmunológica con la consecuente necesidad de requerir medicación inmunosupresora para prevenir un posible rechazo.⁵¹

El campo de la medicina regenerativa dio un giro de 360 grados cuando en 2006 Yamanaka demostró cómo fibroblastos muridos podían ser reprogramados a células madre ESC-like, las cuales bautizó como células madre pluripotentes inducidas (iPSC).⁵² Estas células a su vez podían diferenciarse a otros tipos celulares somáticos. Dicho proceso pudo ser reproducido en células humanas⁸⁰ y a partir de entonces, se inició una corriente de trabajos y estudios basándose en esta fuente celular.

A diferencia de las ESCs, las iPSCs no entrañan dilemas éticos ya que pueden ser usadas como células autólogas (extraídas y trasplantadas del mismo paciente), y por tanto son seguras a nivel inmu-

nológico. Además, la pluripotencia permite diferenciar estas células a cualquier tipo celular, lo que plantea un sinfín de posibilidades para el estudio de enfermedad depositando nuevas esperanzas en estrategias terapéuticas basadas en el trasplante celular.⁸¹

D.1

Discusión

Protocolos de diferenciación celular

En este trabajo hemos establecido un método eficiente y reproducible de producción celular de epitelio pigmentario de la retina (EPR) a partir de células madre humanas embrionarias (hESC) y pluripotentes inducidas (hiPSC). Fuimos capaces de diferenciar células de EPR de ambos orígenes (hESC y hiPSC) seleccionando colonias de células pigmentadas en roseta. Ambas líneas celulares fueron caracterizadas, y el estudio de la expresión de marcadores específicos de EPR confirmó su correcta diferenciación celular.

Las dos líneas de células diferenciadas a EPR se trasplantaron en el espacio subretiniano de ojos de ratas Royal College of Surgeons (RCS). La integración de ambas líneas en el tejido huésped fue exitosa y no se observaron diferencias ni morfológicas ni funcionales entre las dos líneas diferenciadas a partir de hESC y hiPSC. La obtención de resultados similares con ambas fuentes de células madre en los primeros experimentos de trasplante, nos llevó a tomar la decisión de realizar los siguientes experimentos de diferenciación solo con una línea celular (hiPSC) y proseguir a testar la terapia combinada con EPR + células precursoras de fotorreceptores (CPF) de origen hiPSC.

De igual forma, hemos establecido un método eficiente para la obtención de CPF a partir de hiPSC basado en los protocolos descritos en los trabajos de Yanai *et al.*,⁶⁹ y Tucker *et al.*,⁷⁰ con algunas modificaciones que permitieron la observación de marcadores específicos de linaje neural y de fotorreceptores maduros a 20 y 40 días de diferenciación *in vitro* respectivamente.

Si bien la fisiopatogenia de la mayoría de distrofias retinianas produce una pérdida de fotorreceptores, la posibilidad de reemplazar

que han sufrido apoptosis plantea ciertas expectativas para la restauración de la función visual. De hecho, los primeros trabajos experimentales en esta línea se concentraron en diferenciar iPSCs y ESCs a distintos linajes celulares de la retina. Posteriormente, se llevaron a cabo los trasplantes de células precursoras de bastones^{82,83} o de conos aislados de retinas transgénicas heterólogas en modelos murinos.⁸⁴ Estos tipos de trasplantes de fotorreceptores fueron novedosos y motivaron diversos estudios que demostraron cierta mejoría en la función visual de los animales trasplantados.^{85,86}

A pesar del entusiasmo de los primeros trabajos de diferenciación y trasplante de fotorreceptores, se observó cierta sobreestimación de la integración de las células trasplantadas en la retina huésped. La transferencia de material citoplasmático entre células donantes y receptoras,⁸⁷ fue la responsable de la sobredimensión del número real de fotorreceptores trasplantados más que de las células trasplantadas en sí mismas.^{88,89} Estos resultados contradijeron los estudios preclínicos previos, lo que implicó una reinterpretación de dichos estudios y la necesidad de mejoras consistentes de los protocolos actuales de diferenciación de hiPSC a fotorreceptores que permitieran establecer protocolos optimizados de trasplante celular en las distrofias retinianas.

Teniendo en cuenta por un lado, la evidencia aportada por los estudios preclínicos que han demostrado que el trasplante de EPR enlentece la degeneración retiniana y mejora la preservación de los fotorreceptores; y por otro lado, los esfuerzos para encontrar métodos más eficaces de producción e integración de los fotorreceptores o precursores celulares retinianos en la retina receptora,⁹⁰ podemos afirmar que la terapia celular combinada (EPR + CPF) puede ofrecer mejores resultados tanto a nivel histológico como funcional en el tratamiento de las distrofias retinianas.

D.2

Discusión

Trasplante celular único con EPR humano en el modelo de distrofia retiniana de la rata RCS

Una vez diferenciadas las células humanas de EPR, estas fueron trasplantadas al espacio subretiniano de la rata RCS mediante una inyección transescleral. A la 5.^a semana PI encontramos células humanas en proximidad al EPR nativo formando agregados celulares multicapa en el espacio subretiniano o integradas en monocapa. Independientemente de la localización del injerto, la capa nuclear externa (CNE) fue preservada en todos los casos, indicando que una adecuada integración de las células humanas en el EPR nativo no sería un problema importante para que el tratamiento pudiera ser eficiente.

El trasplante de células en suspensión en las distintas cavidades del ojo (cavidad vítrea, espacio subretiniano, etc.) de modelos murinos es una técnica ampliamente aceptada y utilizada por la comunidad científica en el desarrollo de terapias celulares experimentales. Sin embargo y a pesar de los buenos niveles de integración obtenidos con las células diferenciadas EPR en nuestro modelo de rata RCS, sería interesante determinar qué factores son los responsables de la localización del injerto y si se podría o no controlar la ubicación homogénea del injerto para alcanzar un método de trasplante celular e integración más preciso, confiable y reproducible.

En nuestros experimentos, las células humanas diferenciadas a EPR y trasplantadas en la retina huésped siempre se encontraron cerca del EPR huésped y/o integradas en el mismo. Contrariamente a otros estudios⁹¹ nunca se vieron invadiendo capas celulares de la retina neurosensorial. Esto es clínicamente relevante, ya que la in-

tegración de las células trasplantadas dentro de otras capas celulares diferentes al EPR alteraría la estructura de un tejido tan complejo donde las correctas conexiones entre los diferentes tipos celulares son esenciales para transmitir la señal eléctrica de forma precisa.

D.3

Discusión

Trasplante celular combinado con EPR + CPF humanos en el modelo de distrofia retiniana de la rata RCS

En este estudio, el trasplante combinado se realizó en dos experimentos independientes. El factor determinante fue el estado de diferenciación de las células precursoras de fotorreceptores (CPF) escogido para inyectar las células. Partiendo de la premisa que las CPF con una menor diferenciación *in vitro* conservarían cierto grado de plasticidad, se planteó el experimento en dos grupos esperando una mayor integración de dichas células en la retina huésped en comparación con células diferenciadas *in vitro* durante más tiempo.

Desafortunadamente las células con un tiempo de diferenciación menor fueron incapaces de sobrevivir e integrarse, por lo que la terapia combinada se prosiguió con un solo grupo de CPF diferenciadas *in vitro* durante 43 días. Se ha demostrado que el momento de diferenciación de los fotorreceptores es clave para determinar el éxito del trasplante en términos de integración, formación de conexiones sinápticas y restauración de la función visual.⁹²

El hecho de que las células CPF fueran incapaces de sobrevivir en la retina huésped se podría explicar por un rechazo inmunológico. La inmunosupresión de los grupos de animales utilizados en este trabajo se realizó mediante la administración de ciclosporina A mezclada con sucralosa por vía oral. Los niveles de leucocitos en sangre de los animales tratados con este inmunosupresor fueron analizados en diversos puntos temporales de la experimentación mostrando todos ellos niveles de leucocitos en sangre ligeramente inferiores al rango de valores establecidos como normales.

No obstante, otros métodos de inmunosupresión han demostrado una mayor eficacia. Si bien es cierto que el consumo voluntario del

medicamento es lo ideal, factores gustativos y comportamentales del animal a lo largo del experimento pueden ocasionar variaciones en la ingesta, lo que no asegura una dosis administrada de forma exacta. Se ha demostrado que el *gavage* (administración directa de sustancias por vía orogástrica o nasogástrica) permite asegurar que la dosis administrada es realmente la que ingiere el animal en comparación con la ingesta oral mediante dieta o suplementos,⁹³ siendo este último método el utilizado por nosotros. Esto podría explicar por qué los fotorreceptores trasplantados no sobrevivieron, pero también se debería revisar la necesidad de dosis más elevadas de ciclosporina A para experimentos posteriores.

Una parte de los ojos a los que se les realizó el trasplante combinado de EPR + CPF recibieron CPF con la proteína verde fluorescente (GFP) integrada en su genoma para facilitar su visualización en la zona trasplantada, así como su integración con el tejido nativo. No obstante, la expresión de fluorescencia verde por parte de las CPF se observó solo las dos primeras semanas posteriores a la inyección, probablemente por el silenciamiento del transgen.

D.4

Discusión

Métodos de integración celular en modelos animales de patologías degenerativas de la retina

Una de las mejoras en el protocolo de este tipo de trasplantes es el desarrollo de métodos y técnicas de trasplante e integración celular dentro de las cuales cabe destacar:

D.4.1 Matrices 3D

Estas matrices están hechas de materiales naturales (membrana amniótica,⁹⁴ cápsula cristalina, membrana de Bruch⁹⁵) o de materiales sintéticos biocompatibles (polímeros como colágeno,⁹⁶ ácido hialurónico, alginato, fibrina) que potencialmente podrían mejorar la supervivencia de las células trasplantadas así como disminuir la respuesta inmune del huésped. Estas matrices mejorarían el trasplante de las células y de posibles moléculas bioactivas al espacio subretiniano y mantendrían estructuras 3D similares a los tejidos nativos.⁹⁷ La ventaja de las matrices de materiales naturales es que marcan el comportamiento celular gracias a la imitación de la matriz extracelular (MEC) del tejido diana, pero su uso está limitado por el riesgo de infección, aspectos de pureza del tejido derivado de animales y su inestabilidad mecánica debido a una consistencia poco controlable.⁹⁸

En contraste, las matrices sintéticas pueden ser hechas “a medida”, con materiales biocompatibles y biodegradables que simulen una MEC nativa.⁹⁹ A pesar de esto, sus desventajas radican en que la adherencia celular es pobre y no poseen epítopes para la adhesión celular.¹⁰⁰ Estudios recientes demuestran que cuando se cultivan células de EPR *in vitro* en matrices de poliméricas, las células se adhieren, proliferan y forman uniones estrechas estables formando

así una monocapa epitelial. Se ha reportado un efecto citotóxico limitado y muerte celular mínima.¹⁰¹ En la actualidad, otros trabajos han reportado el trasplante exitoso de una membrana de Bruch sintética en el espacio subretiniano de un modelo animal de distrofia retiniana sin rechazo inmunológico y baja actividad microglial. Se ha observado que dicha matriz porosa de laminina promueve la formación de una monocapa de células humanas de EPR cultivadas con capacidad fagocítica.¹⁰²

D.4.2 Retinogénesis *in vitro*

En el caso de las CPF, trabajos desarrollados por el equipo de Yoshiaki Sasai desde 2011 han logrado la generación de estructuras estratificadas de retina neural en 3D (llamados organoides retinianos) a partir de ESC de ratón cuya organización y polarización es muy similar al desarrollo retiniano *in vivo*, pudiendo hablar de una retinogénesis *in vitro* como tal.^{103,104} Este sistema 3D ha facilitado la producción a gran escala de neuronas retinianas, sobre todo de fotorreceptores, aspecto que las técnicas de cultivo celular 2D no alcanzaban a lograr.¹⁰⁵ Basados en dichos organoides murinos, en 2012 Nakano y colaboradores desarrollaron un protocolo para generar organoides a partir de ESC humanas.¹⁰⁶ La diferencia principal entre el origen murino y el humano radica en el tiempo de retinogénesis, siendo más prolongado en el proceso de desarrollo celular humano. Esto hace que los organoides murinos puedan servir como herramienta para estudiar la maduración y diferenciación de diferentes linajes celulares y tejidos, y los organoides humanos abren la puerta a futuras aplicaciones en medicina regenerativa para tratar degeneraciones retinianas incurables actualmente mediante el trasplante de retinas “artificiales”.¹⁰⁷

D.5

Discusión

Efectos de la terapia celular única con EPR humano en la rata RCS

Nuestros hallazgos apoyan que las células trasplantadas son capaces de crear uniones estrechas entre cada una de ellas y entre ellas y el EPR nativo, como se demostró con la tinción ZO-1. Estas adhesiones celulares son cruciales, no solo para el mantenimiento de la barrera hematorretiniana sino también para preservar la integridad morfológica del tejido, y para controlar la producción y proliferación de las células epiteliales.¹⁰⁸

De hecho, nosotros hemos demostrado que las células trasplantadas son positivas para CRALBP (marcador típico de EPR) y que no expresan Ki67 (indicador de proliferación). De esta manera, la formación apropiada de estas uniones entre las células trasplantadas podría ser imperativa para su viabilidad celular y para inhibir su proliferación, dos aspectos clave en términos de funcionalidad y seguridad del procedimiento.

Otro papel crítico del EPR incluye el mantenimiento de la integridad de los PR mediante la fagocitosis diaria de sus detritus,⁵ una función que está dañada en las ratas RCS debido a la mutación recesiva del gen *MERTK*. En este estudio demostramos que las células trasplantadas fueron capaces de reemplazar la función de la que carecía el EPR nativo, así como de restaurar la fagocitosis de los segmentos externos (SE) en la retina de la rata, ya que los gránulos de rodopsina fueron encontrados dentro de las células humanas y los fagosomas estaban presentes en las células del EPR en el área trasplantada más allá de la semana 12 posinyección (PI).

La restauración de la fagocitosis por parte del EPR tuvo efectos benéficos en la morfología retiniana, así como encontramos que los SE de los fotorreceptores fueron mejor preservados en las áreas

trasplantadas. Estos hallazgos son consistentes con los reportados por otros trabajos, en los que analizaron también los efectos del trasplante de células EPR más allá de las 12 semanas PI.¹⁰⁹

Además, los niveles de autofluorescencia (AF) disminuyeron claramente en las áreas trasplantadas, comparado con las áreas gruesas y difusas de autofluorescencia observadas en las áreas no trasplantadas y en los ojos inyectados con medio. Notablemente, mostramos que la AF fue prácticamente abolida en las áreas trasplantadas, en contraste con otros estudios donde la AF de las regiones trasplantadas no fue completamente reducida, donde las células trasplantadas podrían haber sufrido envejecimiento prematuro o desempeñar un proceso incompleto de ingestión.¹¹⁰ En nuestra experiencia, pudimos observar una leve AF que podría ser indicativa de una mejor preservación del complejo EPR/fotorreceptores.

La presencia de células humanas de EPR en el espacio subretiniano de la rata RCS fue capaz de enlentecer la progresión de la enfermedad. A nivel histológico, la tasa de pérdida de los núcleos de los fotorreceptores fue más baja en las áreas trasplantadas respecto a las no trasplantadas y en los ojos inyectados con medio. Este efecto se mantuvo hasta 8 semanas posteriores al trasplante. También encontramos que a las 5 y 8 semanas PI la apoptosis fue activada en las áreas que no recibieron la terapia celular.

De forma similar, la expresión de GFAP fue mayor en las áreas no trasplantadas y en los ojos inyectados con medio. Esto implica una activación de la gliosis reactiva en los astrocitos y en las células de Müller, lo que usualmente lleva a su hipertrofia hacia el fotorreceptor y la superficie vítrea. Además, contrariamente a lo que se observó en las zonas trasplantadas, las prolongaciones de las células que expresaban GFAP alcanzaban la retina externa, donde el incremento de la expresión de GFAP había sido previamente asociado con una disrupción del EPR y de la barrera hematorretiniana.¹¹¹ A las 12 semanas PI, pudimos demostrar aún un cierto grado de preservación de la capa nuclear externa (CNE) en sitios cercanos al trasplante celular.

Estos resultados demuestran cómo las células trasplantadas exitosamente protegen la retina de la apoptosis y del estrés glial. Sin embargo, a pesar del claro efecto enlentecedor de la enfermedad, en nuestro trabajo el EPR humano fue capaz de demorar la apoptosis de los fotorreceptores solo durante un máximo de 8 semanas. Esto podría explicarse por la muerte de las células trasplantadas y el posible rechazo inmunológico que se haya podido

inducir, bien por un nivel insuficiente de inmunosupresión debido a una pobre absorción de ciclosporina dependiente del protocolo mismo utilizado en nuestro trabajo,¹¹² o por variables difícilmente controlables como la activación intrínseca de células T que pueden inducir resistencia a la ciclosporina,¹¹³ la alteración de la barrera hematorretiniana que presenta la rata RCS debido al aumento de la permeabilidad vascular de la retina⁽¹¹⁴⁾, hecho que compromete su privilegio inmunológico. Otros trabajos con ratas RCS inmunosuprimidas han podido demostrar que la incompatibilidad entre los haplotipos del complejo mayor de histocompatibilidad de las células trasplantadas y del huésped puede producir una reacción crónica de rechazo del trasplante en ausencia de un rechazo agudo y este rechazo se traduce en el aumento de la pérdida de fotorreceptores.¹¹⁵

Por otro lado, pudimos establecer una relación entre el grosor de la CNE y la actividad electroretinográfica, ya que a la semana 5 y 8 PI las áreas trasplantadas con células humanas de EPR (con preservación del número de filas celulares de la CNE) mostraron una mejoría de la respuesta en el electroretinograma (ERG) comparado con las áreas no trasplantadas; pero a las 12 semanas PI, la retina no respondió a ningún estímulo lumínico, tal como se ha observado en estudios similares.⁶⁸ Este hecho sugiere que se requiere un número mínimo de filas celulares en la CNE para poder desencadenar una cascada de señales visuales.

En este sentido, sería interesante investigar nuevos métodos para mejorar la preservación de las células fotorreceptoras y mantener una supervivencia de las mismas durante períodos más largos de tiempo. Para esto, varios aspectos deben ser considerados:

- a) El número de células trasplantadas podría ser uno de los factores limitantes: pocas células podrían no ser suficientes para reducir la progresión de la enfermedad, pero el trasplante de muchas células en un espacio subretiniano limitado podría desorganizar la estructura multicapa de la retina.
- b) Considerar el uso de protocolos basados en inyecciones celulares repetidas, a pesar de que no asegurarían el mantenimiento a largo plazo de los fotorreceptores, ya que nuestros resultados demuestran que a 12 semanas PI las células humanas seguían estando presentes en la zona trasplantada. En efecto, trabajos recientes mostraron que un segundo trasplante puede no prolongar el efecto terapéutico.¹¹⁶

- c) El trasplante combinado de EPR y fotorreceptores podría reemplazar las células dañadas y proveer soporte a las células trasplantadas para mantener unos fotorreceptores nativos sanos, hipótesis que motivó la segunda parte de nuestro trabajo y que pudo ser demostrada. Sin embargo, cabe anotar que el modelo RCS presenta un fenotipo de degeneración retiniana muy grave y temprano que en los humanos equivaldría a la retinosis pigmentaria, la cual típicamente genera una pérdida de la visión nocturna en la adolescencia, de la visión lateral en la adultez y finalmente de la visión central en la vejez.¹² De esta forma, la terapia celular con EPR y CPF podría prevenir la degeneración de los fotorreceptores durante períodos de tiempo más prolongados en humanos que en ratas.
- d) La optimización de la inmunosupresión asegurando que el trasplante no es rechazado por el sistema inmune del huésped. Esto puede conseguirse mediante una técnica de administración más adecuada como el *gavage*^{93,117} o una combinación de varios agentes inmunosupresores.¹¹⁸

Para determinar la reproducibilidad de la terapia de reemplazo celular como un tratamiento genérico de la distrofia retiniana, el trasplante se debe realizar a diferentes estadios de la degeneración retiniana para definir el potencial espectro de aplicación y la ventana de tiempo terapéutica.¹¹⁹ Por esta razón, nosotros testamos el efecto de la terapia celular con EPR en dos estadios diferentes: a P21 y a P42. Trabajos previos habían encontrado que los injertos habían sido inefectivos en estadios de tiempo muy tardíos,¹²⁰ pero nosotros, como lo observado por Wang *et al.*¹²¹ que trasplantaron células ARPE-19, demostramos que las células de EPR humanas trasplantadas a P42 fueron capaces de preservar la retina de la degeneración en términos de filas de núcleos de la CNE. Sin embargo, la respuesta al ERG fue nula tanto en la zona del injerto como en la no trasplantada y en los ojos inyectados con medio cuando fueron inyectados a P42, sugiriendo de esta forma la necesidad de realizar el trasplante en estadios más tempranos de la enfermedad para rescatar efectivamente a las células fotorreceptores.

El incremento en la respuesta visual del ERG y la preservación de la CNE observados en las áreas trasplantadas podría ser debida al efecto directo de las células humanas de EPR sobre la fagocitosis de los detritus de los fotorreceptores y el ciclo visual o por un efecto neuroprotector paracrino. Nuestro ensayo *in vitro* mostró que las células diferenciadas de EPR presentaban una expresión aumen-

tada de PEDF, un factor de crecimiento neurotrófico conocido por sus efectos protectores a nivel de las neuronas retinianas.^{122,123} Estos datos, junto con el hecho de que el área de preservación se extendió más allá de la región definida cubierta por el injerto, sugiere que el PEDF u otros factores neuroprotectores difundibles pueden ser parcialmente responsables del rescate del fenotipo. Respecto a esto, muchos estudios basados en inyecciones intravítreas de células de EPR derivadas de PSC o inyecciones subretinianas de fibroblastos y otras células de soporte han mostrado que al menos algunas características específicas celulares son requeridas para los beneficios terapéuticos del tratamiento.^{68,116,124,125}

D.6

Discusión

Efectos de la terapia celular combinada de EPR + CPF humanas en la rata RCS

El efecto preservador en la CNE observado con la terapia combinada de EPR y CPF fue mayor que con la terapia única con EPR, tanto después de 8 semanas postinyección (PI) como después de 12 semanas de haber realizado el trasplante.

Cabe remarcar que a partir de las 8 semanas PI se empezaron a manifestar diferencias en la respuesta visual entre los ojos trasplantados con EPR + CPF y con solo EPR. Aunque los ojos tratados con terapia única aún eran capaces de responder a los estímulos visuales, dicha respuesta fue menor a la apreciada en los ojos tratados con terapia celular combinada. Las diferencias se hicieron aún más evidentes a las 12 semanas PI, momento en el cual los ojos trasplantados con EPR + CPF fueron los únicos que mostraron una cierta preservación de la función visual.

El trasplante único de células precursoras de fotorreceptores ha demostrado ofrecer resultados prometedores como terapia contra las distrofias retinianas, con mejoría de la función visual donde se implican mecanismos de transferencia de material proteico/ARN entre las células donantes y las nativas^{126,127} promoviendo un rescate celular o reemplazando los fotorreceptores en modelos de degeneración retiniana avanzada.¹²⁸

Si tenemos en cuenta los resultados publicados de la terapia celular única con EPR o única con fotorreceptores o células precursoras de fotorreceptores, y la contrastamos con los resultados que obtuvimos en nuestro experimento de terapia combinada con EPR y CPF, podemos inferir que la terapia combinada es una mejor aproximación terapéutica ya que se reemplazan los dos tipos celulares degenerados.

Por un lado, el EPR trasplantado provee un soporte para enlentecer la degeneración de los fotorreceptores nativos afectados y mantener los fotorreceptores sanos; y por otro lado, la población nueva y funcional de CPF es capaz de intercambiar material citoplasmático con los fotorreceptores nativos. Esto promueve el rescate celular así como una mayor duración de dicho rescate.

Estos resultados preliminares alentadores, nos motivaron a plantear aspectos aplicables a experimentos futuros con el fin de optimizar la supervivencia y funcionalidad de ambas poblaciones celulares, así como un efecto más prolongado en el tiempo, como por ejemplo:

- Considerar protocolos de inyecciones repetidas de células de EPR y CPF para asegurar un recambio celular más duradero y aumentar la población celular sana que pueda servir de sustrato para retrasar la degeneración de las células afectadas.
- Realizar experimentos con células EPR en suspensión combinadas con organoides tridimensionales (3D) de neurorretina. Los organoides 3D podrían aportar las ventajas de un implante de fotorreceptores con una morfología más estructurada y por tanto, con mayores posibilidades de integración en el tejido nativo, y las células EPR en suspensión ayudarían a mantener el organoide y rescatar los fotorreceptores nativos afectados por la patología en cuestión.

D.7

Discusión

Expectativas y aplicaciones clínicas de la terapia celular

En las últimas décadas, la terapia génica ha mostrado un gran potencial para tratar enfermedades con un componente genético, entre ellas, las distrofias retinianas (DR) hereditarias entre ellas. Sin embargo, el uso de esta técnica requiere la identificación de la causa molecular en cada paciente y esto es complicado en los casos de retinosis pigmentaria (RP) debido a la complejidad genética de la enfermedad. Además, la terapia génica no es adecuada para aproximadamente un 40 % de los casos de RP que actualmente permanecen genéticamente no resueltos. En 2017 la Food and Drug Administration (FDA) aprobó el uso de la terapia génica utilizando vectores víricos adenoasociados (voretigene neparvovec-rzyl, Luxturna™)⁴² para el tratamiento de la distrofia retiniana asociada a la mutación bialélica del gen RPE65. Dicha mutación produce un espectro variado de distrofias retinianas que potencialmente conducen a la ceguera, dentro de las cuales se encuentran la amaurosis congénita de Leber tipo 2, la RP tipo 20 o DR de bastones de inicio temprano. Estas distrofias abarcan sólo el 2% del total de DR hereditarias,¹²⁹ con lo cual solo una población específica puede beneficiarse de la mejoría de la función visual y en la calidad de vida que ofrece esta terapia.⁴¹

Teniendo en cuenta estos obstáculos, valdría la pena plantear una terapia “universal” para poder tratar uniformemente todas las variantes de las distrofias retinianas y por tanto de RP. En este contexto, los tratamientos basados en células madre podrían ser una excelente estrategia terapéutica, ya que son apropiados no sólo para los casos de RP diagnosticados genéticamente, sino también para aquellos pacientes afectados por genes nuevos o no identificados, o por una distrofia retiniana genéticamente compleja, como puede

ser el caso de la DMAE o la retinopatía diabética, de hecho ya se están desarrollando trabajos con resultados prometedores y motivadores para continuar la investigación en este campo.⁷⁹

Según nuestro conocimiento, este es el primer reporte que compara los efectos terapéuticos del trasplante de células humanas de EPR derivadas de células madre embrionarias y de células madre pluripotentes inducidas. Nuestros datos muestran claramente que el EPR derivado de ambas fuentes celulares son igualmente efectivas protegiendo la retina de las ratas RCS de la degeneración. De igual forma, este es el primer reporte que compara los efectos terapéuticos de una terapia única de EPR con una terapia combinada con EPR y células precursoras de fotorreceptores en el modelo animal de distrofia retiniana RCS, con resultados superiores en el caso de la terapia combinada a nivel estructural y funcional. Sin embargo, además de la efectividad, otros aspectos se deben tener presentes a la hora de escoger la terapia celular apropiada para regenerar EPR y fotorreceptores en humanos. Estos aspectos incluyen la seguridad, reproducibilidad, escalabilidad y accesibilidad, así como sus implicaciones éticas. La terapia con células madre pluripotentes inducidas abre la puerta a una medicina más personalizada: no dependen de un defecto genético específico, las posibilidades de rechazo son casi nulas y no entrañan dilemas éticos como en el caso de las células madre de origen embrionario.

D.7.1 Combinación de edición genética y terapia de reemplazo celular: ¿es el futuro de la terapia regenerativa ideal?

La identificación de cada una de las posibles variables que influyen en la patogenia de una enfermedad es la base para comprender los mecanismos biológicos tanto de ganancia como de pérdida de función celular. Dichos mecanismos están regulados por genes encargados de dirigir todo el engranaje que determina presencia o ausencia de enfermedad.

El sistema CRISPR/Cas9 (del inglés *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*) es un tipo de terapia génica basada en la ablación alelo-específica de los genes que interese reparar. Consiste en una corrección genómica endógena que actúa como una “tijera” de ADN que induce la rotura de las cadenas de dicho ADN en el locus deseado y desencadena la reparación endógena del ADN. Este sistema se ha optimizado mediante el uso de caspasas que faci-

litan el trabajo del ARN guía para inducir la escisión del locus que se desea reparar.¹³⁰ Esta terapia se ha probado en modelos murinos de degeneración retiniana y ha demostrado incrementar la supervivencia de los fotorreceptores¹³¹ y mejorar la función visual.¹³²

Nuevas perspectivas se están abriendo gracias a la integración de esta estrategia de edición genómica con la terapia de reemplazo celular con iPSC, ya que el tratamiento de la mayoría de enfermedades hereditarias requerirían de una reparación genética pretrasplante para garantizar su éxito. En los últimos años se han estado desarrollando trabajos combinando estas dos técnicas, cuyo objetivo es la puesta a punto de una terapia de reemplazo celular autóloga (basada en células iPSC) para pacientes con enfermedades retinianas degenerativas con resultados realmente prometedores, lo que permite afirmar que este es el futuro de una posible cura para este espectro de enfermedades hasta el momento incurables.^{133,134}

Conclusiones

Terapia única con epitelio pigmentario de la retina

- 1) Es posible diferenciar y caracterizar células de epitelio pigmentario de la retina (EPR) a partir de células madre humanas, tanto de origen embrionario (hESC) como de origen pluripotente inducido (hiPSC).
- 2) Logramos desarrollar una técnica efectiva y reproducible de trasplante celular de EPR en el espacio subretiniano del modelo de rata RCS.
- 3) Las células diferenciadas a EPR a partir de dos fuentes distintas de células madre humanas (embrionarias y pluripotentes inducidas) son capaces de integrarse y sobrevivir en la retina del modelo animal de rata RCS.
- 4) Las células diferenciadas a EPR presentan capacidad fagocítica, hecho demostrado mediante la identificación de detritus rodopsina positivos en el citoplasma de dichas células y por la disminución de niveles de autofluorescencia en las áreas trasplantadas.
- 5) El trasplante de células diferenciadas a EPR es seguro ya que no se evidenció formación de tumores ni *in vivo* ni durante el estudio histológico *post mortem*.
- 6) La terapia con células diferenciadas a EPR resultó en un enlentecimiento de la degeneración retiniana respecto a zonas alejadas del injerto en un mismo ojo y al grupo control hasta la semana 12 posterior al trasplante.

- 7) La terapia con células diferenciadas a EPR promovió un menor grado de gliosis, un menor número de fotorreceptores apoptóticos, una mayor preservación del número de filas nucleares de fotorreceptores y del grosor de la línea de unión entre los segmentos internos y externos de los fotorreceptores (SI/SE).
- 8) Comparando los efectos del trasplante según el origen de la fuente celular utilizada (hESC o hiPSC), no se observaron diferencias significativas en cuanto al grosor de la capa de SI/SE o en relación al número de filas de núcleos de fotorreceptores.
- 9) La función visual registrada mediante técnicas de electroretinografía se conservó mejor en los ojos trasplantados con células diferenciadas a EPR que en los ojos no trasplantados hasta la semana 8 postinyección. A partir de la semana 12 postinyección, la actividad electroretinográfica se observó plana en todos los grupos de estudio.

Terapia combinada con epitelio pigmentario de la retina y células precursoras de fotorreceptores.

- 1) Es posible diferenciar y caracterizar células precursoras de fotorreceptores (CPF) a partir de células madre humanas, tanto de origen embrionario como de origen pluripotente inducido.
- 2) Logramos desarrollar una técnica efectiva y reproducible de trasplante celular de EPR y de CPF en el espacio subretiniano del modelo de rata RCS.
- 3) Las células precursoras de fotorreceptores (CPF) obtenidas a partir de dos fuentes distintas de células madre humanas (embrionarias y pluripotentes inducidas) fueron capaces de integrarse en la retina de ratas RCS.
- 4) La terapia combinada con células diferenciadas a EPR y a CPF logró el enlentecimiento de la degeneración retiniana. Se observó una mayor conservación de las filas celulares de la capa nuclear de fotorreceptores en las zonas trasplantadas respecto a las zonas no trasplantadas, al grupo tratado únicamente con EPR y al grupo inyectado con medio hasta la semana 12 después del trasplante.

- 5) La respuesta visual frente al estímulo lumínico se perdió más lentamente en el grupo de la terapia combinada con células diferenciadas a EPR y a CPF en comparación con el grupo tratado únicamente con EPR y con el grupo control.
- 6) La terapia combinada con células diferenciadas a EPR y a CPF es más eficaz que la terapia única con EPR en el rescate celular de la retina de las ratas RCS.

Anexos

Artículo publicado

Riera M, Fontrodona L, Albert S, **Ramírez DM**, Seriola A, Salas A, Muñoz Y, Ramos D, Villegas-Perez MP, Zapata MA, Raya A, Ruberte J, Veiga A, Garcia-Arumi J. Comparative study of human *embryonic stem cells* (hESC) and human induced pluripotent stem cells (hiPSC) as a treatment for retinal dystrophies. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2016;3:16010. doi: 10.1038/mtm.2016.10.



ARTICLE

Comparative study of human embryonic stem cells (hESC) and human induced pluripotent stem cells (hiPSC) as a treatment for retinal dystrophies

Marina Riera^{1,2}, Laura Fontrodona¹, Silvia Albert^{3,4}, Diana Mora Ramirez^{1,5}, Anna Seriola³, Anna Salas¹, Yolanda Muñoz³, David Ramos^{6,7}, Maria Paz Villegas-Perez⁸, Miguel Angel Zapata¹, Angel Raya^{3,9,10}, Jesus Ruberte^{6,7,11}, Anna Veiga³ and Jose Garcia-Arumi^{1,2}

Retinal dystrophies (RD) are major causes of familial blindness and are characterized by progressive dysfunction of photoreceptor and/or retinal pigment epithelium (RPE) cells. In this study, we aimed to evaluate and compare the therapeutic effects of two pluripotent stem cell (PSC)-based therapies. We differentiated RPE from human embryonic stem cells (hESCs) or human-induced pluripotent stem cells (hiPSCs) and transplanted them into the subretinal space of the Royal College of Surgeons (RCS) rat. Once differentiated, cells from either source of PSC resembled mature RPE in their morphology and gene expression profile. Following transplantation, both hESC- and hiPSC-derived cells maintained the expression of specific RPE markers, lost their proliferative capacity, established tight junctions, and were able to perform phagocytosis of photoreceptor outer segments. Remarkably, grafted areas showed increased numbers of photoreceptor nuclei and outer segment disk membranes. Regardless of the cell source, human transplants protected retina from cell apoptosis, glial stress and accumulation of autofluorescence, and responded better to light stimuli. Altogether, our results show that hESC- and hiPSC-derived cells survived, migrated, integrated, and functioned as RPE in the RCS rat retina, providing preclinical evidence that either PSC source could be of potential benefit for treating RD.

Molecular Therapy — Methods & Clinical Development (2016) 3, 16010; doi:10.1038/mtm.2016.10; published online 16 March 2016

INTRODUCTION

The retinal pigment epithelium (RPE) is a polarized monolayer of epithelial cells that rests on Bruch's membrane, between the choriocapillaries and the neural retina. RPE cells create the external blood-retina barrier and have multiple roles in maintaining photoreceptor health and visual function: they are involved in retinol recycling, absorption of stray light, nutrient transport, phagocytosis of photoreceptor outer segments (OS), and trophic factor secretion.^{1,2} RPE dysfunction, which usually leads to the damage and death of photoreceptor cells, occurs in several retinal dystrophies (RD), such as retinitis pigmentosa (RP), which is the most frequent inherited RD with a prevalence of 1:4,000 and more than 1 million people affected worldwide.^{3,4} To date, more than 60 different genes and over 3,000 different disease alleles have been associated with classical forms of RP. Whether this great genetic heterogeneity ultimately converges on one or several retinal cell death pathways is poorly

understood, and this lack of knowledge has hindered the efforts to elucidate efficient therapeutic strategies.⁵

Some of the current therapeutic approaches for RD use gene delivery systems, treatment with neurotrophic growth factors, antiapoptotic agents, ribozyme therapy, RNA interference, dietary supplementation, or cell replacement.⁶ However, most of these treatments are only effective in preventing or slowing down the progression of the dystrophy, and are less efficient when used to treat advanced stages of the disease.⁷ Within this context, cell therapies are able to reverse degeneration and vision loss to a greater extent than any other treatment available.⁸ In fact, over the past decade, studies with pluripotent stem cells (PSCs) for disease modelling and treatment of incurable diseases have gained momentum in the field of regenerative medicine.⁸ The ability of PSCs to provide an unlimited supply of viable and specialized cell types, together with the advantages of the retina for this kind of

The last two authors share senior authorship

¹Ophthalmology Research, Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), Barcelona, Spain; ²Institut de Microcirurgia Ocular (IMO), Barcelona, Spain; ³Center of Regenerative Medicine in Barcelona (CMRB), Barcelona, Spain; ⁴Department of Human Genetics, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands; ⁵Department of Surgery, Faculty of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona Bellaterra, Spain; ⁶Center of Animal Biotechnology and Gene Therapy (CBATEG), Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain; ⁷CISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal; ⁸Ophthalmology Department, Faculty of Medicine, Universidad de Murcia, Murcia, Spain; ⁹Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona, Spain; ¹⁰Center for Networked Biomedical Research on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Madrid, Spain; ¹¹Department of Anatomy and Animal Health, School of Veterinary Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain.

Correspondence: M Riera and S Albert (genetica.riera@imo.es; silvia.albert@radboudumc.nl)

Received 19 January 2016; accepted 27 January 2016



therapy (*i.e.*, the eye is easily accessible, the clear media permits direct visualization following intervention, and the immune privilege conferred by blood-retina barrier), make of cell therapy one of the most promising treatments for RD.⁹ At present, all major retinal cell types, RPE cells among them, can be differentiated from both human embryonic stem cells (hESCs) and human-induced pluripotent stem cells (hiPSCs).^{10–14} The success in the use of such cells as biological therapy will depend on the ability of grafted cells to survive after transplantation, migrate toward the desired location and differentiate into functional target cells.¹⁵

The Royal College of Surgeons (RCS) rat is a good model for exploring potential treatment approaches for RD.^{16,17} These animals harbor a mutation in the gene that encodes MERTK, a transmembrane tyrosine kinase expressed in RPE cells that plays a crucial role in the signal transduction pathway involved in the phagocytosis of photoreceptor OS.¹⁸ In this animal model, apoptosis of photoreceptors arises from the third week of age and progressively affects the majority of cells, producing a severely impaired retinal function at 2–3 months.¹⁹ Several cell types have been tested for RPE cell replacement in this model, including RPE and non-RPE immortalized cell lines,^{16,20–27} RPE derived from hESCs,^{12,28} and RPE derived from hiPSCs.^{29,30} When the intervention was performed at early stages of the disease, these studies achieved successful morphological and functional rescue. However, further studies are needed to elucidate whether cell therapy may be effective if introduced at later stages of degeneration. This is clinically important, as cell-based therapies are more likely to be applied at a time when the vision in most patients is already compromised. Moreover, a comprehensive study comparing the use of the two types of PSCs is still lacking. Within this context, we aimed at: (i) developing a well-defined culture protocol to direct the differentiation of hESC and hiPSC lines into RPE cells, (ii) transplanting them into the subretinal space of RCS rats at postnatal day 21 or 42 (P21 or P42), (iii) assessing their migration, integration, survival and functionality, and (iv) determining any differences between the two PSC types.

RESULTS

Differentiation and expansion of human ES and iPS cell lines into mature RPE

Both hESC and hiPSC lines were successfully differentiated into RPE-like cells using a 12-week protocol in which PSCs, cultured on Matrigel-coated dishes, were kept in RPE-specific medium until the end of the experiment (see Supplementary Materials and Methods and Supplementary Figure S1a). Pigmented cells that appeared in the culture after 5 weeks were purified by hand picking at week 6, and homogeneous cultures consisting on pigmented epithelial monolayer cobblestone-shaped cells could be obtained and expanded from either PSC source (see Supplementary Figure S1b).

Transmission electron microscopy revealed the typical morphology and structural characteristics of RPE, including the presence of melanosome granules, polarized monolayer cell distribution with apical microvilli and tight junctions between cells (Figure 1a). Comparable results were obtained with both cell lines and were reproducible in different experiments (data not shown).

Expression profile of differentiated cells

Homogeneous RPE cell cultures were positive for the expression of several neural retina markers such as PAX6, OTX2, and CHX10; and for the RPE-specific markers BEST1, MITF, RPE65, and the tight junction marker ZO-1 (Figure 1b).

Quantitative real-time PCR analyses of RPE differentiated from hESCs and hiPSCs showed a progressive decrease in the expression of the pluripotency marker *OCT3/4*, and increased expression of genes essential for eye development, such as the neural markers *PAX6* and *RX*, the visual cycle gene *CRALBP*, the genes encoding the transcription factors *MITF* and *OTX2*, the pigment synthesis-related gene *SILVER* (*SIL*), the phagocytic marker *MERTK*, and the gene encoding the pigment epithelium-derived factor and neurotrophic factor (*PEDF*) (Figure 1c). Except for *OTX2*, the expression of which was approximately threefold higher in hiPSC-derived RPE cells compared with those differentiated from hESC, the expression level of genes related with retina/RPE development was similar in RPE cells derived from either PSC source.

Human PSC-derived RPE cells survive in the rat subretinal space and integrate within the host RPE

RCS rats were injected subretinally with RPE cells differentiated from hESC or hiPSC (RPE-injected eyes), or with differentiation medium alone (sham-injected eyes) (see Supplementary Video S1 and Table 1). To avoid the introduction of transgenic markers such as GFP, which could increase the risk of altering gene expression or cellular functions, human cells were transiently stained with a green fluorescent dye (CellTracker), which allowed tracking the cell grafts *in vivo* for the first 5–6 days after transplantation (Figure 2a).

At 5 weeks postinjection (PI), human cells were found integrated into the rat retina as scattered single-cell units, occupying the subretinal space as extensive laminar sheets, or in discrete rosette-like formations (Figure 2b). Grafted cells were never observed within the cellular layers of the neurosensory retina.

To study the distribution and integration of human transplants further, we isolated the posterior pole of transplanted eyes and removed the retina to expose whole RPE monolayers. In all RPE-injected eyes (5 weeks PI, $n = 4$; 8 weeks PI, $n = 6$ and 12 weeks PI, $n = 8$), human RPE grafts covered an area comparable with the original bleb observed by color fundus imaging on the day of injection (see Supplementary Figure S2). We also found that human cells formed tight junctions between each other and established associations with the host tissue in all cases examined up to 12 weeks PI (Figure 2c). Comparable distribution and integration patterns were observed in transplants of RPE cells differentiated either from hESCs or hiPSCs.

Expression of RPE-specific markers and phagocytosis of host OS by transplanted cells

After observing that grafts derived from both hESCs and hiPSCs properly integrated into rat retinas, we determined if such RPE transplants continued to express RPE markers such as CRALBP, which was expressed by the same cells before transplantation at the end of the *in vitro* differentiation process (Figure 1c). We found that hESC- and hiPSC-derived RPE cells were able to maintain CRALBP expression for at least 5 weeks PI. Moreover, most RPE cells were nonproliferative as shown by immunostaining of Ki67 (Figure 3a).

To determine the phagocytic ability of the transplanted cells *in vivo*, a human-specific marker antibody cocktail (HSM) was used together with an antirhodopsin antibody. We were able to demonstrate endocytosis of rhodopsin-positive debris by both human RPE cell types (Figure 3a). To confirm that human RPE cells were functional in the host retina, we monitored autofluorescence (AF) as a biomarker of phagocytosis and visual cycling. We observed a

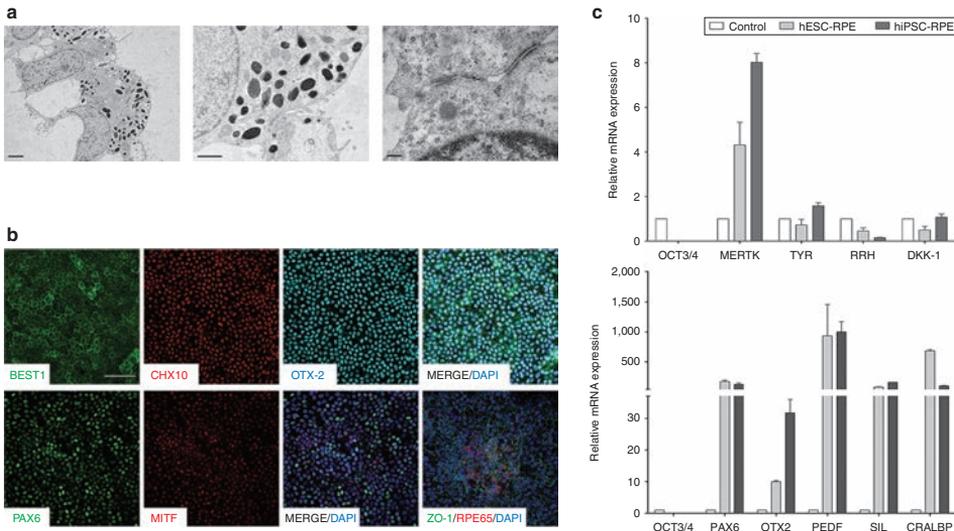


Figure 1 Characterization of differentiated RPE cells. (a) Electron micrograph showing basal nuclei and apical microvilli (left panel), melanin granules (central panel) and tight junction establishment (right panel) at 12 weeks of differentiation. (b) Immunocytochemical analysis of differentiated cells confirming protein expression of genes responsible for neural retina and RPE development (PAX6, MITF, CHX10 and OTX2) and markers of mature RPE (BEST1, RPE65 and ZO-1). Pluripotency marker OCT4 started decreasing after 4 days of differentiation. Positive PAX6 and MITF cells were negative for OCT4 marker (data not shown). (c) Gene expression profile by real-time PCR of differentiated RPE cells. Undifferentiated hPSC cell sample was used as the zero set point (control). Images shown in **a** and **b** sections were obtained in hiPSC differentiated cells, but comparable results were observed in hESC-derived cells. **a** Bars = 2 μ m (left panel); 1 μ m (middle panel); 0.2 μ m (right panel). **b** Bar = 50 μ m. Data are presented as mean \pm SEM. RPE, retinal pigment epithelium.

Table 1 Groups of transplanted animals				
Day of injection	Euthanasia (weeks PI)	Injected material		
		hESC-RPE	hiPSC-RPE	Medium
P21	5	11	12	14
	8	12	15	4
	12	12	12	4
P42	5	4	4	4
	Total (n)	39	43	26

The number of eyes (n), the type of injected material (hESC- or hiPSC-RPE, or medium), the postnatal day of injection (P21 or P42), and the week of euthanasia (5, 8 or 12 weeks PI) are shown for each group.

clear difference in the distribution pattern of AF between grafted, nongrafted regions, and sham-injected eyes. Grafted areas of RPE-injected eyes (either from hESC- or hiPSC-derived cells) presented lower levels of AF, showing a punctate pattern localized near the RPE layer, whereas nongrafted areas of the same RPE-injected eyes or sham-injected eyes showed high AF levels, with a thick and diffuse pattern filling the whole subretinal space (Figure 3b).

We next analyzed the ultrastructure of the grafted areas in RPE-injected eyes at 12 weeks PI. Sham-injected eyes presented a loss of photoreceptor nuclei and a thickening of the debris layer,

consisting of membranous waste material originating from the unphagocytosed rod OS (Figure 4a). We observed alterations in the ultrastructure of the retina of RCS sham-injected eyes in comparison with Long-Evans wild-type eyes. Specifically, the number of basal infoldings was diminished and many vacuolar-like spaces containing membrane-bound degenerated organelles were observed (Figure 4b and Supplementary Figure S3). No ultrastructural alterations of Bruch's membrane were observed in any of the eyes studied (Figure 4c). In grafted areas of RPE-injected eyes, the number of RPE basal infoldings and morphology were recovered in the area close to the transplanted cells (Figure 4b–d), and many round phagosomes packed with OS disk membranes were evident in these regions (Figure 4d), but not in sham-injected eyes. At the same time, an amelioration of organization in several OS was observed in RPE-injected eyes (see Supplementary Figure S3).

Protection of rat photoreceptors against gliosis and apoptosis by RPE cell replacement

By immunostaining retinas at 5 weeks PI, we studied expression levels and distribution of GFAP, an indicator of retinal stress, and found decreased levels in the grafted areas compared with nongrafted areas of the same eyes and with sham-injected eyes (Figure 5a). Moreover, in grafted areas the expression of this protein was restricted to the optic nerve fiber, the ganglion cells, and the inner plexiform layers, whereas in nongrafted areas and sham-injected eyes GFAP was also detected in the inner and outer nuclear layers (INL and ONL), showing a more severe gliosis phenomenon

in regions and eyes that did not receive the cell treatment. Likewise, we explored the capacity of human transplants to delay the activation of photoreceptor-programmed cell death in RCS rats. By performing TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP nick end labelling) analyses on retina cryosections, we noted a strong and consistent reduction in the number of apoptotic photoreceptor cells when comparing grafted versus nongrafted areas and sham-injected eyes (Figure 5b). Similar results were obtained in hESC- and hiPSC-grafted areas, as both gliosis and apoptosis parameters were reduced in all cases.

Therapeutic effect of human transplanted cells during retinal degeneration

At 5 weeks PI of P21 injected rats, retinal layers were better conserved in grafted areas. This preservation extended beyond the transplanted region covered by the graft (Figure 6a,b). In particular, grafted areas displayed inner and outer segments (IS + OS) that were longer than the comparable measurements in nongrafted areas or in sham-injected eyes in all conditions. Despite the progression of the disease, grafted areas of RPE-injected eyes showed the same degree of preservation (around 30–40%) at 5, 8, and 12 weeks after injection (Figure 6c).

Consistent with these observations, we also found that the number of ONL cell rows was preserved up to 12 weeks PI, showing 70% of preservation in the injected regions at all stages. In particular, at 5 weeks PI ~10 cell rows were preserved in grafted areas, compared with only 3 rows detected in nongrafted areas or in sham-injected eyes. The protection against degeneration was maintained until 8 weeks PI, since the number of ONL cell rows was almost the same as at 5 weeks PI. Nevertheless, the decrease in the number of rows with age was evident at 12 weeks PI, when it diminished from 10 to 5–6. Despite this, the number of nuclei rows was still higher in grafted areas than in nongrafted areas or sham-injected eyes, where a discontinuous single layer of nuclei could be observed (Figure 6c). No significant differences were observed when comparing IS + OS thickness or ONL cell rows between hESC- or hiPSC-injected eyes.

Interestingly, in grafted areas of P21 RPE-injected rats, we could accurately delineate the three nuclear layers (ONL, INL, and GCL) and the two plexiform layers (IPL and OPL) for up to 12 weeks, in contrast with the overlapping INL and ONL observed in nongrafted areas and in sham-injected eyes from 8 weeks PI (see Supplementary Figure S4a,b).

In an attempt to outline the benefits of these cell therapies when applied to an advanced degenerated eye, we also transplanted animals at 42 days of age (P42) and their eyes were histologically analyzed at 5 weeks PI. Here, no differences were observed in terms of IS + OS thickness between groups, while the number of ONL cell rows did show a certain level of preservation in grafted areas of both hESC- and hiPSC-injected eyes (more than four cell rows were maintained in comparison with the single cell row observed in nongrafted areas of the same eyes or in sham-injected eyes) (see Supplementary Figure S5c,d).

No tumor formation was observed in the histological examinations during the entire study.

Preservation of electroretinographic activity in RCS rats after stem cell-based RPE therapy

The preservation of visual function was statistically significant in grafted areas of P21 injected rats when stimulated at 4,000 or 16,000 cd-seconds/m² at 5 weeks PI (Figure 7a,b). Indeed, the mean

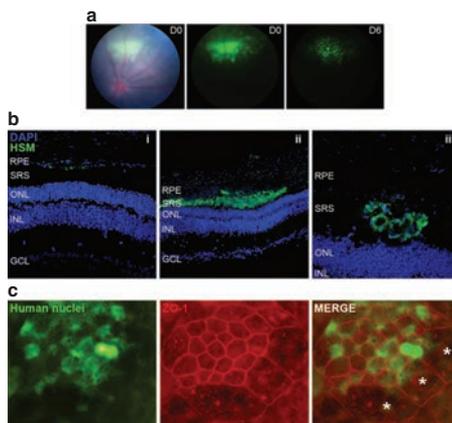


Figure 2 Human cells survive and integrate within the host tissues. (a) Fundus images showing the location of the grafted cells within the subretinal space of RCS rat after transplantation at day 0 (middle panel) and after 6 days (right panel). Green fluorescence observed is emitted from Cell Tracker, which was used to label transplanted cells transiently. (b) Immunohistochemical analysis was performed to visualize the human cells distribution among rat retina layers at 5 weeks PI of P21 injected rats. Human cells are shown in green, stained with a cocktail of human-specific markers (HSM). Human cells were found in three different locations: (i) adjacent to the host RPE, (ii) in the subretinal space adopting laminar or (iii) rosette-like structures. These images were obtained in hiPSC-injected eyes and are shown as representative examples, but similar results were achieved in hESC-injected eyes. (c) A RPE flat mount preparation of a hESC-injected eye after 12 weeks of transplantation shows the establishment of tight junctions (ZO-1) between the human cells themselves and the human and rat cells. Asterisks (*) denote rat cells, which are larger and are not stained by human nuclei marker. RCS, Royal College of Surgeons; RPE, retinal pigment epithelium; SRS, subretinal space; ONL, outer nuclear layer; INL, inner nuclear layer; GCL, ganglion cell layer.

b-wave amplitude of both hiPSC-RPE- and hESC-RPE-injected regions was similar, but significantly higher than the amplitudes observed in nongrafted areas or in sham-injected eyes (around 40% higher at 4,000 cd-seconds/m², and 46% at 16,000 cd seconds/m²). Although at 8 weeks PI b-wave amplitudes were clearly attenuated, preservation of retinal function was still observed since focal electroretinography (ERG) recordings also showed significant rescue in grafted areas. However, by 12 weeks PI, b-wave amplitudes became nonexistent and no differences were observed between the groups.

In the animals injected at P42, no visual response was detected at 5 weeks PI, neither in grafted areas nor in nongrafted areas or sham-injected eyes (data not shown).

DISCUSSION

We successfully established an efficient and reproducible method of RPE cell production from hESCs and hiPSCs. We were able to isolate and purify RPE cells from both cell lines by selecting pigmented colonies of cobblestone-shaped cells. Both RPE cell lines were characterized and the expression of RPE-specific markers confirmed the cell lineage.

Once differentiated, human cells were transplanted by trans-scleral injection into the subretinal space of the rat retina (see

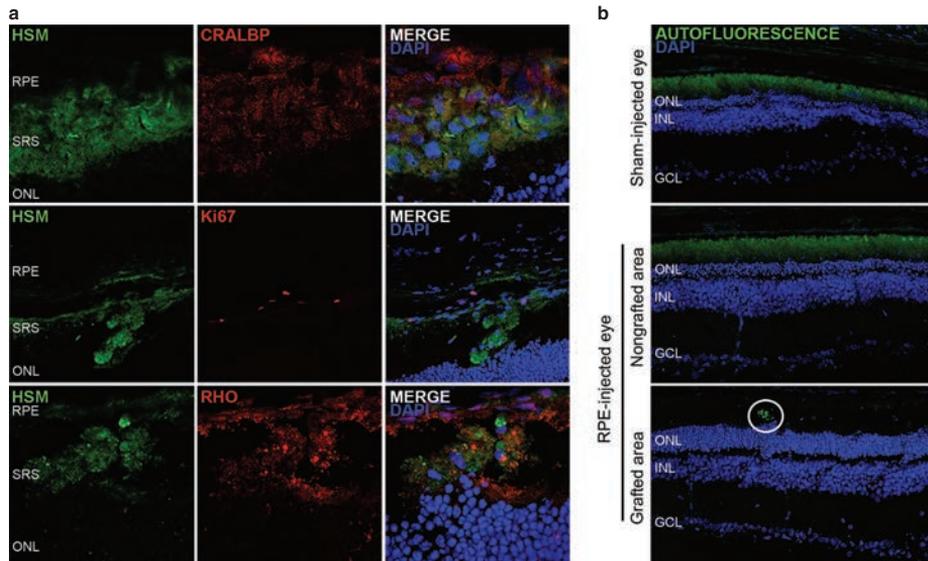


Figure 3 Transplanted cells maintain RPE cell marker expression, phagocytosed rhodopsin material, and decreased autofluorescence levels at 5 weeks PI. (a) Grafted cells are positive for CRALBP and mostly negative for Ki67. Rhodopsin-positive material is found within the cell membrane of HSM-labelled cells. (b) Autofluorescence in sham-injected eyes and in nongrafted areas was detected scattered all over the SRS, whereas in grafted areas it was limited to discrete spots of the RPE cell layer. Representative images of hiPSC-injected eyes are shown, but similar results were obtained in hESC-injected eyes. RPE, retinal pigment epithelium; SRS, subretinal space; ONL, outer nuclear layer; ONL, outer nuclear layer; INL, inner nuclear layer; GCL, ganglion cell layer.

Supplementary Video S1). At 5 weeks PI, we found human cells in proximity to the host RPE, forming multilayered aggregates in the subretinal space, or integrated as a monolayer. Irrespective of the graft location, ONL was preserved in all cases, indicating that proper integration of human cells in the host RPE would not be a major problem for the treatment to become efficient. Nevertheless, it would be interesting to determine which factors are responsible for graft localization, and whether or not heterogeneous graft location could be controlled to reach a more reliable, accurate, and reproducible method of cell transplantation and integration. Despite the heterogeneity, human cells were always found close to the RPE and, contrary to other studies,²⁸ they were never found invading cellular layers of the neural retina. This is of high clinical relevance, since the integration of the injected cells into cell layers other than the RPE would alter the structure of such a complex tissue where the proper connections among different cell types are essential to transmit the electrical signal accurately.

Our findings support the view that grafted cells are able to establish tight junctions between each other and with host RPE cells, as shown by ZO-1 staining. These cell-cell adhesions are crucial not only for the maintenance of the blood-retinal barrier, but also for preserving the morphological integrity of the tissue, and for controlling the differentiation and proliferation of epithelial cells.³¹ In fact, we have shown that grafted cells are positive for CRALBP (a typical RPE marker) and do not express Ki67 (an indicator of proliferation). Thus, the appropriate formation of these junctions among grafted cells might be imperative to sustain their RPE cell fate and

inhibit their proliferation, two key aspects in terms of functionality and safety of the procedure.

One critical role of RPE includes the maintenance of photoreceptor integrity by daily phagocytosis of photoreceptor debris,¹ a function that is impaired in RCS rats owing to the recessive *Mertk* mutation. Here, we showed that grafted cells were able to replace the function that the host RPE lacks and restore phagocytosis of the OS in the RCS rat retina, since rhodopsin granules were found within the human cells and phagosomes were present in RPE cells at the grafted area after 12 weeks of injection. The restoration of RPE phagocytosis had beneficial effects on retinal morphology as we found that photoreceptor OS were better preserved in grafted areas. Moreover, AF levels were clearly decreased in grafted areas, compared with the thick and diffuse AF signal present in nongrafted areas and sham-injected eyes. Notably, we have shown that AF in grafted areas was almost abolished, in contrast with other studies where AF of transplanted regions was not completely reduced, where transplanted cells could be undergoing premature ageing or performing an incomplete ingestion process.³⁰ If true, the slight AF observed in our study might be due to a better preservation of the photoreceptor/RPE complex.³²

The presence of human cells in the RCS rat subretinal space was capable of slowing down the progression of the disease. At histological levels, the rate at which the photoreceptor nuclei were lost was lower in grafted than in nongrafted areas and sham-injected eyes. We also found that at 5 and 8 weeks PI programmed cell death was activated in areas that did not receive the cell therapy. Similarly, GFAP

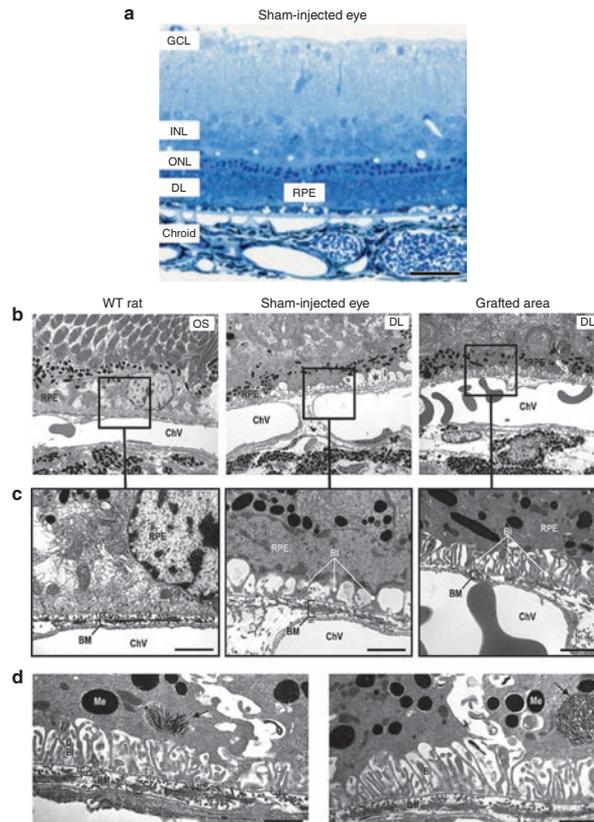


Figure 4 Light and electron microscopy images from WT rats, sham- and RPE-injected RCS rats. **(a)** Semi-thin section stained with methylene blue showing a thickness reduction in the outer nuclear layer and a thick debris layer of unphagocytosed rod outer segments in a RCS sham-injected rat. **(b, c)** A reduction of RPE basal infoldings and the presence of vacuole-like spaces (asterisk) can be seen at ultrastructural level in sham-injected RCS rats. This lesion was restored in RPE-injected RCS rats. **(d)** Autophagosomes (arrow) containing outer segment disk membranes were observed in RPE-injected RCS rats. Bars: **a**, 27 μm ; **c**, 1.2 μm ; **d**, 0.97 μm . Bl, basal infoldings; BM, Bruch's membrane; ChV, choroidal vessel; Me, melanosome; GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer; DL, debris layer; RPE, retinal pigment epithelium; OS, outer segment.

was upregulated in nongrafted areas and in sham-injected eyes. This implies an activation of reactive gliosis in astrocytes and Müller cells, which usually leads to their hypertrophy onto the photoreceptor and vitreal surfaces. Besides, and contrary to grafted areas, prolongations of GFAP-expressing cells reached the outer retina, where GFAP upmodulation has been previously associated with a disruption of the RPE and the blood–retina barrier.³³ Taken together, these results showed how the transplanted cells successfully protected the retina from both apoptosis and glial stress. Nevertheless, despite this clear effect slowing down disease progression, human RPE cells were only able to delay photoreceptor apoptosis for up to 8 weeks. However, at 12 weeks PI, we could still demonstrate a certain degree of ONL preservation in proximity to the grafts. A relationship between the thickness of the ONL and the electroretinographic activity could be established, since at 5 and 8 weeks PI grafted areas with preserved ONL cell

row number displayed improved ERG responses compared with nongrafted regions. Nevertheless, as similarly observed in other studies,¹² at 12 weeks PI, the retina did not respond to light stimuli anymore, which suggests that a minimum number of ONL cell rows are necessary to trigger the visual signal cascade. In this sense, it would be interesting to investigate novel methods to better sustain the preservation of photoreceptor cells and maintain photoreceptor survival for longer time periods. For this, several aspects should be considered: first, the number of transplanted cells could be one of the limiting factors; low numbers of cells might not be sufficient to reduce the progression of the disease, but transplantation of a high number of cells in the limited subretinal space could disorganize the multilayered structure of the retina. Second, the use of protocols based on repeated cell injection could be considered, but would not ensure long-term photoreceptor maintenance since our results support that

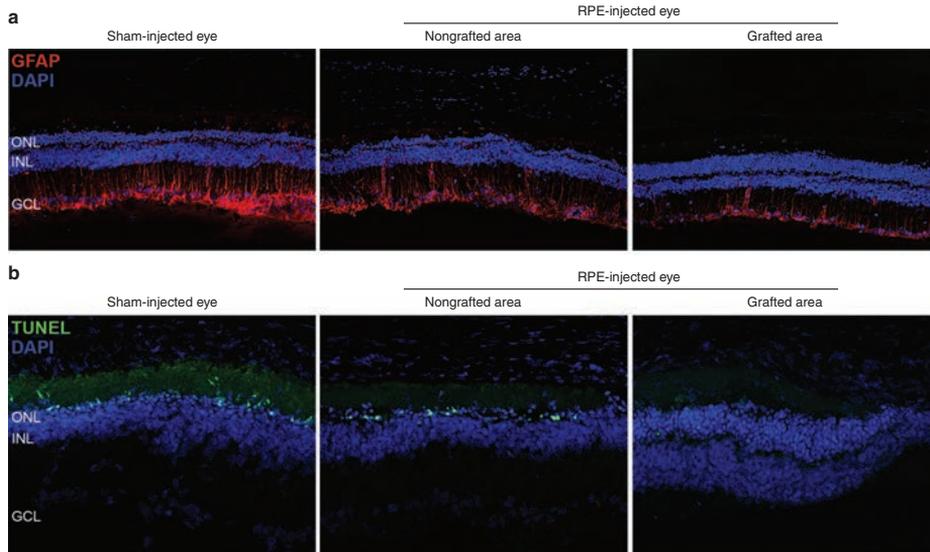


Figure 5 Human cells reduce gliosis and apoptosis of rat retinas. (a) Reactive gliosis detected by immunofluorescence with the GFAP antibody was clearly decreased in grafted regions compared with nongrafted regions of the same eye and with sham-injected eyes. (b) TUNEL analysis showed a clear reduction in the number of photoreceptor apoptotic nuclei in grafted regions of RPE-injected eyes. Note that all pictures were obtained using the same beam intensity. ONL, outer nuclear layer; INL, inner nuclear layer; GCL, ganglion cell layer.

at 12 weeks PI human cells were still grafted. In fact, recent work has shown that a second transplantation cannot prolong the therapeutic effect.³⁴ Third, RPE could be combined with photoreceptor transplantation, to replace damaged cells as well as to provide support to both transplanted and still healthy host photoreceptors. However, it is worth noting that the RCS rat model displays a more severe phenotype and faster retinal degeneration than humans affected by RP disease, which typically lose night vision in adolescence, side vision in young adulthood, and central vision later in life.³ Therefore, the “RPE-alone” cell therapy may prevent photoreceptor cells from degeneration during longer periods in humans than in rats.

To determine the feasibility of cell replacement therapy as a generic treatment for retinal disease, transplantation must be assessed at different stages of retinal degeneration to define the potential breadth of application and to outline therapeutic time windows.³⁵ For this reason, we tested the effect of RPE cell therapy at two different disease stages: P21 and P42. Previous work had found that grafts were totally ineffective at the latter time point,²⁰ but here, as also found by Wang *et al.*³⁶ grafting ARPE-19 cells, we showed that the human RPE-derived cells transplanted at P42 were able to preserve the retina from degeneration in terms of ONL cell rows. However, ERGs responses were null in grafted, nongrafted areas, and in sham-injected eyes when transplanted at P42, highlighting the need to perform transplantation at early stages of the disease to effectively rescue the photoreceptors cells.

The increased visual response and preservation of ONL observed in grafted areas could be due to a direct effect of human RPE cells on photoreceptor debris phagocytosis and visual cycle, or to a paracrine neuroprotective effect. Our *in vitro* expression assays of differentiated RPE cells showed increased expression of *PEDF*, a

neurotrophic growth factor known to exert protective effects on retinal neurons.^{37,38} These data, together with the fact that the area of preservation extended beyond the defined region covered by the graft, suggest that *PEDF* or other “diffusible neuroprotective factors” might be partially responsible for the rescue of the phenotype. In this regard, several studies based on intravitreal injections of PSC-derived RPE cells or subretinal transplantation of fibroblasts or feeder cells have shown that at least some cell-specific features are required for the beneficial effects of the treatment.^{12,34,39}

Over the last decades, gene therapy has shown a great potential to treat diseases with a genetic component, inherited RD among them. However, the use of this technique requires identification of the molecular cause in each patient and this is particularly complicated in RP cases owing to the genetic complexity of the disease. Moreover, gene therapy is not suitable for approximately the 40% of RP cases that currently remain genetically unsolved.⁴⁰ Taken together, these obstacles highlight the need of a “universal” therapeutic approach that uniformly treats all different forms of RP. Within this context, stem cell-based treatments might be an excellent therapeutic strategy, since it is appropriate not only for the genetically diagnosed RP cases, but also for those patients affected by orphaned or novel genes, or by genetically complex RD, such as age-related macular degeneration and diabetic retinopathy.

To the best of our knowledge, this is the first report comparing the therapeutic effects of human RPE cells differentiated from human embryonic stem cells and human-induced pluripotent stem cells. Our data clearly show that RPE derived from either PSC source are equally effective in protecting the retina of RCS rats from degeneration. However, several aspects other than effectiveness must be taken into account when choosing the appropriate cell-based therapy for RPE

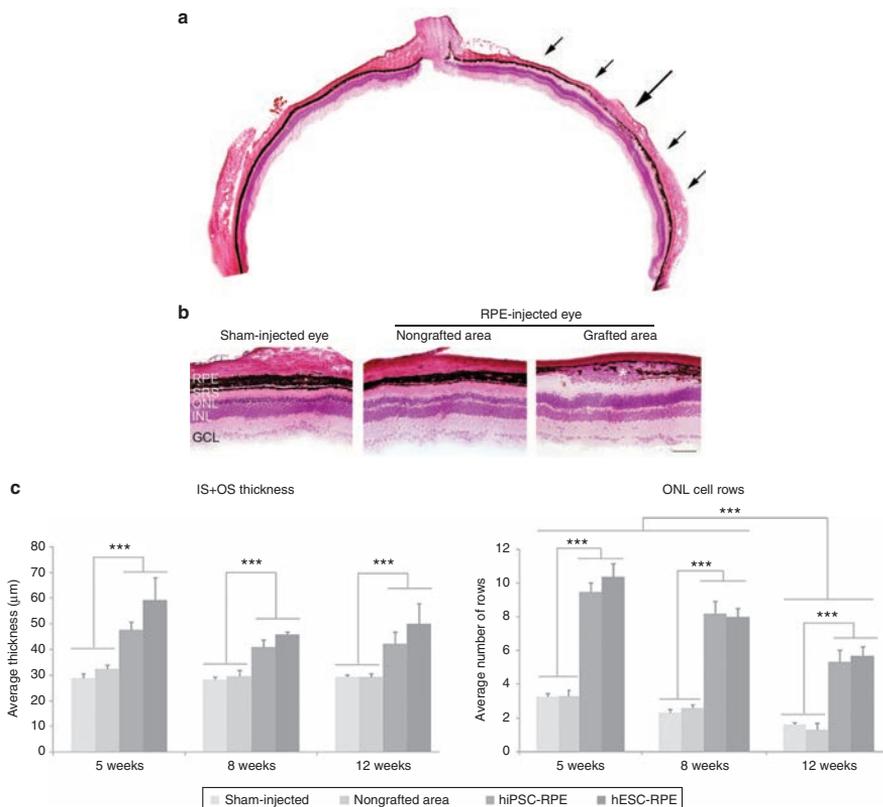


Figure 6 Photoreceptor cell layers are preserved in grafted areas. **(a)** Images of H&E-stained sections showing preservation of layers in proximity to a subretinal RPE graft (located between arrows) compared with thin layers distant from the graft. **(b)** Higher magnifications clearly showed retinal cell layer preservation in proximity to grafted cells (asterisk). **(c)** IS+OS thickness as well as the number of ONL cell rows were significantly increased in grafted areas compared with nongrafted areas and sham-injected eyes up to 12 weeks PI. There was no statistically significant difference between eyes injected with hiPSC ($n = 8$) or hESC ($n = 5$) for IS+OS thickness or number of ONL cell rows. Bar: **b**, 100 µm. Data are presented as mean \pm SEM, $***P < 0.0001$. RPE, retinal pigment epithelium; SRS, subretinal space; ONL, outer nuclear layer; INL, inner nuclear layer; GCL, ganglion cell layer, IS, inner segment, OS, outer segment.

regeneration in humans, including safety issues and considerations of reproducibility, scalability, and affordability, and as well as being ethically acceptable.⁴¹ At any rate, building on the positive results obtained here from the transplantation of the two cell lines, more experiments are warranted with a higher number of samples, to be able to confirm that iPSCs derived from different cell lines and different cell types are suitable for differentiation into RPE, and whether all of them behave as observed in this work.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture and differentiation

Two human pluripotent stem cell lines (hiPSC), one hiPSC (CbiPSC30-4F-5) and one hESC (ES[4]), were differentiated into RPE cells following the Idelson *et al.* protocol¹², with minor modifications

(see Supplementary Materials and Methods and Supplementary Figure S1).

Immunocytochemistry of differentiated cells

Once differentiated, the hPSC-derived RPE cells were characterized by immunocytochemistry to determine the extent of expression of the retinal and RPE differentiation markers. Cells were grown in polystyrene slide-flasks and fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde for 20 minutes at room temperature (RT). The immunodetection was performed with TBS/0.2% (v/v) Triton X-100 for permeabilization, and samples were blocked using a solution containing 3% (v/v) goat serum, 1% (v/v) BSA, and 0.3% (v/v) Triton X-100 in PBS for 1 hour at RT. Primary antibodies were incubated at 4 °C overnight, and secondary antibodies were

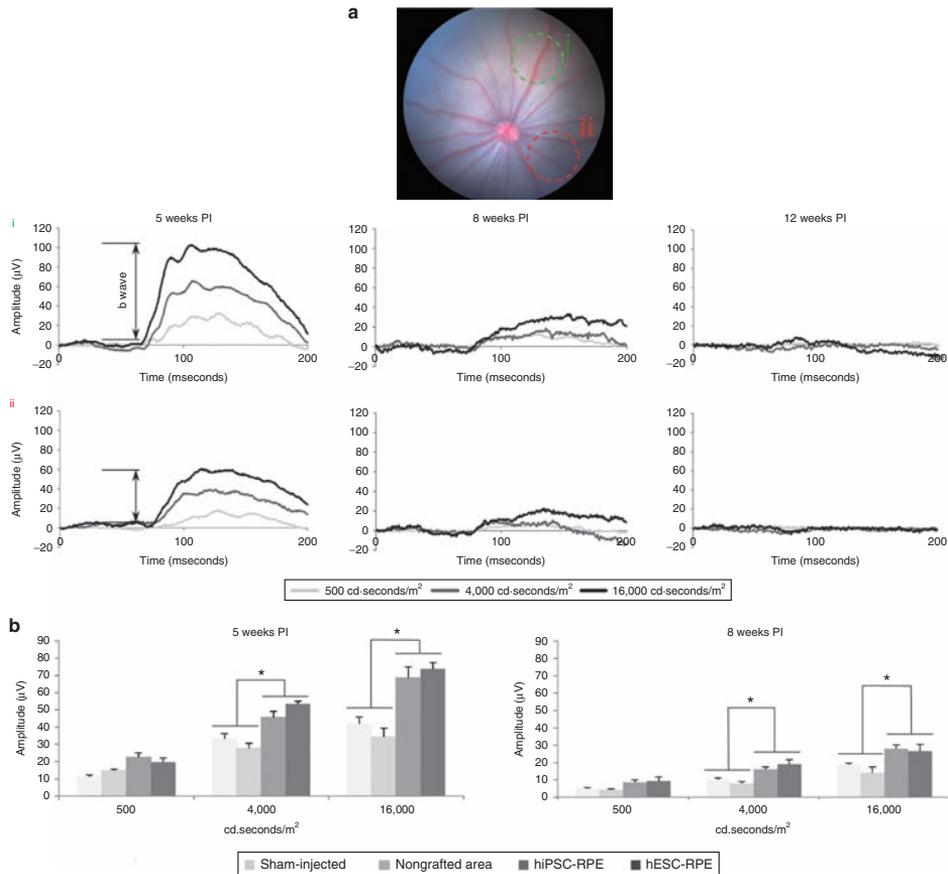


Figure 7 Visual function is conserved in grafted areas. **(a)** Fundus image of an RPE-injected RCS rat and its ERG responses are shown as a representative example. Focal ERG was used to test the functional rescue of transplanted RPE cells at 5, 8, and 12 weeks PI. For each transplanted eye, three different light intensities (500, 4,000 and 16,000 cd seconds/m²) were used to measure the electrical activity, which was recorded over two different spots in each eye: one over the grafted area (green circle, i) and other over a region far away from the graft, nongrafted area (red circle, ii). **(b)** Grafted areas showed significantly higher b-wave amplitudes than nongrafted and sham-injected eyes when stimulated with 4,000 or 16,000 cd-seconds/m². Higher b-wave amplitudes were obtained in grafted regions after 5 ($n = 9$) and 8 ($n = 7$) weeks PI, while no difference was detected after 12 weeks. At 8 weeks, PI b-wave amplitudes were clearly attenuated, but preservation of visual function was still observed. No difference could be detected between hESC- or hiPSC-injected eyes. Data are presented as mean \pm SEM, * $P < 0.01$.

incubated at 37 °C for 2 hours. The antibodies used are listed in the Supplementary Table S1. Undifferentiated hPSC were used as negative controls. Samples were mounted in Fluoroshield with DAPI, and images were obtained on an SPE confocal microscopy (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Determination of RNA expression by quantitative real-time PCR
Samples from hPSC-derived RPE were taken from each cell line differentiation culture. Cells were treated with Trizol reagent and RNA was isolated using RNeasy RNA isolation kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. RNA was

quantified using NanoDrop, and cDNA was synthesized from 1 μ g total RNA per sample using the Cloned AMV First-Strand Synthesis Kit (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA). Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed with Platinum SYBR Green quantitative PCR super mix (Invitrogen, Life Technologies) with 25 ng cDNA per well. Relative gene expression was assayed in triplicate, and compared with the undifferentiated hPSC cell sample, which served as the zero set point. All qRT-PCR reactions were performed in an Applied Biosystem 7900 HT Fast qRT-PCR System Thermocycler following the manufacturer's instructions. The markers used for the analysis of gene expression were *CRALBP*, *DKK-1*, *MERK1*, *MITF*,



OTX3/4, OTX2, PAX6, PEDF, RHH, RX, SIL, and TYR. GAPDH was used for normalization. Primer sequences are given in Supplementary Table S2.

Transplantation of differentiated cells into the RCS rat

Before surgery, cells were harvested and transiently labelled with 20 $\mu\text{mol/l}$ Cell Tracker Green CMFDA (Life Technologies, Cat. No. C2925) for 30 minutes at 37 °C, and then washed and suspended in the RPE differentiation medium at a density of 5×10^4 cells/ μl . Roughly 100,000 cells in suspension were transplanted into the subretinal space of RCS rats as previously described by Warfvinge *et al.*,⁴² but with minor modifications (see Supplementary Materials and Methods and Supplementary Video S1).

We initially injected 123 eyes, 95 of them with RPE-differentiated cells, and 28 with differentiation medium (Table 1). Following transplantation, the fundi of the rats were visualized in a Micron III platform (Phoenix Research Laboratories, Pleasanton, CA), and green fluorescence was used to determine both the injection site and the subretinal area covered by the transplanted cells at the time of injection. We excluded those eyes that did not present an observable fluorescent bleb of cells in the subretinal space, the cases in which injected cells were found in the vitreous and, eyes where major hemorrhage was caused by the intervention ($n = 15$). Thus, we included in the final study 108 eyes: 82 RPE-injected eyes (39 injected with hESC-derived RPE cells and 43 with hiPSC-derived RPE) and 26 sham-injected eyes. To assess the efficacy of the treatment in distinct phases of retinal degeneration, animals were injected either at P21, when the first morphological changes can be noticed in the retina, or at a later stage of the disease, P42, when apoptosis has already caused the death of a significant number of photoreceptor cells.^{43,44} RPE- and sham-injected eyes were monitored at 5, 8 or 12 weeks PI. Accordingly, animals were divided into groups on the basis of the type of injected material (hESC-, hiPSC-derived RPE cells, or medium), the postnatal day of injection (P21 or P42), and the end of the experiment (5, 8 or 12 weeks PI) (Table 1).

Immunosuppression by cyclosporin A

To prevent transplant rejection, animals were immune suppressed by the addition of 21 mg/kg/day of cyclosporin A (CsA) (Novartis, Cat. No. 653833.3) to 1 ml of sucralose (Clear H₂O, Cat. No. 74-02-5022), starting the treatment 2 days before the injection and maintaining it throughout the whole experiment. Every 2–3 weeks from the beginning of the treatment, a complete blood count (CBC) (BC-2800Vet, Minidray) on 20 μl of peripheral blood provided the state of immune suppression of the animals. Independently from the period of treatment, all animals were successfully immune suppressed, showing white blood cell levels below the reference range, with no major alterations in the other hematological parameters (see Supplementary Figure S5).

Histology

Fourteen-micrometer cryosections on polylysine-covered slides were fixed with a mixture of methanol and acetic acid (95:5 v:v) for 1 minute at –20 °C and stained with hematoxylin/eosin by standard protocols to assess the injection site, retinal lamination and any evidence of tumor formation. ImageJ software was used to measure the number of cell rows of the ONL and the thickness of the inner (IS) and OS of RPE- and sham-injected eyes. For the RPE-injected

eyes, two measurements were taken in the same eye: one over the grafted area and another over the nongrafted area, distant from the injection site. For statistical analyses, the significance was calculated with ANOVA, followed by the Tukey test.

Immunohistochemistry

Eyes were excised, frozen in OCT (Tissue-Tek, Sakura Finetech, Torrance, CA) and sectioned for histological and immunohistochemical analyses, or the RPE was removed intact as a flat-mount preparation.

Immunostaining of cryosections. Slides were dried for 1 hour at RT, fixed with paraformaldehyde 4% (w/v) (Electron Microscopy Sciences Cat. No. 15710, Hatfield, PA) for 20 minutes at 37 °C, and washed with PBS. Samples were blocked for 1 hour at RT with a solution containing 3% (v/v) sheep serum, 1% (v/v) BSA and 0.3% (v/v) Triton X-100 in PBS and incubated overnight at 4 °C with the primary antibody of interest. Sections were rinsed with PBS and incubated for 1 hour at RT with the corresponding secondary antibody. Sections were mounted in Fluoroshield with DAPI (Sigma-Aldrich, Cat. No. F6057, St. Louis, MO) and analyzed by confocal microscopy (FV1000 Olympus, Center Valley, PA). Details of the antibodies and dilutions used for immunofluorescence, including the human-specific marker antibody cocktail (HSM), are listed in Supplementary Table S1.

Immunostaining of flat-mount preparations. Eyes were enucleated with the aid of a dissecting microscope. The anterior segment and lens were removed, and the retinas were detached, separated from the optic nerve head with fine-curved scissors, and discarded. Radial cuts were made towards the optic nerve head, and the sclera–choroid–RPE complexes (eyecups) were fixed in 100% methanol for 30 minutes at –20 °C. After fixation, eyecups were washed with PBS containing 0.1% (v/v) Triton X-100, blocked with PBS containing 0.1% (v/v) Triton X-100 and 1% (v/v) BSA for 1 hour at RT and incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies of interest. Thereafter they were washed and incubated with the corresponding secondary antibodies for 1 hour. Posterior segments were washed in PBS, flat mounted in Fluoroshield with DAPI and analyzed by confocal microscopy (FV1000 Olympus). Antibodies and dilutions used for immunofluorescence in flat-mounted eyes are listed in Supplementary Table S1.

Transmission electron microscopy

hiPSC-derived RPE homogeneous culture samples were fixed with 2.5% (w/v) glutaraldehyde for 2 hours at 4 °C. Postfixation was carried out in 1% (w/v) osmium tetroxide for 2 hours at 4 °C, and samples were then dehydrated with ethanol and embedded in epoxy resin. Semithin and ultrathin sections were analyzed. Samples were examined in a Jeol 1011 transmission electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan).

Ocular samples containing retina, RPE, choroid, and sclera were dissected out of from RPE- and sham-injected eyes. In addition, comparable samples from noninjected Long–Evans wild-type rats were obtained. Samples were fixed in 2.5% (v/v) glutaraldehyde and 2% (w/v) paraformaldehyde and postfixed in 1% (w/v) osmium tetroxide. After staining in aqueous uranyl acetate, samples were dehydrated and embedded in epoxy resin. Semithin sections stained with methylene blue were examined by light microscopy and ultrathin sections (70 nm) stained with uranyl acetate and lead citrate were examined in a Jeol 1400 transmission electron microscope (Jeol).

TUNEL analyses

Fourteen-micrometer cryosections on polylysine-covered slides were fixed with paraformaldehyde 4% (v/v) for 20 minutes at 37 °C, washed with PBS, and permeabilized with proteinase K (20 µg/ml) for 15 minutes at RT. The TUNEL reaction was performed using the Click-IT Plus TUNEL Assay (Life technologies, Cat. No. C10617) following the manufacturer's instructions. A positive control section was obtained by inducing DNA strand breaks with 1 unit of DNase I. A negative control section was treated with a TUNEL cocktail lacking the TdT enzyme. Sections were mounted in Fluoroshield with DAPI (Sigma-Aldrich, Cat. No. F6057) and analyzed by confocal microscopy (FV1000 Olympus).

Focal ERG

To assess transplantation efficiency, retinas were examined at 5, 8, and 12 weeks PI by live imaging and focal ERG, which allows the measurement of the visual response limited to particular areas. Recordings were measured using the Micron III platform (Phoenix Research Laboratories). Dark-adapted rats (12–16 hours) were anaesthetized under dim red light with 2% (v/v) isoflurane gas and placed on a heating pad at 37 °C. Pupils were dilated with a topical mixture of phenylephrine and tropicamide, and recordings were measured as previously described.³⁰ A spot of ~2 mm diameter on the retina was stimulated at different light intensities (500, 4,000, and 16,000 cd-seconds/m²) over two distinct regions of RPE-injected eyes, the grafted area and the nongrafted area, and over the injected area of sham-injected eyes. At least five ERG traces were obtained for each condition and results averaged. The amplitude and the implicit time of the b-wave were calculated using the Labscribe2 software. For statistical analyses, the significance was calculated with ANOVA followed by Tukey test.

All procedures on RCS rats were carried out with the approval of the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Hospital Universitari Vall d'Hebron, and in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and with the Declaration of Helsinki.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Verónica Melgarejo, Ángel Vázquez, Cristina Gómez Santos, Lola Mulero Pérez, Cristina Morena Albert and Mercè Martí Gaudes (CMRB Core Facility) for technical assistance, and Trevor G. Cooper for language editing. This research project was funded by grants from *La Marató de TV3* (project no. 484/C/2012) and by the post-doc fellowship (SFRH/BPD/102573/2014) from the Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Ministério da Educação e Ciência, Portugal.

REFERENCES

1. Strauss, O (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* **85**: 845–881.
2. Ramsden, CM, Pownner, MB, Carr, AJ, Smart, MJ, da Cruz, L and Coffey, PJ (2013). Stem cells in retinal regeneration: past, present and future. *Development* **140**: 2576–2585.
3. Hartong, DT, Berson, EL and Dryja, TP (2006). Retinitis pigmentosa. *Lancet* **368**: 1795–1809.
4. Churchill, JD, Bowne, SJ, Sullivan, LS, Lewis, RA, Wheaton, DK, Birch, DG et al. (2013). Mutations in the X-linked retinitis pigmentosa genes RPGR and RP2 found in 8.5% of families with a provisional diagnosis of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **54**: 1411–1416.

Transplantation of hESC- or hiPSC-derived RPE
M Riera et al.

5. Zheng, A, Li, Y and Tsang, SH (2015). Personalized therapeutic strategies for patients with retinitis pigmentosa. *Expert Opin Biol Ther* **15**: 391–402.
6. Musarella, MA and Macdonald, IM (2011). Current concepts in the treatment of retinitis pigmentosa. *J Ophthalmol* **2011**: 753547.
7. Lamba, DA, McUsic, A, Hirata, RK, Wang, PR, Russell, D and Reh, TA (2010). Generation, purification and transplantation of photoreceptors derived from human induced pluripotent stem cells. *PLoS One* **5**: e8763.
8. Wiley, LA, Burnight, ER, Songstad, AE, Drack, AV, Mullins, RF, Stone, EM et al. (2015). Patient-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs) for the study and treatment of retinal degenerative diseases. *Prog Retin Eye Res* **44**: 15–35.
9. Borooh, S, Phillips, MJ, Bilican, B, Wright, AF, Wilmut, I, Chandran, S et al. (2013). Using human induced pluripotent stem cells to treat retinal disease. *Prog Retin Eye Res* **37**: 163–181.
10. Rowland, TJ, Blaschke, AJ, Buchholz, DE, Hikita, ST, Johnson, LV and Clegg, DO (2013). Differentiation of human pluripotent stem cells to retinal pigmented epithelium in defined conditions using purified extracellular matrix proteins. *J Tissue Eng Regen Med* **7**: 642–653.
11. Lamba, DA, Karl, MO, Ware, CB and Reh, TA (2006). Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 12769–12774.
12. Idelson, M, Alper, R, Obolensky, A, Ben-Shushan, E, Hemo, I, Yachimovich-Cohen, N et al. (2009). Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional retinal pigment epithelium cells. *Cell Stem Cell* **5**: 396–408.
13. Mekala, SR, Vauhini, V, Nagarajan, U, Maddileti, S, Gaddipati, S and Mariappan, I (2013). Derivation, characterization and retinal differentiation of induced pluripotent stem cells. *J Biosci* **38**: 123–134.
14. Hansson, ML, Albert, S, González Somermeyer, L, Peco, R, Mejia-Ramírez, E, Montserrat, N et al. (2015). Efficient delivery and functional expression of transfected modified mRNA in human embryonic stem cell-derived retinal pigmented epithelial cells. *J Biol Chem* **290**: 5661–5672.
15. Wong, GK and Chiu, AT (2011). Gene therapy, gene targeting and induced pluripotent stem cells: applications in monogenic disease treatment. *Biotechnol Adv* **29**: 1–10.
16. Pinilla, I, Cuenca, N, Sauvè, Y, Wang, S and Lund, RD (2007). Preservation of outer retina and its synaptic connectivity following subretinal injections of human RPE cells in the Royal College of Surgeons rat. *Exp Eye Res* **85**: 381–392.
17. Bourne, MC, Campbell, DA and Tansley, K (1938). Hereditary degeneration of the rat retina. *Br J Ophthalmol* **22**: 613–623.
18. D'Cruz, PM, Yasumura, D, Weir, J, Matthes, MT, Abderrahim, H, LaVail, MM et al. (2000). Mutation of the receptor tyrosine kinase gene Merck in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum Mol Genet* **9**: 645–651.
19. Cuenca, N, Pinilla, I, Sauvè, Y and Lund, R (2005). Early changes in synaptic connectivity following progressive photoreceptor degeneration in RCS rats. *Eur J Neurosci* **22**: 1057–1072.
20. Li, L and Turner, JE (1991). Optimal conditions for long-term photoreceptor cell rescue in RCS rats: the necessity for healthy RPE transplants. *Exp Eye Res* **52**: 669–679.
21. Lund, RD, Adamson, P, Sauvè, Y, Keegan, DJ, Girman, SV, Wang, S et al. (2001). Subretinal transplantation of genetically modified human cell lines attenuates loss of visual function in dystrophic rats. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 9942–9947.
22. Lawrence, JM, Sauvè, Y, Keegan, DJ, Coffey, PJ, Hetherington, L, Girman, S et al. (2000). Schwann cell grafting into the retina of the dystrophic RCS rat limits functional deterioration. *Royal College of Surgeons. Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**: 518–528.
23. Coffey, PJ, Girman, S, Wang, SM, Hetherington, L, Keegan, DJ, Adamson, P et al. (2002). Long-term preservation of cortically dependent visual function in RCS rats by transplantation. *Nat Neurosci* **5**: 53–56.
24. Wang, S, Lu, B, Wood, P and Lund, RD (2005). Grafting of ARPE-19 and Schwann cells to the subretinal space in RCS rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**: 2552–2560.
25. Inoue, Y, Iriyama, A, Ueno, S, Takahashi, H, Kondo, M, Tamaki, Y et al. (2007). Subretinal transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells delays retinal degeneration in the RCS rat model of retinal degeneration. *Exp Eye Res* **85**: 234–241.
26. Wang, S, Girman, S, Lu, B, Bischoff, N, Holmes, T, Shearer, R et al. (2008). Long-term vision rescue by human neural progenitors in a rat model of photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**: 3201–3206.
27. Thumann, G, Salz, AK, Walter, P and Johnen, S (2009). Preservation of photoreceptors in dystrophic RCS rats following allo- and xenotransplantation of iPE cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **247**: 363–369.
28. Vugler, A, Carr, AJ, Lawrence, J, Chen, LL, Burrell, K, Wright, A et al. (2008). Elucidating the phenomenon of hESC-derived RPE: anatomy of cell genesis, expansion and retinal transplantation. *Exp Neurol* **214**: 347–361.
29. Carr, AJ, Vugler, AA, Hikita, ST, Lawrence, JM, Gias, C, Chen, LL et al. (2009). Protective effects of human iPSC-derived retinal pigment epithelium cell transplantation in the retinal dystrophic rat. *PLoS One* **4**: e8152.
30. Krohne, TU, Westenskow, PD, Kurihara, T, Friedlander, DF, Lehmann, M, Dorsey, AL et al. (2012). Generation of retinal pigment epithelial cells from small molecules and OCT4 reprogrammed human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med* **1**: 96–109.



31. Georgiadis, A, Tschernutter, M, Bainbridge, JW, Balaggan, KS, Mowat, F, West, EL et al. (2010). The tight junction associated signalling proteins ZO-1 and ZONAB regulate retinal pigment epithelium homeostasis in mice. *PLoS One* **5**: e15730.
32. Kennedy, CJ, Rakoczy, PE and Constable, IJ (1995). Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: a review. *Eye (Lond)* **9**: 763–771.
33. Wu, KH, Madigan, MC, Billson, FA and Penfold, PL (2003). Differential expression of GFAP in early y late AMD: a quantitative analysis. *Br J Ophthalmol* **87**: 1159–1166.
34. Tzameret, A, Sher, I, Belkin, M, Treves, AJ, Meir, A, Nagler, A et al. (2014). Transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cells as a thin subretinal layer ameliorates retinal degeneration in a rat model of retinal dystrophy. *Exp Eye Res* **118**: 135–144.
35. Barber, AC, Hippert, C, Duran, Y, West, EL, Bainbridge, JW, Warre-Cornish, K et al. (2013). Repair of the degenerate retina by photoreceptor transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: 354–359.
36. Wang, S, Lu, B, Girman, S, Holmes, T, Bischoff, N and Lund, RD (2008). Morphological and functional rescue in RCS rats after RPE cell line transplantation at a later stage of degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**: 416–421.
37. Cao, W, Tombran-Tink, J, Elias, R, Sezate, S, Mrazek, D and McGinnis, JF (2001). *In vivo* protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**: 1646–1652.
38. Pang, IH, Zeng, H, Fleenor, DL and Clark, AF (2007). Pigment epithelium-derived factor protects retinal ganglion cells. *BMC Neurosci* **8**: 11.
39. Wang, NK, Tosi, J, Kasanuki, JM, Chou, CL, Kong, J, Parmalee, N et al. (2010). Transplantation of reprogrammed embryonic stem cells improves visual function in a mouse model for retinitis pigmentosa. *Transplantation* **89**: 911–919.
40. Wang, F, Wang, Y, Zhang, B, Zhao, L, Lyubasyuk, V, Wang, K et al. (2014). A missense mutation in HK1 leads to autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **55**: 7159–7164.
41. Mount, NM, Ward, SJ, Kefalas, P and Hyllner, J (2015). Cell-based therapy technology classifications and translational challenges. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **370**: 20150017.
42. Warfvinge, K, Kamme, C, Englund, U and Wictorin, K (2001). Retinal integration of grafts of brain-derived precursor cell lines implanted subretinally into adult, normal rats. *Exp Neurol* **169**: 1–12.
43. Davidorf, FH, Mendlovic, DB, Bowyer, DW, Gresak, PM, Foreman, BC, Werling, KT et al. (1991). Pathogenesis of retinal dystrophy in the Royal College of Surgeons rat. *Ann Ophthalmol* **23**: 87–94.
44. Tso, MO, Zhang, C, Ablner, AS, Chang, CJ, Wong, F, Chang, GQ et al. (1994). Apoptosis leads to photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy of RCS rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35**: 2693–2699.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Supplementary Information accompanies this paper on the *Molecular Therapy—Methods & Clinical Development* website (<http://www.nature.com/mtm>)

Bibliografía

1. Skuta G, Cantor L, Weiss J. Fundamentals and principles of ophthalmology. En: The Basic and clinical science course. American Academy of Ophthalmology; 2011. p. 41.
2. Ryan S. Retina. 5th ed. Los Angeles, CA: Elsevier Saunders; 2013.
3. Boyd S. Retinal and vitreoretinal surgery. Mastering the latest techniques. Highlights of ophthalmology. 2002. 1-4 p.
4. Rizzolo LJ. Barrier properties of cultured retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res.* 2014;126:16–26.
5. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev.* 2005;85:845–81.
6. Becerra S, Fariss R, Wu Y, Montuenga L, Wong P, Pfeffer B. Pigment epithelium-derived factor in the monkey retinal pigment epithelium and interphotoreceptor matrix: apical secretion and distribution. *Exp Eye Res.* 2004;78:223–34.
7. Blaauwgeers H, Holtkamp G, Rutten H, Witmer A, Koolwijk P, Partanen T, *et al.* Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation. *Am J Pathol.* 1999;155:421–8.
8. Bosl M, Stein V, Hubner C, Zdebik A, Jordt S, Mukhopadhyay A, *et al.* Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon ClC-2 Cl() channel disruption. *EMBO J.* 2001;20:1289–99.
9. Ryan S. Cell biology of the retinal pigment epithelium. En: Retina. Elsevier Saunders; 2013. p. 408.
10. Jin M, Li S, Nusinowitz S, Lloyd M, Hu J, Radu RA, *et al.* The role of interphotoreceptor retinoid-binding protein on the translocation of visual retinoids and function of cone photoreceptors. *J Neurosci* 2009;29(5):1486–95.

11. Saari JC, Bredberg DL, Noy N. Control of substrate flow at a branch in the visual cycle. *Biochemistry*. 1994;33(10):3106–12.
12. Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. *Lancet*. 2006;368:1795–809.
13. Den Hollander AI, Black A, Bennett J, Cremers FPM. Lighting a candle in the dark: advances in genetics and gene therapy of recessive retinal dystrophies. *J Clin Invest*. 2010;120:3042–53.
14. Hamel C. Retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis*. 2006;1:40.
15. Geltzer AI, Berson EL. Fluorescein angiography of hereditary retinal degenerations. *Arch Ophthalmol*. 1969;81(6):776–82.
16. Robson AG, Lenassi E, Saihan Z, Luong VA, Fitzke FW, Holder GE, et al. Comparison of fundus autofluorescence with photopic and scotopic fine matrix mapping in patients with retinitis pigmentosa: 4-to 8-year follow-up. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(10):6187–95.
17. Chizzolini M, Galan A, Milan E, Sebastiani A, Costagliola C, Parmeggiani F. Good epidemiologic practice in retinitis pigmentosa: from phenotyping to biobanking. *Curr Genomics*. 2011;2(4):260–6.
18. Najera C, Millan JM, Beneyto M, Prieto F. Epidemiology of retinitis pigmentosa in the Valencian community (Spain). *Genet Epidemiol*. 1995;12(1):37–46.
19. Ayuso C, Garcia-Sandoval B, Najera C, Valverde D, Carballo M, Antiñolo G. Retinitis pigmentosa in Spain. The spanish multicentric and multidisciplinary group for research into retinitis pigmentosa. *Clin Genet*. 1995;48(3):120–2.
20. Bowne S, Sullivan L, Koboldt D, Al. E. Identification of disease-causing mutations in autosomal dominant retinitis pigmentosa (adRP) using next-generation DNA sequencing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52:494–503.
21. Daiger S, Sullivan L, Bowne S. Genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Clin Gen*. 2013;84(2):132–41.
22. Sung C-H, Davenport C, Hennessey J, Maumenee IH, Jacobson SG, Heckenlively JR, et al. Rhodopsin mutations in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:6481–5.
23. Dryja T, Hahn L, Kajiwarra K, Berson EL. Dominant and digenic mutations in the peripherin/RDS and ROM1 genes in retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38:1972–82.
24. Bessant D, Payne A, Mitton K, Wang QL, Swain PK, Plant C, et al. A mutation in NRL is associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat Genet*. 1999;21:355–6.
25. Gal A, Orth U, Baehr W, Schwinger E, Rosenberg T. Heterozygous missense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene in autosomal dominant stationary night blindness. *Nat Genet*. 1994;7:551.

26. D'Cruz PM, Yasumura D, Weir J, Matthes MT, Abderrahim H, LaVail MM, *et al.* Mutation of the receptor tyrosine kinase gene *Mertk* in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum Mol Genet.* 2000;9(4):645–51.
27. Gal A, Li Y, Thompson DA, Weir J, Orth U, Jacobson SG, *et al.* Mutations in *MERTK*, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nat Genet.* 2000;26(3):270–1.
28. Andréasson S, Ponjavic V, Abrahamson M, Al. E. Phenotypes in three swedish families with X-linked retinitis pigmentosa caused by different mutations in the *RPGR* gene. *Am J Ophthalmol.* 1997;124:95–102.
29. Bader I, Brandau O, Achatz H, Al. E. X-linked retinitis pigmentosa: *RPGR* mutations in most families with definite X linkage and clustering of mutations in a short sequence stretch of exon ORF15. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:1458–63.
30. Kajiwaru K, Berson E, Dryja T. Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and *ROM1* loci. *Science.* 1994;264:1604–8.
31. Da Cruz L, Dorn JD, Humayun MS, Dagnelie G, Handa J, Barale PO, *et al.* Five-year safety and performance results from the Argus II retinal prosthesis system clinical trial. *Ophthalmology.* 2016;123(10):2248–54.
32. Berson E, Rosner B, Sandberg M, Al. E. A randomized trial of supplemental vitamin A and vitamin E supplementation for retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol.* 1993;111:761–72.
33. Berson E, Rosner B, Sandberg M, Weigel-DiFranco C, Moser A, Brockhurst RJ, *et al.* Clinical trial of docosahexaenoic acid in patients with retinitis pigmentosa receiving vitamin A treatment. *Arch Ophthalmol.* 2004;122:1297–305.
34. Uthra S, Kumaramanickavel G. Gene therapy in ophthalmology. *Oman J Ophthalmol.* 2009;2(3):108–10.
35. Ku CA, Pennesi ME. Retinal gene therapy: current progress and future prospects. *Expert Rev Ophthalmol.* 2015;10(3):281–99.
36. Liu MM, Tuo J, Chan C-CC. Gene therapy for ocular diseases. *Postgr Med J.* 2011;95(1029):604–12.
37. Oliveira AV, Rosa da Costa AM, Silva GA. Non-viral strategies for ocular gene delivery. *Mater Sci Eng C.* 2017;77:1275–89.
38. Farjo R, Skaggs J, Quiambao AB, Cooper MJ, Naash MI. Efficient non-viral ocular gene transfer with compacted DNA nanoparticles. *PLoS One.* 2006;1(1):38.
39. Petrs-Silva H, Linden R. Advances in gene therapy technologies to treat retinitis pigmentosa. *Clin Ophthalmol.* 2013;8:127–36.
40. www.abedia.com [Internet]. Disponible en: http://www.abedia.com/wiley/search_results.php?TrialCountry=&CategoryMain=Ocular+dis

eases&Vector=&GeneTypes=&Phase=&Status=Open&FinalApprYear=&Submit=%A0%A0Search%A0%A0&page=0

41. Russell S, Bennett J, Wellman JA, Chung DC, Yu ZF, Tillman A, *et al.* Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 2017;390:849-860.
42. Darrow JJ. Luxturna: FDA documents reveal the value of a costly gene therapy. *Drug Discov Today.* 2019.
43. Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties lessons for and from the crypt. *Development.* 1990;110:1001-20.
44. Ramsden CM, Powner MB, Carr A-JF, Smart MJK, Da Cruz L, Coffey PJ. Stem cells in retinal regeneration: past, present and future. *Development.* 2013;140(12):2576-85.
45. Pellegrini G, Golisano O, Paterna P, Lambiase A, Bonini S, Rama P, *et al.* Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *J Cell Biol.* 1999;145(4):769-82.
46. Dua HS, Azuara-Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Surv Ophthalmol.* 2000;44(5):415-25.
47. Dhamodaran K, Subramani M, Ponnalagu M, Shetty R, Das D. Ocular stem cells: a status update! *Stem Cell Res Ther.* 2014;5:1-11.
48. Sangwan VS, Matalia HP, Vemuganti GK, Fatima A, Ifthekar G, Singh S, *et al.* Clinical outcome of autologous cultivated limbal epithelium transplantation. *Indian J Ophthalmol.* 2006;54(1):29-34.
49. O'Sullivan F, Clynes M. Limbal stem cells, a review of their identification and culture for clinical use. *Cytotechnology.* 2007;53(1-3):101-6.
50. Salero E, Blenkinsop TA, Corneo B, Harris A, Rabin D, Stern JH, *et al.* Adult human RPE can be activated into a multipotent stem cell that produces mesenchymal derivatives. *Cell Stem Cell.* 2012;10(1):88-95.
51. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282(5391):1145-7.
52. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663-76.
53. Omole AE, Omotuyi A, Fakoya J. Ten years of progress and promise of induced pluripotent stem cells: historical origins, characteristics, mechanisms, limitations, and potential applications. *Peer J.* 2018;6:4370.
54. Kimbrel EA, Lanza R. Current status of pluripotent stem cells: moving the first therapies to the clinic. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14(10):681-92.

55. Scudellari M. How iPS cells changed the world. *Nature*. 2016;534(7607):310–2.
56. Schwartz SD, Regillo CD, Lam BL, Elliott D, Rosenfeld PJ, Gregori NZ, *et al*. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet*. 2015;385(9967):509–16.
57. Fletcher EL, Jobling AI, Vessey KA, Luu C, Guymer RH, Baird PN. Animal models of retinal disease. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2011;100:211–86.
58. Baehr W, Frederick JM, Moran JA. Naturally occurring animal models with outer retina phenotypes. *Vision Res*. 2009;49:2636–52.
59. Chader GJ. Animal models in research on retinal degenerations: past progress and future hope. *Vision Res*. 2002;42(4):393–9.
60. Bourne MC, Campbell DA, Tansley K. Hereditary degeneration of the rat retina. *Br J Ophthalmol*. 1938;22(10):613–23.
61. Dowling JE, Sidman RL. Inherited retinal dystrophy in the rat. *J Cell Biol*. 1962;14:73–109.
62. Li LX, Turner JE. Inherited retinal dystrophy in the RCS rat: prevention of photoreceptor degeneration by pigment epithelial cell transplantation. *Exp Eye Res*. 1988;47(6):911–7.
63. Lopez R, Gouras P, Kjeldbye H, Sullivan B, Reppucci V, Britfis M, *et al*. Transplanted retinal pigment epithelium modifies the retinal degeneration in the RCS Rat. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1989;30(3):586–8.
64. Lavail MM, Li L, Turner JE, Yasumura D. Retinal pigment epithelial cell transplantation in RCS rats: normal metabolism in rescued photoreceptors. *Exp Eye Res*. 1992;55(4):555–62.
65. Sheedlo HJ, Li LX, Turner JE. Functional and structural characteristics of photoreceptor cells rescued in RPE-cell grafted retinas of RCS dystrophic rats. *Exp Eye Res*. 1989;48(6):841–54.
66. Lund RD, Lawrence JM, Villegas-Pérez MP, Litchfield TM, Sauve Y, Whiteley SJ, *et al*. Retinal degeneration and transplantation in the Royal College of Surgeons rat. *Eye (Lond)*. 1998;12:597–604.
67. Da Cruz L, Chen FK, Ahmado A, Greenwood J, Coffey P. RPE transplantation and its role in retinal disease. *Prog Retin Eye Res*. 2007;26:598–635.
68. Idelson M, Alper R, Obolensky A, Ben-Shushan E, Hemo I, Yachimovich-Cohen N, *et al*. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional retinal pigment epithelium cells. *Cell Stem Cell*. 2009;5(4):396–408.

69. Yanai A, Laver C, Joe A, Viringipurampeer I, Wang X, Gregory-Evans C, *et al.* Differentiation of human embryonic stem cells using size-controlled embryoid bodies and negative cell selection in the production of photoreceptor precursor cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2013;19(10):755–64.
70. Tucker B, Mullins R, Streb L, Anfinson K, Eyestone M, Kaalberg E, *et al.* Patient-specific iPSC-derived photoreceptor precursor cells as a means to investigate retinitis pigmentosa. *Elife*. 2013;2(e00824.001).
71. Warfvinge K, Kamme C, Euglund U, Wictorin K. Retinal integration of grafts of brain-derived precursor cells lines implanted subretinally into adult, normal rats. *Expl Neurol*. 2001;169:1–12.
72. Pijanka JK, Kimball EC, Pease ME, Abass A, Sorensen T, Nguyen TD, *et al.* Changes in scleral collagen organization in murine chronic experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55:6554–64.
73. Bok D, Hall MO. The role of the pigment epithelium in the etiology of inherited retinal dystrophy in the rat. *J Cell Biol*. 1971;49(3):664–82.
74. Kennedy CJ, Rakoczy PE, Constable IJ. Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: a review. *Eye (Lond)*. 1995;9:763–71.
75. Spaide RF. Autofluorescence from the outer retina and subretinal space. *Retina*. 2008;28:5–35.
76. Zhao TT, Tian CY, Yin ZQ. Activation of müller cells occurs during retinal degeneration in RCS rats. *Adv Exp Med Biol*. 2010;575–83.
77. Feng L, Sun Z, Han H, Zhou Y, Zhang M. No age-related cell loss in three retinal nuclear layers of the Long-Evans rat. *Vis Neurosci*. 2007;24(6):799–803.
78. Waldron P V, Di Marco F, Kruczek K, Ribeiro J, Graca AB, Hippert C, *et al.* Transplanted donor or stem cell-derived cone photoreceptors can both integrate and undergo material transfer in an environment dependent manner. *Stem Cell Reports*. 2018;10(2):406–21.
79. Wiley LA, Burnight ER, Songstad AE, Drack A V., Mullins RF, Stone EM, *et al.* Patient-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs) for the study and treatment of retinal degenerative diseases. *Prog Retin Eye Res*. 2015;44:15–35.
80. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861–72.
81. Shi Y, Inoue H, Wu JC, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cell technology: A decade of progress. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(2):115–130.
82. Meyer JS, Katz ML, Maruniak JA, Kirk MD. Embryonic stem cell-derived neural progenitors incorporate into degenerating retina and enhance survival of host photoreceptors. *Stem Cells*. 2006;24(2):274–83.

83. Pearson RA, Barber AC, Rizzi M, Hippert C, Xue T, West EL, *et al.* Restoration of vision after transplantation of photoreceptors. *Nature*. 2012;485(7396):99-103.
84. Smiley S, Nickerson PE, Comanita L, Daftarian N, El-Sehemy A, Tsai ELS, *et al.* Establishment of a cone photoreceptor transplantation platform based on a novel cone-GFP reporter mouse line. *Sci Rep*. 2016;6:22867.
85. Tucker BA, Park IH, Qi SD, Klassen HJ, Jiang C, Yao J, *et al.* Transplantation of adult mouse iPS cell-derived photoreceptor precursors restores retinal structure and function in degenerative mice. *PLoS One*. 2011;6(4):e18992.
86. Lamba DA, Gust J, Reh TA. Transplantation of human embryonic stem cell-derived photoreceptors restores some visual function in Crx-deficient mice. *Cell Stem Cell*. 2009;4(1):73-9.
87. Ortin-Martinez A, Tsai ELS, Nickerson PE, Bergeret M, Lu Y, Smiley S, *et al.* A reinterpretation of cell transplantation: GFP transfer from donor to host photoreceptors. *Stem Cells*. 2017;35(4):932-939.
88. Pearson RA, Gonzalez-Cordero A, West EL, Ribeiro JR, Aghaizu N, Goh D, *et al.* Donor and host photoreceptors engage in material transfer following transplantation of post-mitotic photoreceptor precursors. *Nat Commun*. 2016;7:13029.
89. Santos-Ferreira T, Llonch S, Borsch O, Postel K, Haas J, Ader M. Retinal transplantation of photoreceptors results in donor-host cytoplasmic exchange. *Nat Commun*. 2016;7:13028.
90. Javed A, Cayouette M. Temporal progression of retinal progenitor cell identity: implications in cell replacement therapies. *Front Neural Circuits*. 2017;11:105.
91. Vugler , Carr AJ, Lawrence J, Chen LL, Burrell K, Wright A, *et al.* Elucidating the phenomenon of HESC-derived RPE: anatomy of cell genesis, expansion and retinal transplantation. *Exp Neurol*. 2008;214(2):347-61.
92. MacLaren RE, Pearson RA, MacNeil A, Douglas RH, Salt TE, Akimoto M, *et al.* Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature*. 2006;444(7116):203-7.
93. Turner P V, Brabb T, Pekow C, Vasbinder MA. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2011;50(5):600-13.
94. Ohno-Matsui K, Mori K, Ichinose S, Sato T, Wang J, Shimada N, *et al.* In vitro and in vivo characterization of iris pigment epithelial cells cultured on amniotic membranes. *Mol Vis*. 2006;12:1022-32.
95. Tezel TH, Del Priore L V., Kaplan HJ. Reengineering of aged Bruch's membrane to enhance retinal pigment epithelium repopulation. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(9):3337-48.

96. Kamao H, Mandai M, Okamoto S, Sakai N, Suga A, Sugita S, *et al.* Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium cell sheets aiming for clinical application. *Stem Cell Reports*. 2014;2(2):205-18.
97. Lavik EB, Klassen H, Warfvinge K, Langer R, Young MJ. Fabrication of degradable polymer scaffolds to direct the integration and differentiation of retinal progenitors. *Biomaterials*. 2005;26(16):3187-96.
98. Hynes SR, Lavik EB. A tissue-engineered approach towards retinal repair: Scaffolds for cell transplantation to the subretinal space. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2010;248(6):763-78.
99. Treharne AJ, Gossel MC, Lotery AJ, Thomson HA. The chemistry of retinal transplantation: the influence of polymer scaffold properties on retinal cell adhesion and control. *Br J Ophthalmol*. 2011;95(6):768-73.
100. Kundu J, Michaelson A, Baranov P, Young MJ, Carrier RL. Approaches to cell delivery: substrates and scaffolds for cell therapy. *Dev Ophthalmol*. 2014;53:143-54.
101. Lu B, Zhu D, Hinton D, Humayun MS, Tai YC. Mesh-supported submicron parylene-C membranes for culturing retinal pigment epithelial cells. *Biomed Microdevices*. 2012;14(4):659-667.
102. Surrao DC, Greferath U, Chau Y-Q, Skabo SJ, Huynh M, Shelat KJ, *et al.* Design, development and characterization of synthetic Bruch's membranes. *Acta Biomater*. 2017;64:357-76.
103. Eiraku M, Sasai Y. Mouse embryonic stem cell culture for generation of three-dimensional retinal and cortical tissues. *Nat Protoc*. 2012;7(1):69-79.
104. Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, Kawada M, Sakakura E, Okuda S, *et al.* Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature*. 2011;472(7341):51-6.
105. Lamba DA, Karl MO, Ware CB, Reh TA. Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103(34):12769-74.
106. Nakano T, Ando S, Takata N, Kawada M, Muguruma K, Sekiguchi K, *et al.* Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. *Cell Stem Cell*. 2012;10(6):771-785.
107. Llonch S, Carido M, Ader M. Organoid technology for retinal repair. *Dev Biol*. 2018;433(2):132-43.
108. Georgiadis A, Tschernutter M, Bainbridge JWB, Balaggan KS, Mowat F, West EL, *et al.* The tight junction associated signalling proteins ZO-1 and ZONAB regulate retinal pigment epithelium homeostasis in mice. *PLoS One*. 2010;5(12):e15730.
109. Carr AJ, Vugler AA, Hikita ST, Lawrence JM, Gias C, Chen LL, *et al.* Protective effects of human iPS-derived retinal pigment epithe-

- lium cell transplantation in the retinal dystrophic rat. *PLoS One*. 2009;4(12):e8152.
110. Krohne TU, Westenskow PD, Kurihara T, Friedlander DF, Lehmann M, Dorsey AL, *et al*. Generation of retinal pigment epithelial cells from small molecules and OCT4 reprogrammed human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med*. 2012; 1(2):96-109.
 111. Wu KHC, Madigan MC, Billson FA, Penfold PL. Differential expression of GFAP in early v late AMD: A quantitative analysis. *Br J Ophthalmol*. 2003;87(9):1159-66.
 112. Bravo González RC, Huwyler J, Walter I, Mountfield R, Bittner B. Improved oral bioavailability of cyclosporin A in male Wistar rats: Comparison of a Solutol HS 15 containing self-dispersing formulation and a microsuspension. *Int J Pharm*. 2002;245(1-2):143-51.
 113. Mazanet MM, Neote K, Hughes CCW. Expression of IFN-inducible T cell chemoattractant by human endothelial cells is cyclosporin A-resistant and promotes T cell adhesion: implications for cyclosporin A-resistant immune inflammation. *J Immunol*. 2014;164:5383-5388.
 114. Villegas-Pérez MP, Lawrence JM, Vidal-Sanz M, Lavail MM, Lund RD. Ganglion cell loss in RCS rat retina: A result of compression of axons by contracting intraretinal vessels linked to the pigment epithelium. *J Comp Neurol*. 1998;392(1):58-77.
 115. Zhang X, Bok D. Transplantation of retinal pigment epithelial cells and immune response in the subretinal space. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39(6):1021-7.
 116. Tzameret A, Sher I, Belkin M, Treves AJ, Meir A, Nagler A, *et al*. Transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cells as a thin subretinal layer ameliorates retinal degeneration in a rat model of retinal dystrophy. *Exp Eye Res*. 2014;118:135-44.
 117. Ókva K, Tamoševičiute E, Čižiute A, Pokk P, Rukšenas O, Nevalainen T. Refinements for intragastric *gavage* in rats. *Scand J Lab Anim Sci*. 2006;33:243-252.
 118. Del Priore L V, Ishida O, Johnson EW, Sheng Y, Jacoby DB, Geng L, *et al*. Triple immune suppression increases short-term survival of porcine fetal retinal pigment epithelium xenografts. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(9):4044-53.
 119. Barber AC, Hippert C, Duran Y, West EL, Bainbridge JWB, Warre-Cornish K, *et al*. Repair of the degenerate retina by photoreceptor transplantation. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110(1):354-9.
 120. Li L, Turner JE. Optimal conditions for long-term photoreceptor cell rescue in RCS rats: The necessity for healthy RPE transplants. *Exp Eye Res*. 1991;52(6):669-79.
 121. Wang S, Lu B, Girman S, Holmes T, Bischoff N, Lund RD. Morphological and functional rescue in RCS rats after RPE cell line trans-

- plantation at a later stage of degeneration. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(1):416-21.
122. Cao W, Tombran-Tink J, Elias R, Sezate S, Mrazek D, McGinnis JF. In vivo protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(7):1646-52.
 123. Pang IH, Zeng H, Fleenor DL, Clark AF. Pigment epithelium-derived factor protects retinal ganglion cells. *BMC Neurosci*. 2007;8:11.
 124. Wang NK, Tosi J, Kasanuki JM, Chou CL, Kong J, Parmalee N, *et al*. Transplantation of reprogrammed embryonic stem cells improves visual function in a mouse model for retinitis pigmentosa. *Transplantation*. 2010;89(8):911-9.
 125. Sun J, Mandai M, Kamao H, Hashiguchi T, Shikamura M, Kawamata S, *et al*. Protective effects of human iPS-derived retinal pigmented epithelial cells in comparison with human mesenchymal stromal cells and human neural stem cells on the degenerating retina in rd1 mice. *Stem Cells*. 2015;33(5):1543-53.
 126. Pearson RA, Gonzalez-Cordero A, West EL, Ribeiro JR, Aghaizu N, Goh D, *et al*. Donor and host photoreceptors engage in material transfer following transplantation of post-mitotic photoreceptor precursors. *Nat Commun*. 2016; 7:13029.
 127. Singh MS, Balmer J, Barnard AR, Aslam SA, Moralli D, Green CM, *et al*. Transplanted photoreceptor precursors transfer proteins to host photoreceptors by a mechanism of cytoplasmic fusion. *Nat Commun*. 2016;7:13537.
 128. Singh MS, Charbel Issa P, Butler R, Martin C, Lipinski DM, Sekaran S, *et al*. Reversal of end-stage retinal degeneration and restoration of visual function by photoreceptor transplantation. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110(3):1101-6.
 129. Thompson DA, Gyurus P, Fleischer LL, Bingham EL, McHenry CL, Apfelstedt-Sylla E, *et al*. Genetics and phenotypes of RPE65 mutations in inherited retinal degeneration. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(13):4293-9.
 130. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, *et al*. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013; 339(6121):819-823.
 131. Yu W, Mookherjee S, Chaitankar V, Hiriyantha S, Kim JW, Brooks M, *et al*. Nr1 knockdown by AAV-delivered CRISPR/Cas9 prevents retinal degeneration in mice. *Nat Commun*. 2017;8:14716.
 132. Bakondi B, Lv W, Lu B, Jones MK, Tsai Y, Kim KJ, *et al*. In vivo CRISPR/Cas9 gene editing corrects retinal dystrophy in the S334ter-3 rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Mol Ther*. 2016; 24(3):556-63.

133. Burnight ER, Gupta M, Wiley LA, Anfinson KR, Tran A, Triboulet R, *et al.* Using CRISPR-Cas9 to generate gene-corrected autologous iPSCs for the treatment of inherited retinal degeneration. *Mol Ther.* 2017; 25(9):1999-2013.
134. Deng WL, Gao ML, Lei XL, Lv JN, Zhao H, He KW, *et al.* Gene correction reverses ciliopathy and photoreceptor loss in iPSC-derived retinal organoids from retinitis pigmentosa patients. *Stem Cell Reports.* 2018;10(6):2005.

Sobre la autora

DIANA MORA RAMÍREZ es licenciada en Medicina y Cirugía por la Universidad Militar Nueva Granada de Bogotá (Colombia) y posteriormente obtuvo una plaza MIR de residente de Oftalmología en el Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona.

Es adjunta de la sección glaucoma en el Consorci Sanitari Integral (Hospital General de L'Hospitalet / Hospital Sant Joan Despí Moisés Broggi) desde el 2015.

