

# Design of an *in vitro* model of the Outer Blood Retinal Barrier

---

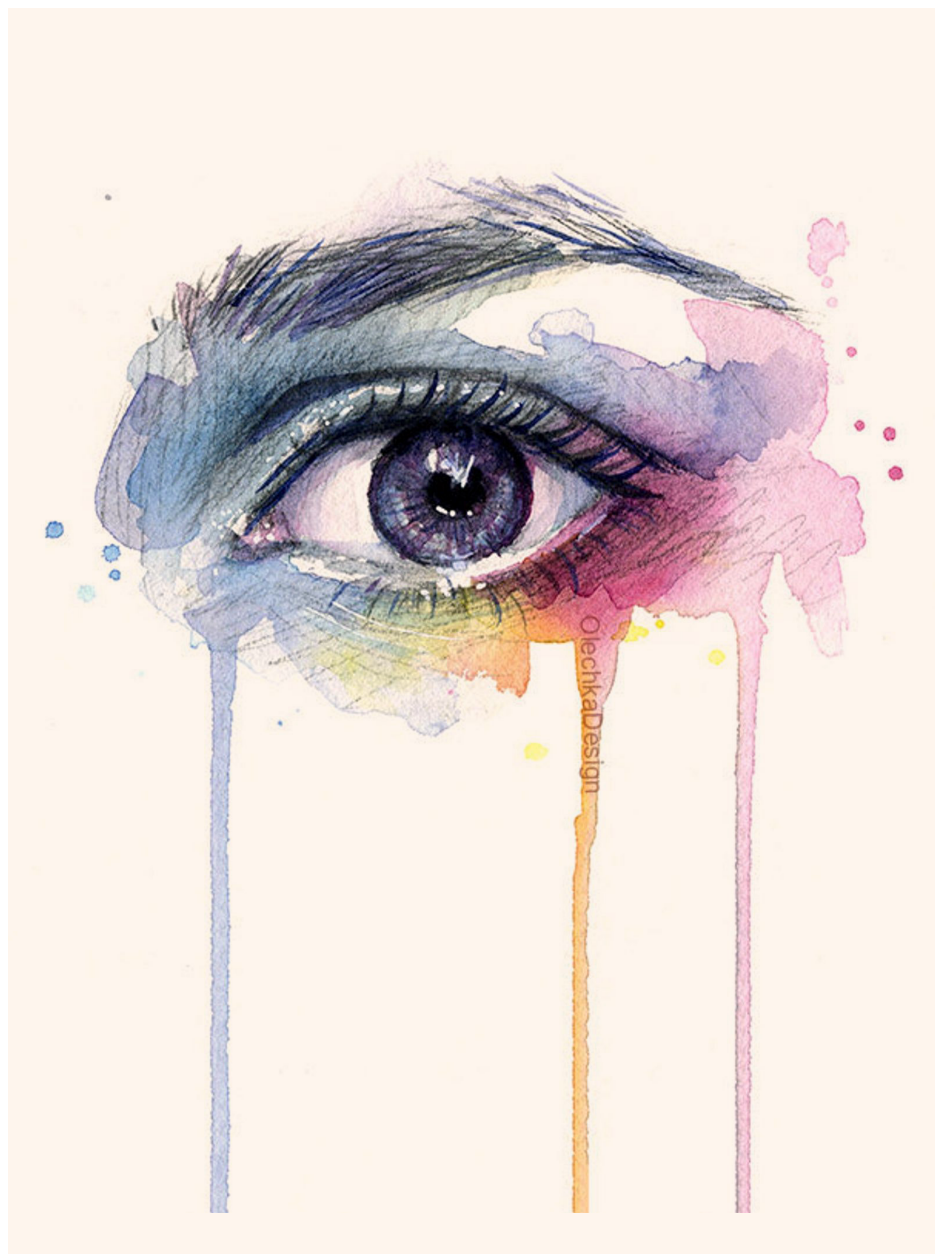
## Presentació

El meu treball de recerca ha estat molt enfocat cap a l'àrea de la salut, especialment el tractament i la cura de malalties. Sabia que volia fer un treball experimental, preferiblement en un laboratori. Per aquest motiu, quan em van donar l'oportunitat de participar en un projecte relacionat amb el desenvolupament d'un model *in vitro* de cèl·lules oculars no m'ho vaig pensar dues vegades.

En aquest treball hem volgut centrar-nos en la degeneració macular. La degeneració macular associada a l'edat és una malaltia ocular degenerativa que afecta la màcula i és la principal causa de ceguesa en els països desenvolupats. És causada pel trencament de les unions estretes que formen la barrera hematorretiniana. Els tractaments que existeixen, però, són pal·liatius i no estan enfocats a totes les formes que pot presentar la malaltia. Cal més recerca per a trobar nous tractaments o millorar els existents, però la situació dels teixits impossibilita fer experiments *in vivo*.

Per aquest motiu, cal establir bons models *in vitro* que desenvolupin una funció de barrera adequada. Amb tot, els models existents no s'acaben d'ajustar a la realitat. En aquest treball vaig decidir intentar millorar un model cel·lular ja existent en format de monocultiu tot afegint-hi una segona línia cel·lular i transformant-lo en un cocultiu.

---



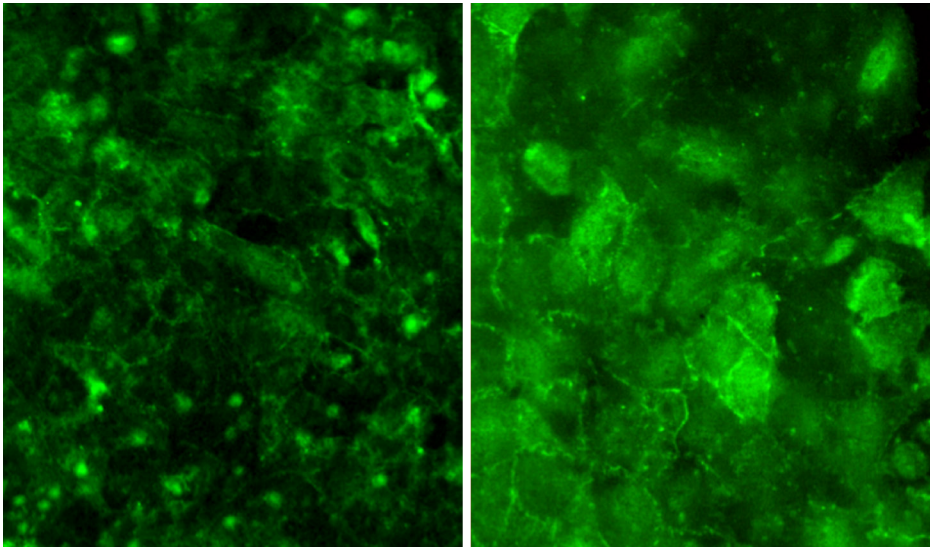


Figura 1. Comparativa de la presència de ZO-1 en el monocultiu de cèl·lules HRMEC (esquerra) i en el cocultiu de cèl·lules HRMEC i ARPE-19.

---

## **Metodologia**

Per a aquest treball vaig seguir el mètode científic. En primer lloc, vaig determinar una àrea d'estudi, l'anatomia de l'ull, la barrera hematorretiniana i la seva formació. Seguidament, vaig realitzar una hipòtesi que després vaig comprovar a través d'experiments. En el meu cas, que la incorporació de cèl·lules de l'epiteli pigmentari de la retina a un model actual de la barrera hematorretiniana format per un monocultiu de cèl·lules microvasculars retinals resultaria en l'establiment d'un model més fiable on es formessin unions estretes i que manifestés funcions de barrera. En darrer lloc vaig analitzar els resultats obtinguts i vaig extreure les conclusions per desmentir o afirmar la meua hipòtesi inicial.

## **Cos del treball**

L'ull humà és un òrgan sensible a la llum. La seva funció principal és convertir la llum que li arriba en senyals elèctrics que són enviats al cervell per crear una imatge del que l'envolta. Està compost per diverses parts. L'epiteli pigmentari de la retina és una capa de cèl·lules que actuen com a barrera per controlar la difusió indiscriminada de materials des de la sang a la coroides cap a la retina. La barrera hematorretiniana és una barrera restrictiva que regula el flux d'ions, proteïnes,

---

---

cèl·lules i aigua a dins de la retina. La barrera hematorretiniana exterior s'estableix gràcies a les unions estretes entre les cèl·lules de l'epiteli pigmentari de la retina i regula el moviment de soluts i nutrients entre els capil·lars de la coroides i la retina. Està composta per una monocapa de cèl·lules de l'epiteli pigmentari de la retina o cèl·lules RPE. Les unions estretes són unions intercel·lulars que formen barreres contínues entre cèl·lules epitelials per regular el moviment selectiu de soluts a través de l'epiteli. Les proteïnes Zonula Occludens tenen un paper crític en la formació i organització de les unions estretes i hi ha tres isoformes descrites: ZO-1, ZO-2 i ZO-3. L'estudi de patologies que pertorben la barrera hematorretiniana han mostrat una relació entre la pèrdua o la reducció de ZO-1 i l'increment de la permeabilitat dels teixits.

La degeneració macular associada a l'edat o DMAE és una malaltia degenerativa de la retina que causa una pèrdua gradual i irreversible de la visió en la població d'edat avançada. Aquesta malaltia es caracteritza per produir alteracions a la màcula, la zona central de la retina. Qualsevol modificació o canvi en aquesta zona causa problemes visuals que s'associen amb la degeneració de la barrera hematorretiniana exterior. La conseqüència més important és la posterior degeneració de les cèl·lules fotoreceptores. Tots els tractaments existents són pal·liatius i cal descobrir-ne de nous.

L'objectiu d'aquest projecte va ser la creació d'un model de la barrera hematorretiniana exterior més realista utilitzant cèl·lules de l'ull. Per poder establir el cocultiu es van utilitzar els suports Transwell® de Corning. Aquests consisteixen en una membrana porosa que està en un suport dissenyat per a ser utilitzat amb les plaques de Corning. Les cèl·lules utilitzades en aquest projecte van ser cèl·lules de l'ull humà, les Adult Retinal Pigment Epithelial Cells o ARPE-19 i les Human Retinal Microvascular Endothelial Cells o HRMEC. Es van realitzar monocultius i cocultius dels dos tipus de cèl·lules i els cultius van ser analitzats sota el microscopi de fluorescència per tal de determinar l'expressió de la proteïna ZO-1 i veure en quin model s'havien format més unions estretes. Això va permetre discernir quin model feia millor la funció de barrera que volíem replicar.

## **Conclusions**

La primera conclusió que es va extreure dels experiments va ser que ni les ARPE-19 ni les HRMEC van ser afectades negativament per la presència d'una altra línia cel·lular. És important destacar que la presència de ZO-1 en les cèl·lules HRMEC del cocultiu va ser més alta que en el monocultiu, com es pot veure, per exemple, en la comparativa de la figura 1.

Això podria significar que la presència de cèl·lules ARPE-19 ajudaria a formar més unions estretes en els cocultius amb HRMEC en comparació amb les que es forma-

---

---

rien en un monocultiu. Per tant, vam poder confirmar la hipòtesi inicial del treball ja que els cocultius de cèl·lules ARPE-19 amb cèl·lules HRMEC van produir un model *in vitro* millorat de la barrera hematorretiniana exterior en comparació amb els models anteriors de monocultius *in vitro* d'HRMEC.

### **Bibliografia i webgrafia**

LLIBRES I ARTICLES: — Díaz-Coránguez, M.; Ramos, C.; Antonetti, D. A. «The inner blood-retinal barrier: Cellular basis and development». *Vision Res.* 2017;139:123-137. doi:10.1016/j.visres.2017.05.009 — Cunha-Vaz, J.; Bernardes, R.; Lobo, C. «Blood-retinal barrier». *Eur J Ophthalmol.* 2011;21(SUPPL.6):3-9. doi:10.5301/EJO.2010.6049 — Campbell, M.; Humphries, P. «The blood-retina barrier: tight junctions and barrier modulation». *Adv Exp Med Biol.* 2013;763:70-84. doi:10.1007/978-1-4614-4711-5\_3 — Hosoya, K.; Tachikawa, M. *The Inner Blood-Retinal Barrier: Molecular Structure and Transport Biology*, 85-86. — Hamilton, R. D.; Foss, A. J.; Leach, L. «Establishment of a human in vitro model of the outer blood-retinal barrier». *J Anat.* 2007;211(6):707-716. doi:10.1111/j.14697580.2007.00812.x — Anderson, J. M.; Van Itallie, C. M. «Physiology and Function of the Tight Junction». *Ital J Gastroenterol Hepatol.* 2009. — Steed, E.; Balda, M. S.; Matter, K. «Dynamics and functions of tight junctions». *Trends Cell Biol.* 2010;20(3):142-149. doi:10.1016/j.tcb.2009.12.002 — Vadlapudi, A. D.; Patel, A. ; Cholkar, K.; Mitra, A. K. «Recent patents on emerging therapeutics for the treatment of glaucoma, age related macular degeneration and uveitis». *Recent Pat Biomed Eng.* 2012;5(1):83-101. doi:10.2174/1874764711205010083 — Coleman, H. R.; Chan, C. C.; Ferris, F. L.; Chew, E. Y. «Age-related macular degeneration». *Lancet.* 2008;372(9652):1835-1845. doi:10.1016/S0140-6736(08)61759-6 — Ambati, J.; Atkinson, J.P.; Gelfand, B.D. «Immunology of age-related macular degeneration». *Nat Rev Immunol.* 2013;13(6):438-451. doi:10.1038/nri3459 — Khandhadia, S.; Cipriani, V.; Yates, J. R. W.; Lotery, A. J. «Age-related macular degeneration and the complement system». *Immunobiology.* 2012;217(2):127-146. doi:10.1016/j.imbio.2011.07.019. WEBS: — Perkins, E. S.; Davson, H. «Human eye». *Encyclopædia Britannica.* <<https://www.britannica.com/science/human-eye>>. Published 2018. [Consulta: 12 desembre 2019]

---