

Inmunoliposomas y Células Madre

Terapia de enfermedades degenerativas retinianas

Las enfermedades degenerativas retinianas, como la degeneración macular asociada a la edad, la retinopatía diabética y la retinosis pigmentaria, son las principales causas de ceguera. Numerosos genes están implicados en la retinosis pigmentaria, sin embargo, en el 50 % de los casos, se desconoce la base genética de esta enfermedad. Muchas de las enfermedades retinianas que conllevan a la ceguera se basan en alteraciones genéticas de diversas proteínas relacionadas con la fototransducción. La expresión de genes mutados da lugar a proteínas mal plegadas o a su localización anormal. Estas proteínas en los fotorreceptores resultan tóxicas o impiden el perfecto apilamiento de los discos en los segmentos externos, dando lugar a la muerte celular a través de un mecanismo de apoptosis. Por otra parte, el anormal funcionamiento de las células del epitelio pigmentario involucradas en el reciclado del 11-cis-retinaldehído, puede dar lugar a alteraciones en la fagocitosis de los discos externos de los fotorreceptores y a su degeneración.

Para poder restaurar el normal funcionamiento de estas células se han utilizado varias aproxi-

maciones en aras a llevar a cabo una terapia de estas enfermedades. En los primeros intentos de reparar la retina se realizaron trasplantes de células o de porciones de retina entera. En primer lugar se realizaron trasplantes usando fotorreceptores adultos en retinas de ratones distróficos. Aunque estos fotorreceptores sobrevivían en la retina, no establecían conexiones sinápticas adecuadas. Utilizando trasplantes de células del epitelio pigmentario adultas en el espacio subretiniano hemos observado en colaboración con el doctor Ray Lund de la Universidad de Utah, (Association for Research in Vision and Ophthalmology, ARVO 2004), un descenso de la degeneración de los fotorreceptores y distintos tipos de neuronas retinianas, aunque solamente en el área del trasplante.

También se han utilizado una serie de factores neurotróficos que, conjuntamente con la expresión de algunos genes reguladores son capaces de promover la proliferación y diferenciación de células progenitoras durante el desarrollo de la retina. La utilización de células encapsuladas para la liberación de sustancias neurotróficas

también ha sido utilizada con resultados esperanzadores. El encapsulado de células en pequeñas cápsulas con células que liberan el factor ciliar neurotrófico (CNTF) se ha demostrado que, aunque no cura la enfermedad ralentiza la degeneración neuronal en la amaurosis congénita de Leber (LCA)

Terapia génica: Inmunoliposomas

Durante los últimos 10 años, la terapia génica utilizando virus como vectores ha avanzado enormemente, con resultados exitosos, como es el caso de la amaurosis congénita de Leber en perros. Esta terapia consiste en introducir en las células dañadas (fotorreceptores o células del epitelio pigmentario) un fragmento de ADN con el gen normal correspondiente la proteína alterada. El medio de transporte que se utiliza son virus en los que se introduce el ADN normal que al infectar las células de la retina liberan el gen en su interior.

Hay que considerar varios aspectos en este tipo de terapia. En primer lugar, tiene que ser individualizada, es decir, hay

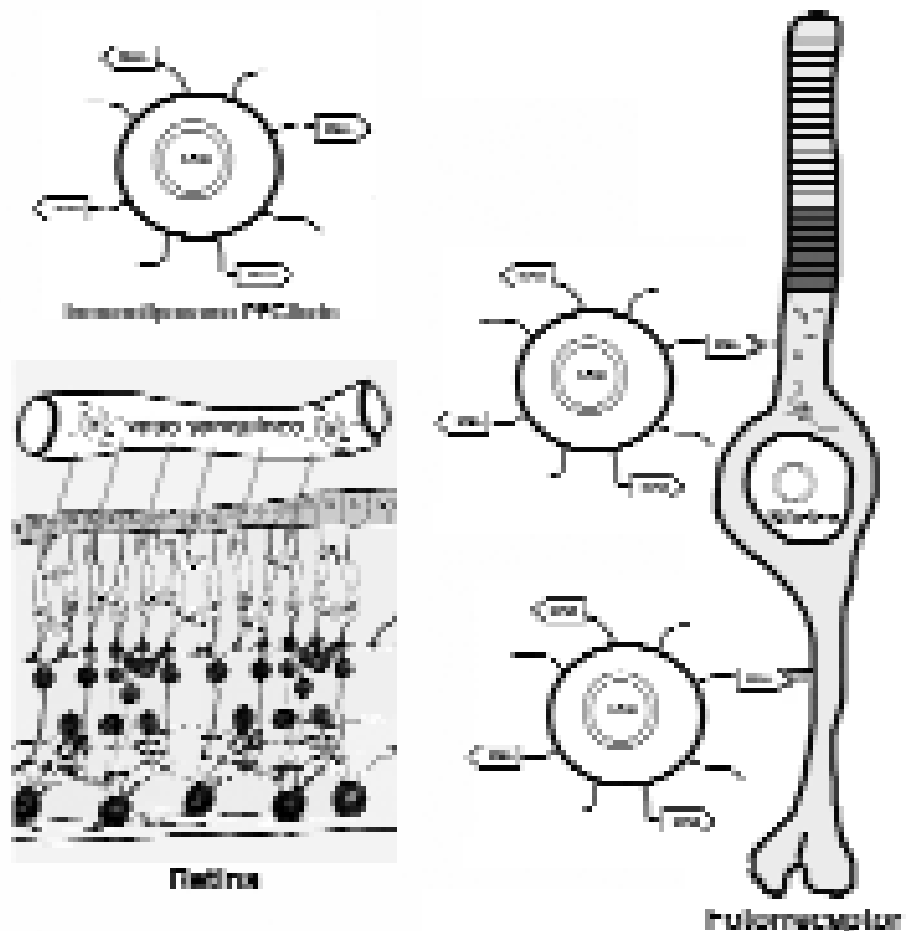
que conocer el gen mutado en cada individuo para realizar una terapia específica. Por otra parte, hay que conocer el momento adecuado para realizar la terapia. Durante mucho tiempo se pensó que la falta de fotorreceptores no alteraba el resto de la retina. Nuestros estudios sobre el desarrollo de la retina, en un modelo animal de retinosis pigmentaria en ratas P23H, (Pinilla y cols. ARVO 2004) nos indican que la degeneración de los fotorreceptores implican una remodelación de los demás tipos de neuronas de la retina, y de la conectividad sináptica de los circuitos neuronales retinianos. El establecimiento del grado de degeneración de cada patología es muy importante para determinar el momento adecuado de realizar la terapia génica. Por otra parte, esta terapia utilizando vectores virales tiene algunos inconvenientes que hacen difícil su utilización en algunos casos. Algunos genes tienen un tamaño demasiado grande como para ser introducido en un vector viral y además produce reacciones inmunológicas e inflamatorias no deseadas. En la mayoría de los casos es necesario la inyección de los virus en el espacio subretiniano para que puedan acceder a las células a las que va dirigida la terapia. Esto conlleva dos problemas: el primero es que se produce un desprendimiento de la retina y el segundo es que solamente en el área donde se ha realizado la inyección es efectiva la terapia y, como consecuencia la recuperación de la visión se da en áreas pequeñas de la retina. Por último, una vez se ha introducido con éxito el gen normal en la célula, es posible que se exista

una producción en exceso de la nueva proteína que resulte tóxica y lleve a la muerte de la célula.

Se sigue investigando la terapia génica con vectores virales fundamentalmente adenovirus. Sin embargo, como alternativa se está empezando a investigar con vectores no víricos en la terapia génica, los denominados inmunoliposomas PEGilados. Estos consisten en una membrana celular artificial o liposoma (doble capa lipídica) a la que se le añade moléculas de polietilenglicol (PEG) en la superficie del liposoma y a estas se les unen anticuerpos específicos. Dentro de estos liposomas se encapsula al gen normal con el que queremos realizar la terapia. Los anticuerpos elegidos reconocen antígenos que están presentes en la barrera hemato-retiniana y en la membrana de las células retinianas. Los inmunoliposomas se unen a las células

específicas y liberan el ADN cuya expresión del gen normal dará lugar a la proteína sana.

Las ventajas de este sistema son las siguientes: en primer lugar los inmunoliposomas pueden ser inyectados por vía intravenosa, ya que son capaces de atravesar la barrera hemato-retiniana, la recuperación visual se realizará en toda la superficie de la retina reconocida por el anticuerpo y específicamente en el tipo celular retiniano en el que se encuentre el antígeno. Por otra parte, en estos inmunoliposomas es factible encapsular ADN de gran tamaño, por lo que se podrá realizar terapia de un amplio número de enfermedades y además, se evitarían rechazos inmunológicos. Esta terapia ha sido realizada recientemente en ratones con alteraciones en las células del epitelio pigmentario RPE65. (Travis y cols. ARVO 2004).



Terapia celular: Células madre

Los procesos de neurogeneración y regeneración de la retina han sido bien establecidos en peces, anfibios y aves, pero tradicionalmente se ha pensado que no existen en la retina de mamíferos adultos.

En peces, anfibios y aves, las células madre localizadas en la zona de transición entre el cuerpo ciliar y la retina, denominada zona marginal ciliar, son capaces de añadir nuevas neuronas durante toda la vida del animal y regenerar la retina completa bajo determinadas condiciones experimentales, como por ejemplo una lesión. En el año 2000 el grupo del doctor Ahmad de la Universidad de Nebraska, identificó células progenitoras en el cuerpo ciliar de roedores. Estas células se multiplicaban en cultivo formando colonias esféricas, denominadas neuroesferas, que tienen capacidad para diferenciarse en tipos específicos de neuronas retinianas incluyendo fotorreceptores, amacrinas, bipolares y células de Müller,

En la retina periférica humana hemos determinado (Cuenca y cols. ARVO 2004) que existe una zona de transición, denominada retina no laminada, entre la retina propiamente dicha y el cuerpo ciliar en donde tienen lugar procesos de diferenciación celular

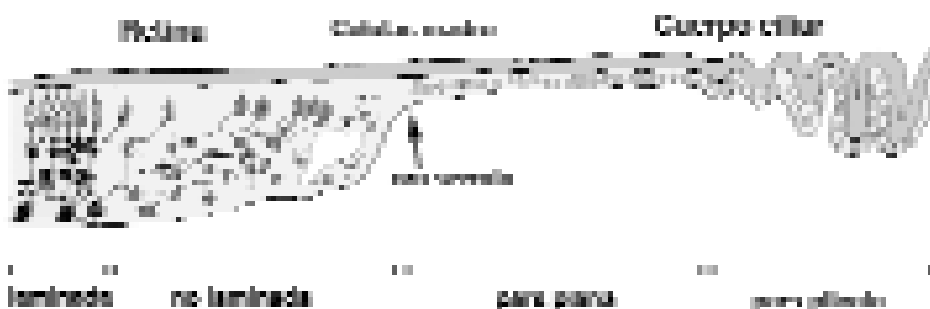
En esta zona como en la pars plana del cuerpo ciliar de animales adultos tanto en monos como en humanos hemos identificado células madre, así como diversos tipos de células indiferenciadas que expresan diversos marcadores específicos de neuronas adultas retinianas. Estas últimas experimentan una maduración progresiva al avanzar desde la ora serrata hacia la retina periférica laminada. Estos resultados sugieren que la zona comprendida entre la pars plana del cuerpo ciliar y el inicio de la retina periférica constituye una región donde tiene lugar la generación de nuevas neuronas mediante la diferenciación de células madre del cuerpo ciliar en los distintos tipos celulares de la retina de humanos adultos. Esta zona podría ser la equivalente a la zona marginal ciliar descrita en otros vertebrados inferiores. La identificación de células madre en la retina de humanos es un importante hallazgo que abre la vía para el tratamiento de enfermedades neurogenerativas de la retina en el futuro.

Los trasplantes de células madre ya han sido utilizados con resultados esperanzadores en algunos mamíferos. El trasplante de neuroesferas en roedores y de células progenitoras del hipocampo en el marsupial opossum y en ratones con retinosis pigmentaria (rd), han mos-

trado una buena integración celular en la retina. Estas células expresan marcadores retinianos específicos, sin embargo, no experimentan una completa diferenciación en neuronas retinianas. En la actualidad se desconoce si estas células realizan contactos sinápticos adecuados y si son funcionalmente activas lo cual constituiría un requisito para una terapia efectiva.

Recientemente el grupo de la doctora Takahashi (ARVO 2004) de la Universidad de Kyoto ha transplantedo en el espacio subretiniano células del epitelio pigmentario, conseguidas a partir de células madre embrionarias ES de mono, en ratas ciegas RCS (Royal College of Surgeons) que tienen alterado el proceso de fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores. La morfología y fisiología de las células transplantedas fue normal así como la recuperación de los fotorreceptores. Los test de comportamiento demostraron una recuperación de las funciones visuales en estos animales. Este es el primer estudio que demuestra satisfactoriamente la aplicación terapéutica de células ES de primates en modelos animales.

El trasplante de células madre y la estimulación de su diferenciación con factores neurotróficos conjuntamente con la utilización de inmunoliposomas abre nuevas líneas de investigación que podrían constituir la llave para la reparación de la retina.



Nicolás Cuenca Navarro.
Departamento de Biotecnología
Universidad de Alicante