

Trasplante de tejido retiniano y de células progenitoras retinianas: una promesa terapéutica para pacientes con enfermedad de la retina

Diana Estefanía Jiménez Guerrero¹

RESUMEN

La retinopatía diabética, la degeneración macular relacionada con la edad y la retinitis pigmentosa son las enfermedades retinianas más frecuentes en todo el mundo. A pesar de no contar con suficientes estudios que demuestren resultados funcionales positivos en cuanto a recuperar la función visual, el uso de células madre y células progenitoras retinianas y el trasplante de retina fetal parecen bastante promisorios. Hasta el momento no se han podido obtener resultados positivos sobre la funcionalidad de las células trasplantadas, pero sí se ha demostrado que el procedimiento para transferir el tejido retiniano es seguro y confiable. Aún no se ha intentado en seres humanos el trasplante de células progenitoras retinianas, pero dicho trasplante ha dado resultados satisfactorios en modelos murinos. Los estudios con células progenitoras retinianas han logrado demostrar en modelos murinos que se activan y expresan los fotorreceptores. Existen algunas barreras de disponibilidad para el uso de células progenitoras retinianas, que se deben superar con el fin de adelantar estudios que permitan aumentar las posibilidades de integración y diferenciación de dichas células hacia fotorreceptores.

Palabras clave

Células madre, Células progenitoras retinianas, Fotorreceptores, Trasplante de retina

SUMMARY

Retinal tissue transplantation and retinal progenitor cells: A therapeutic promise for patients with retinal disease

Worldwide, diabetic retinopathy, age-related macular degeneration, and retinitis pigmentosa have the highest incidence rate among retinal diseases. Despite the lack of enough trials demonstrating positive functional results on eyesight recovery, the use of stem cells, retinal progenitor cells, and fetal retinal tissue transplantation seem very promising. So far positive results on the functionality of the transplanted cells have not been obtained. However, the safety and reliability of the procedure to transfer retinal tissue have been demonstrated. Transplantation of retinal progenitor cells has not been tried on human beings, but there have been satisfactory

¹ Médica general, Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia. Residente de primer año de Oftalmología, Universidad CES, Medellín, Colombia.
Correspondencia: Diana Estefanía Jiménez Guerrero hey_missdeejay@yahoo.com

Recibido: enero 09 de 2009
Aceptado: agosto 03 de 2009

results with it in murine models. Trials with retinal progenitor cells have demonstrated activation and expression of photoreceptors in murine models. Some barriers of availability exist for the use of retinal progenitor cells that must be overcome in order to carry out studies to increase the possibility of their integration and differentiation towards photoreceptors.

Keywords

Photoreceptors, Retinal progenitor cells, Retinal transplantation, Stem cells

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades retinianas de mayor incidencia global son: la retinopatía diabética, la degeneración macular relacionada con la edad y la retinitis pigmentosa. Una encuesta dirigida por la Fundación Americana para los Ciegos halló que los diabéticos le tienen más temor a quedar ciegos que a la muerte prematura.^{1,2}

La Organización Mundial de la Salud calculó en 2002 que 8,7% de las personas ciegas en el mundo padecían degeneración macular. La prevalencia de las formas avanzadas de esta enfermedad aumenta con cada decenio después de los 50 años y llega al máximo después de los 80.³ En los Estados Unidos la tasa de prevalencia de la forma neovascular es de 0,1% en las personas de 43 a 54 años de edad, y aumenta a 7,1% en los mayores de 75 años. En cuanto a la forma no neovascular, las tasas de prevalencia en los mismos grupos de edad son de 8 y 30%, respectivamente.⁴ Los factores de riesgo reconocidos para el desarrollo de esta enfermedad incluyen: antecedentes familiares de la misma, edad avanzada, tabaquismo, baja ingesta dietética o bajas concentraciones plasmáticas de vitaminas antioxidantes y de zinc, y raza caucásica (mayor probabilidad de desarrollar la degeneración macular *húmeda*, que es la de peor pronóstico); otros posibles factores de riesgo serían: el sexo femenino, iris claros, enfermedad cardiovascular y exposición prolongada a la luz solar.⁵

La degeneración macular se clasifica en dos tipos: el primero es la degeneración no neovascular o seca, en la cual se observan drusas (excrecencias hialinas en la capa de Bruch de la coroides) y la alteración visual es mínima. Las drusas mayores de 63 μm , que por lo general son blandas, implican un riesgo posterior de degeneración neovascular o húmeda o de atrofia geográfica.⁵ Las

drusas duras son menores de 63 μm y se acompañan de hiperpigmentación del epitelio pigmentario retiniano. Estas últimas son de baja gravedad, no causan pérdida marcada de la agudeza visual, pero pueden asociarse con leve metamorfopsia (cambio en la forma de los objetos visualizados), pérdida de la velocidad lectora y sensibilidad de contrastes afectada. La degeneración no neovascular por lo general avanza a la forma de atrofia geográfica. Esta consiste en áreas bien delineadas de hipopigmentación o despigmentación foveal, debido a ausencia o atenuación grave del epitelio pigmentario retiniano. La mayoría de estas lesiones ocurren en patrones correspondientes a la regresión de drusas previas. En la forma neovascular hay desprendimiento retiniano seroso o hemorrágico y neovascularización coroidea, lo que causa escape de suero y sangre, edema macular, decoloración y cicatrices disciformes.^{3,6}

El tratamiento actual incluye la fotocoagulación con láser de la neovascularización coroidea. Este procedimiento tiene la desventaja que al incidir el rayo láser sobre la mácula puede destruirla, causando mayor pérdida de la visión.⁷ Actualmente se están utilizando diversos inhibidores del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, por la sigla de *Vascular endothelial growth factor*) como los siguientes: el pegaptanib (el primero que se usó), el ranibizumab (que se encuentra en estudio de fase III), la VEGF-trap (una proteína de fusión recombinante humana, que se une al receptor del VEGF bloqueando su unión, con lo que le impide llevar a cabo su función angiogénica, actualmente en estudio de fase I/II), el Sirna-027 (por la sigla de *Short interfering RNA*) es un ARN modificado que interfiere la producción del VEGF porque inhibe la transcripción genética (se encuentra en estudio de fase II) y el mesilato de ruboxistaurina (un inhibidor selectivo de la isoforma β de la fosfoquinasa C, PKC, por la sigla de *phosphokinase C*).⁸ Se están estudiando otros métodos, como la terapia fotodinámica que induce la producción local de aniones superóxido y de otras especies reactivas del oxígeno para la destrucción de la neovascularización. Alternativas de tratamiento aún por desarrollar son: la cirugía submacular, la radioterapia con rayo externo, la translocación retiniana prequirúrgica o prefotocoagulativa, la prótesis electrónica y la terapia génica.⁵ A excepción de las dos últimas, todas las anteriores causan destrucción, no solo de la proliferación vascular patológica, sino también de las

células normofuncionantes de la retina. Otras dos técnicas, que motivan esta revisión, están surgiendo con vigor: el trasplante de retina y el uso de células madre o de células progenitoras de la retina, pues han demostrado ser procedimientos seguros, sin daños colaterales a la retina, pero deben ser perfeccionados para obtener mejores resultados en los seres humanos.

TRASPLANTE DE RETINA

El primer trasplante retiniano lo hizo Tansley en 1946.⁹ Demostró rasgos de diferenciación retiniana en tejido ocular embrionario trasplantado a los cerebros de ratas jóvenes. Turner¹⁰ consiguió hacer un trasplante usando tejido retiniano de ratas neonatales y evidenció posteriormente aceptación, diferenciación y supervivencia del injerto. Se observó además que cuanto más joven era el organismo donante del tejido más exitosa era la supervivencia del injerto, siempre y cuando el tejido obtenido no fuera muy inmaduro (por ejemplo, menor de 16 semanas de gestación, en el caso de un estudio llevado a cabo con neurorretinas de conejos).¹¹ Debido a estos resultados, desde ese momento la gran mayoría de los estudios que se llevan a cabo tanto en animales como en seres humanos utilizan retinas fetales, no neonatales.

No se han podido obtener datos que indiquen una mejoría en la funcionalidad de la retina trasplantada; pero sí se ha demostrado, por los estudios de Humayun y colaboradores,¹² que el procedimiento para transferir el tejido retiniano es seguro y confiable, y no se ha documentado rechazo del injerto por parte del receptor, ni muerte de las células del mismo por apoptosis o por cualquier otra forma de anulación de su actividad.¹² Uno de los procedimientos consiste en usar una suspensión de microagregados del tejido retiniano del donante, lo cual es menos traumático al inyectarlo al receptor; sin embargo, en varios casos, los microagregados no han podido organizarse en capas retinianas, sino que se aglutinan.¹³ Una técnica que evita el problema de la aglutinación es la de preparar hojas de fotorreceptores, ya sea usando un vibrátomo¹⁴ o haciendo ablación con láser excimer,¹⁵ pero estos son procedimientos más difíciles.

En modelos animales se ha logrado establecer sinapsis nerviosas entre las células fotorreceptoras implantadas

y las nativas¹⁶ pero sin verdadera mejoría de la visión; solo se ha obtenido mejoría en términos de percepción de la luz, pero no en cuanto a seguir movimientos, percibir formas y ver en tres dimensiones.¹⁶

La edad gestacional óptima para extraer el tejido retiniano, según Ghosh y colaboradores,¹¹ es entre las 14 y 16 semanas. Según O'Brien y colaboradores,¹⁷ aparentemente esto se debe a que a esa edad es cuando las células precursoras ya han generado fotorreceptores de los tipos bastón y cono. Ese período coincide con la época ideal para extraer células progenitoras retinianas, pero el límite inferior de tiempo se extiende solo hasta la undécima semana de gestación, porque los fotorreceptores de tipo cono comienzan a aparecer entre las semanas décima y undécima.¹⁷ Los fetos usados para estos estudios son producto de mujeres embarazadas a quienes se les han practicado abortos terapéuticos.

Los estudios de estas terapias en humanos aún no han dado resultados óptimos. Humayun y colaboradores¹² hicieron trasplantes de retina fetal a pacientes con retinitis pigmentosa y degeneración macular relacionada con la edad, ambas en etapas ya avanzadas de degeneración. A los dos meses de haber trasplantado las retinas, encontraron ligera mejoría en el umbral de adaptación a la oscuridad de algunos pacientes, la cual desapareció en la mayoría entre los 3 y 13 meses. También hubo cambios transitorios en la electroretinografía (ERG) y en la oftalmoscopia de escaneo láser de algunos pacientes en el período posoperatorio inmediato, pero dejaron de ser evidentes a los 3-4 meses. Otros estudios han reproducido estos resultados.^{18,19}

En los modelos murinos se han documentado cambios en los comportamientos de los animales a la estimulación lumínica después del trasplante de retina pero no con la inyección de células madre retinianas u otros productos neuronales.²⁰ Aún falta evaluar nuevas técnicas como trasplantes repetidos e inducción de la secreción de proteínas propias del tejido para aumentar las posibilidades de conexión sináptica adecuada entre el injerto y su receptor. Los resultados obtenidos en modelos murinos prometen futuros avances, por lo que no se puede descartar la posibilidad de que algún día se llegue a hacer estos trasplantes con resultados favorables en humanos.

CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS, PROGENITORES RETINIANOS, ESTIMULANTES DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Se define a las células madre como las que tienen capacidades clonogénica y autorrenovadora y que se diferencian en múltiples líneas celulares. Las tienen tanto los embriones como los adultos; las células madre embrionarias tienen la capacidad de generar cualquier célula terminalmente diferenciada, mientras que las de los adultos solo pueden diferenciarse en células del tejido embrionario específico donde se encuentran localizadas.²¹⁻²³ Los estudios iniciales *in vivo* se efectuaron con células marcadas y no seleccionadas, derivadas de la médula ósea.²⁴ Luego de trasplantar esas células en animales se ha observado que se pueden obtener, dependiendo de las condiciones, diferentes tejidos como fibras musculares,²⁵ hepatocitos,²⁶ microglia y astrogliá²⁷ y tejido neuronal.²⁸ Actualmente muchas áreas de la medicina están explorando cómo utilizar estas propiedades de las células madre para beneficio de los pacientes; los avances más notables han sido en neurología y cardiología. Colombia no se ha quedado atrás en esto: Senior y colaboradores²⁹ han hecho, en pacientes con falla cardíaca por cardiopatía isquémica, implantes transendocárdicos de células madre derivadas de médula ósea. Varios pacientes han tenido mejoría sustancial en la calidad de vida con esta terapia.

Gracias a las células madre se han hecho grandes avances en el tratamiento de enfermedades que se deben a defectos en la córnea, la sustancia negra, la piel, el corazón y muchos otros órganos. En el caso de la retina, es posible utilizar tres tipos de células: las progenitoras retinianas provenientes de embriones, las células madre retinianas del epitelio ciliar y las células madre mesenquimales, extraídas de la médula ósea. Se han conseguido muy buenos resultados con las células progenitoras retinianas, pero la difícil obtención en algunos países por motivos legales y éticos limita su uso.

En Japón, un grupo de investigadores³⁰ encontró resultados similares con el uso de células progenitoras retinianas y el de células madre mesenquimales; estas últimas son más asequibles, ya que se extraen por aspirado de médula ósea o sangre periférica y se pueden cultivar para inyectarlas por vía intravítrea. Además, se trata de un injerto de células autólogas porque proceden

del mismo paciente; sin embargo, en este estudio, solo los progenitores retinianos expresaron rodopsina, una sustancia que se considera como marcador de producción por parte de las células fotorreceptoras retinianas. En Brasil, un grupo de investigadores solo ha utilizado células madre mesenquimales, con buenos resultados respecto a su incorporación.³¹

El uso de células madre o de células progenitoras retinianas puede ser muy benéfico para las diferentes enfermedades que afectan a la retina. Se sabe que la degeneración macular ataca los conos, la retinitis pigmentosa, tanto los conos como los bastones, y en el glaucoma hay pérdida de las células ganglionares. En todas estas enfermedades, las demás neuronas retinianas permanecen intactas en sus respectivas capas. Por tanto, la premisa de las terapias con células madre para tratar las enfermedades degenerativas oculares es reemplazar las neuronas faltantes con unas nuevas que se integren al espacio vacío dejado por las células muertas y se conecten al resto de la red neuronal, restableciendo la visión.³²

Aún no se ha intentado el trasplante de células progenitoras retinianas en seres humanos, y los resultados en modelos murinos no han sido satisfactorios. Una de las principales dificultades ha sido conseguir mejor diferenciación e integración de las células a los tejidos afectados. Para ello, MacLaren y colaboradores³³ han propuesto aumentar el número de células progenitoras trasplantadas; una alternativa ha sido el desarrollo de un cóctel que incluye cultivos con diferentes factores de crecimiento, con lo cual han conseguido *direccionar* células madre embrionarias humanas hacia células progenitoras retinianas, y han llegado a obtener fotorreceptores maduros de tipo bastón.

MacLaren y colaboradores³⁵ trasplantaron células progenitoras retinianas en modelos murinos, algunas de las cuales migraron hacia la parte interna de la retina, se diferenciaron y se integraron a las células nativas. Sin embargo, solo 0,03 a 0,1% de las células trasplantadas se integraron y establecieron conexión sináptica, lo cual indica que es necesario en futuros experimentos hallar una forma de inducir, sea genética o químicamente, la integración de la totalidad de las células trasplantadas.

Lamba y colaboradores,³⁴ en un experimento *in vitro*, tomaron células madre embrionarias humanas y las sometieron a la acción de varios mediadores, como

algunos antagonistas de la b-catenina, el factor de crecimiento relacionado con la insulina (*Insulin-like growth factor 1*, IGF-1), el cual induce en estas células la diferenciación hacia progenitoras retinianas, y el factor de crecimiento fibroblástico (*Fibroblastic growth factor*, FGF). Luego del estímulo, las células madre expresaron gran cantidad de marcadores para células ganglionares y amacrinas, así como para células horizontales. También encontraron marcadores para fotorreceptores, aunque en menor cantidad. Se comprobó que estas células eran funcionales porque los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) respondían satisfactoriamente a este y al glutamato. La baja cantidad de fotorreceptores incide de manera importante en las enfermedades de la retina. Para aumentar la diferenciación hacia fotorreceptores, las células nuevas fueron co-cultivadas *in vitro* junto con dos extractos de retinas múridas: uno de ratones salvajes normales y otro de ratones alterados con una mutación genética que promueve el desarrollo de degeneración retiniana. En ambos, las células nuevas humanas se integraron eficazmente a las retinas y aumentó el número de células que se diferenciaron hacia fotorreceptores, expresando marcadores para rodopsina y opsina.

Canola y colaboradores³⁵ obtuvieron resultados similares a los de Lamba antes de hacer el co-cultivo con retinas múridas. Inyectaron las células madre retinianas múridas en dos tipos de ratones: unos con retinas normales y otros con degeneración lograda por mutación genética. Luego de la inyección de las células madre por vía subretiniana en los ratones sanos, se observó migración de las células hacia la zona entre el epitelio pigmentario y la neuroretina; al cabo de siete días, las células permanecían en el mismo lugar, y solo hubo migración hacia zonas de la neuroretina que habían presentado algún tipo de daño. A los ratones con degeneración retiniana, se les inyectaron las células por vía subretiniana, y al cabo de cuatro semanas la gran mayoría de estas habían migrado hacia la capa de células ganglionares y se habían diferenciado hacia este tipo celular; otra porción migró hacia la capa plexiforme interna y se diferenciaron hacia células de la glía. Solo una mínima cantidad expresó marcadores para rodopsina que desaparecieron luego de una semana. En este mismo estudio se inyectaron células madre retinianas a ratones más jóvenes, con una enfermedad degenerativa en etapas más tempranas que la de los ratones mencionados anteriormente, y esas células lograron incorporarse morfológicamente a la capa nuclear externa. Incluso,

algunas expresaban recoverina (una proteína sintetizada por células fotorreceptoras). Pero aun así, la mayoría de las células inyectadas se diferenciaban hacia células ganglionares y gliales, lo que demuestra que ese es el destino predominante de las células madre inyectadas en la retina.³⁵ En otros ensayos se ha logrado obtener la expresión de rodopsina y opsina y también modificaciones de los patrones conductuales en los modelos múridos con la estimulación lumínica luego de inyecciones transesclerales de células progenitoras retinianas.³⁶

El factor de crecimiento derivado del endotelio vascular (VEGF, del inglés: *vascular endothelium-derived growth factor*) es un potente factor de crecimiento conocido por jugar un papel importante en la formación y el mantenimiento de las estructuras vasculares.^{37,38} Estas funciones son mediadas a través de dos de sus receptores tipo quinasas de tirosina: VEGFR1/Flt1 y VEGFR2/Flk1.³⁹ Recientemente se ha reportado que el VEGF es una importante molécula de señalización para protección neuronal y neurogénesis.⁴⁰⁻⁴⁶ Algunos análisis *in vivo* e *in vitro* han sugerido que el VEGF puede estimular la proliferación de células madre progenitoras neuronales en el cerebro, mediada por el receptor VEGFR2/Flk1.⁴⁷⁻⁵⁰ Nishiguchi y colaboradores⁵¹ obtuvieron la primera evidencia de que las células progenitoras retinianas necesitaban para su proliferación el estímulo del VEGF: estudiaron el papel jugado por los VEGF en la proliferación de células progenitoras en modelos múridos recién nacidos con una mutación homocigótica que produce degeneración retiniana hereditaria. Estas células, que presentaban receptores VEGFR2 pero no VEGFR1, podían llegar a expresar rodopsina. Además, luego de la exposición de las retinas al VEGFR2 en el noveno día posnatal, se incrementó el número de células progenitoras retinianas en un 61%, *in vitro*, y con una sola inyección intravítrea *in vivo* de VEGFR2 la proliferación celular aumentaba en un 138%.

Se ha encontrado que el cuerpo ciliar parece contener células madre retinianas que normalmente se encuentran quiescentes, pero si se las estimula luego de un daño retiniano pueden llegar a proliferar y diferenciarse en los diversos tipos de células que se encuentran en la retina, incluidas las ganglionares y los fotorreceptores. Nickerson y colaboradores⁵² indujeron daño de las células ganglionares retinianas por axotomía, con lo cual aumentó la proliferación de células madre en

el cuerpo ciliar, incluso antes de la muerte de las células ganglionares, y su efecto se mantuvo durante el tiempo que corresponde con la tasa pico de muerte celular ganglionar. Se encontraron varios de los marcadores retinianos, así como recoverina que es exclusiva de los fotorreceptores.

En los mamíferos, la actividad posnatal neurogénica queda abolida, para propósitos prácticos, al llegar a la adultez. Solo se ve actividad posnatal de las células progenitoras retinianas en los vertebrados inferiores, como en los peces (regeneración continua del epitelio pigmentario retiniano),⁵³ en los anfibios (regeneración continua del margen ciliar),⁵⁴ y en vertebrados superiores no mamíferos, como los pollitos recién nacidos, en condiciones patológicas.^{55,56} Nickerson y colaboradores⁵⁹ identificaron recientemente una población de células positivas para un marcador de proliferación retiniana (nestina) en el epitelio pigmentario ciliar. Estas células CE (*ciliary epithelium*), llamadas también células madre retinianas (*retinal stem cells, RSC*) han sido identificadas en roedores y en seres humanos.^{57,58} Las RSC difieren de muchos otros precursores neuronales en que pueden proliferar *in vitro* en ausencia de factores mitogénicos, y en que no son abolidas durante el desarrollo después de la delección genética de la proteína fibrilar glial ácida.^{57,59} Otras células, como las gliales de Müller en los mamíferos adultos, entran nuevamente al ciclo celular y son sometidas a gliosis reactiva en respuesta a lesiones excitotóxicas en la retina, entran nuevamente al ciclo celular y son sometidas a gliosis reactiva en respuesta a lesiones excitotóxicas en la retina,⁶⁰ y en algunos casos generan una progenie parecida a neuronas *in vivo*⁶¹ e *in vitro*.⁶²

CONCLUSIONES Y EXPECTATIVAS

Es necesario continuar haciendo estudios para poder lograr eficacia en la integración y diferenciación de las células progenitoras hacia fotorreceptores. Se requieren, por ejemplo, experimentos con células madre embrionarias humanas *in vivo* en modelos murinos para, a partir de allí, poder hacer el salto hacia la reproducibilidad de los resultados en seres humanos. Debido a algunos resultados poco alentadores, podría parecer, a simple vista, que la posibilidad de la recuperación de la vista en pacientes con enfermedades retinianas se encuentra aún a años luz. Pero en pocos años se han hecho grandes avances. Hemos visto que el

trasplante de retina es seguro y confiable y que no hay rechazo por parte del receptor; aún quedan muchos problemas por solucionar, como el de lograr inducir mejores conexiones sinápticas.

Las investigaciones con células madre han dado resultados muy positivos como terapia para el pterigioide ocular y el síndrome de Stevens-Johnson en donde son destruidas las células límbicas de la córnea, en la enfermedad de Parkinson que ataca neuronas productoras de dopamina, y en la regeneración del músculo cardíaco con aumento en la fracción de eyección de pacientes con cardiomiopatía dilatada. Todas estas enfermedades ocurren en tejidos que antes se creía que no podían regenerarse, y los resultados han sido sorprendentes. Así que es muy factible que en un futuro se puedan obtener los mismos resultados con las enfermedades retinianas. Es necesario averiguar cuáles son las causas bioquímicas por las que en los trasplantes de tejido retiniano en modelos murinos se obtienen muy buenos resultados a mediano plazo. De esta manera se lograría acercarse a la meta de disminuir de forma drástica los casos de ceguera y aumentar así la calidad de vida de quienes la padecen.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la labor de edición del doctor Jorge Mario Sánchez Caraballo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bennett, J. Retinal Progenitor Cells-Timing is Everything. *N Engl J Med* 2007; 356: 1577-1579.
2. U.S. adults with diabetes fear blindness or vision loss more than premature death: many respondents in international diabetes survey worried about quality of life. News release of the Lions Clubs International Foundation, Oak Brook, IL, December 2006.
3. Rosenfeld PJ, Martidis A, Tennant MTS. Age-related macular degeneration. En: *Yanoff M & Duker JS, editors: Ophthalmology, 3rd edition*. China: Mosby; 2009. Cap 6.27. Disponible en http://www.mdconsult.com/das/book/body/145476636-9/0/1869/441.html?tocnode=56523319&fromURL=441.html#4-u1.0B978-0-323-04332-8..00100-1_2382. Consultado el 9 de enero de 2009.
4. Klein R, Klein BEK, Linton KLP. Prevalence of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 1992; 99: 933-945.

5. Fine SL, Berger JW, Maguire MG, Ho AC. Age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2000; 342: 483-492.
6. Age-Related Eye Disease Study Research Group. The Age-Related Eye Disease Study system for classifying age-related macular degeneration from stereoscopic color fundus photographs: the Age-Related Eye Disease Study Report Number 6. *Am J Ophthalmol* 2001; 132: 668-681.
7. Macular Photocoagulation Study Group. Visual outcome after laser photocoagulation for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: the influence of initial lesion size and initial visual acuity. *Arch Ophthalmol* 1994; 112: 480-488.
8. Andreoli CM, Miller JW. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for ocular neovascular disease. *Curr Opin Ophthalmol* 2007; 18: 502-508.
9. Tansley K. The development of the rat eye in graft. *J Exp Biol* 1946; 22: 3-4.
10. Turner JE, Blair JR. Newborn rat retinal cells transplanted into a retinal lesion site in adult host eyes. *Dev Brain Res* 1988; 26: 91-104.
11. Ghosh F, Arner K, Ehinger B. Transplant of full-thickness embryonic rabbit retina using pars plana vitrectomy *Retina* 1998; 18: 136-142.
12. Humayun MS, de Juan E. Jr., del Cerro M, Dagnelie G, Radner W, Sadda S, et al. Human Neural Retinal Transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 3100-3106.
13. Gouras P, Algvere P. Retinal cell transplantation in the macula: new techniques *Vision Res* 1996; 36: 4121-4125.
14. Silverman MS, Hughes SE. Transplantation of photoreceptors to light-damaged retina *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30: 1684-1690.
15. Huang JC, Ishida M, Hersh P, Sugino IK, Zarbin MA. Preparation and transplantation of photoreceptor sheets *Curr Eye Res* 1998; 17: 573-585.
16. Aramant RB, Seiler MJ. Fiber and synaptic connections between embryonic retinal transplants and host retina. *Exp Neurol* 1995; 133: 244-255.
17. O'Brien KM, Schulte D, Hendrickson AE. Expression of photoreceptor-associated molecules during human fetal eye development. *Mol Vis* 2003; 9: 401-409.
18. Kaplan HJ, Tezel TH, Berger AS, Wolf ML, Del Priore LV. Human photoreceptor transplantation in retinitis pigmentosa: a safety study. *Arch Ophthalmol* 1997; 115: 1168-1172.
19. Radtke ND, Aramant RB, Seiler M, Petry HM. Preliminary report: indications of improved visual function after retinal sheet transplantation in retinitis pigmentosa patients. *Am J Ophthalmol* 1999; 128: 384-387.
20. del Cerro M, DiLoreto D Jr, Cox C, Lazar ES, Grover DA, del Cerro C. Neither intraocular grafts of retinal cell homogenates nor live non-retinal neurons produce behavioral recovery in rats with light-damaged retinas. *Cell Transplant* 1995; 4: 133-139.
21. Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL. Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat Med* 2001; 7: 393-395.
22. Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, et al. Dystrophin expression in the *mdx* mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999; 401: 390-394.
23. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Retsma M, Dohse M, Osborne L, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 1229-1234.
24. Körbling M, Estrov Z. Adult stem cells- A new therapeutic concept? *N Engl J Med* 2003; 349: 570-582.
25. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279: 1528-1530.
26. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170.
27. Eglitis MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 4080-4085.
28. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000; 290: 1779-1782.
29. Senior JM, Cuéllar A, Velásquez O, Velásquez M, Navas CM, Ortiz S, et al. Trasplante de células progenitoras derivadas de la médula ósea y factor

- de crecimiento granulocítico en cardiopatía isquémica aguda y crónica. *Rev Col Cardiol* 2007; 14: 341-344.
30. Tomita M, Mori T, Maruyama K, Zahir T, Ward M, Umezawa A, Young MJ. A comparison of neural differentiation and retinal transplantation with bone marrow-derived cells and retinal progenitor cells. *Stem Cells* 2006; 24: 2270-2278.
 31. Castanheira P, Torquetti L, Nehemy MB, Goes AM. Retinal incorporation and differentiation of mesenchymal stem cells intravitreally injected in the injured retina of rats. *Arq Bras Oftalmol* 2008, 71(5): 644-650. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27492008000500007&lng=en&nrm=iso. Consultado el 9 de enero de 2009.
 32. Wallace VA. Stem cells: a source for neuron repair in retinal disease. *Can J Ophthalmol* 2007; 42: 442-446.
 33. MacLaren RE, Pearson RA, MacNeil A, Douglas RH, Salt TE, Akimoto A, et al. Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature* 2006; 444: 203-207.
 34. Lamba DA, Karl MO, Ware CB, Reh TA. Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 12769-12774.
 35. Canola K, Angénieux B, Tekaya M, Quiambao A, Naash MI., Munier FL., et al. Retinal stem cells transplanted into models of late stages of retinitis pigmentosa preferentially adopt a glial or a retinal ganglion cell fate. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 446-454.
 36. Klassen HJ, Ng TF, Kurimoto Y, Kirou I, Shatos M, Coffey P. Multipotent Retinal Progenitors Express Developmental Markers, Differentiate into Retinal Neurons, and Preserve Light-Mediated Behavior. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 4167-4173.
 37. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-676.
 38. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Yung S, et al. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 2006; 124: 175-189.
 39. Shih SC, Ju M, Liu N, Smith LEH. Selective stimulation of VEGFR-1 prevents oxygen-induced retinal vascular degeneration in retinopathy of prematurity. *J Clin Invest* 2003; 112: 50-57.
 40. Carmeliet P. Blood vessels and nerves: common signals, pathways and diseases. *Nat Rev Genet* 2003; 4: 710-720.
 41. Schratzberger P, Schratzberger G, Silver M, Curry C, Kearney M, Magner M, et al. Favorable effect of VEGF gene transfer on ischemic peripheral neuropathy. *Nat Med* 2000; 6: 405-413.
 42. Jin KL, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in vitro ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 10242-10247.
 43. Oosthuysen B, Moons L, Storkebaum E, Beck H, Nuyens D, Brusselmans K, et al. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet* 2001; 28: 131-138.
 44. Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, DeFavero J, Desmet F, Marklund SL, et al. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet* 2003; 34: 383-394.
 45. Azzouz M, Ralph GS, Storkebaum E, Walmsley LE, Mitrophanous KA, Kingsman SM, et al. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature* 2004; 429: 413-417.
 46. Storkebaum E, Lambrechts D, Dewerchin M, Moreno-Murciano MP, Appelmans S, Oh H, et al. Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. *Nat Neurosci* 2005; 8: 85-92.
 47. Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 11946-11950.
 48. Zhu Y, Jin K, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor promotes proliferation of cortical neuron precursors by regulating E2F expresión. *FASEB J* 2003; 17: 186-193.
 49. Cao L, Jiao X, Zuzga DS, Liu Y, Fong DM, Young D, et al. VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nat Genet* 2004; 36: 827-835.
 50. Storkebaum E, Carmeliet P. VEGF: a critical player in neurodegeneration. *J Clin Invest* 2004; 113: 14-18.

51. Nishiguchi KM, Nakamura M, Kaneko H, Kachi S, Terasaki H. The Role of VEGF and VEGFR2/Flk1 in Proliferation of Retinal Progenitor Cells in Murine Retinal Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 4315-4320
52. Nickerson PEB, Emsley JG, Myers T, Clarke DB. Proliferation and expression of progenitor and mature retinal phenotypes in the adult mammalian ciliary body after retinal ganglion cell injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 5266-5275.
53. Reh TA, Levine EM. Multipotential stem cells and progenitors in the vertebrate retina. *J Neurobiol* 1998; 36: 206-220.
54. Raymond PA, Hitchcock PF. Retinal regeneration: common principles but a diversity of mechanisms. *Adv Neurol* 1997; 72: 171-184.
55. Fischer AJ, Reh TA. Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Dev Biol* 2000; 220: 197-210.
56. Fischer AJ, Reh TA. Muller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nat Neurosci* 2001; 4: 247-252.
57. Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 2000; 287: 2032-2036.
58. Ahmad I, Tang L, Pham H. Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 270: 517-521.
59. Morshead CM, Garcia AD, Sofroniew MV, van der Kooy D. The ablation of glial fibrillary acidic protein-positive cells from the adult central nervous system results in the loss of forebrain neural stem cells but not retinal stem cells. *Eur J Neurosci* 2003; 18: 76-84.
60. Dyer MA, Cepko CL. Control of Muller glial cell proliferation and activation following retinal injury. *Nat Neurosci* 2000; 3: 873-880.
61. Ooto S, Akagi T, Kageyama R, Akita J, Mandai M, Honda Y, et al. Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 13654-13659.
62. Das AV, Mallya KB, Zhao X, Ahmad F, Bhattacharya S, Thoreson WB, et al. Neural stem cell properties of Muller glia in the mammalian retina: regulation by Notch and Wnt signaling. *Dev Biol* 2006; 299: 283-302.

