



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

Máster en Rehabilitación Visual
MEMORIA TRABAJO FIN DE MÁSTER TITULADO

**TERAPIA CELULAR EN PATOLOGÍAS RETINIANAS
CAUSANTES DE BAJA VISIÓN**

Presentado por: **Edgar Javier Infantes Molina.**

Tutelado por: **Ricardo Usategui Martín**

En Valladolid a, 04/05/2019

*Amado Padre,
permíteme la gracia,
que alcances tu libertad en mí.
Se libre,
que en ese instante,
también seré libre yo,
porque comprenderé que soy Tú.
Entonces amaré,
entenderé el sentido de la sabiduría para saber expresar amor,
y podré hacerlo porque habré alcanzado el poder de amar.*

*Este trabajo valió la pena de ser realizado, tan sólo por
dejar por escrito mi profundo y enorme agradecimiento:*

A Dios

A mis padres: Lucho y Chela

A mi amor

A mis hermanos

A toda mi familia extensa

A mis amigos

A mis compañeros de trabajo

A mi tutor Ricardo

A todos y cada uno de mis pacientes

I. ÍNDICE

I. ÍNDICE.....	VII
II. RESUMEN	IX
I. INTRODUCCIÓN	1
II. TERAPIA CELULAR.....	5
III. CÉLULAS MADRE, O STEM CELLS.....	7
III.1. En base a su Potencia:.....	8
III.1.1. Totipotentes	8
III.1.2. Pluripotentes:.....	8
III.1.3. Multipotentes:.....	8
III.2. En base a su Origen:	9
III.2.1. Células Madre Embrionarias Humanas	9
III.2.2. Células Madre Adultas:	10
III.2.3. Células Madre Pluripotentes Inducidas	12
IV. DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS RETINIANAS A PARTIR DE CÉLULAS MADRE.....	13
IV.1. Obtención de células del epitelio pigmentario de la retina.....	13
IV.2. Obtención de células neurorretinianas.....	14
IV.3. Obtención de Organoides Neurorretinianos.....	14
IV.4. Obtención de células retinianas mediante transdiferenciación	16
V. ENSAYOS Y ESTUDIOS PRE-CLÍNICOS LLEVADOS A CABO CON CÉLULAS MADRE EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RETINIANAS.....	19
V.1. Reemplazo Celular del epitelio pigmentario de retina	19
V.2. Trasplante de fotorreceptores	20
V.3. Trasplante de láminas de retina.....	23
V.4. Trasplante de células ganglionares	23
V.5. Trasplante de células madre mesenquimales.....	25
VI. ENFERMEDADES DE LA RETINA EN LAS QUE SE APLICA LA TERAPIA CELULAR.....	27
VI.1. Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE).....	27
VI.1.1. Tratamiento.....	28
VI.2. Retinitis Pigmentosa (RP)	31
VI.2.1. Tratamiento.....	31
VI.3. Enfermedad de Stargardt	34
VI.3.1. Tratamiento.....	34

VI.4. Glaucoma	37
VI.4.1. Tratamiento.....	37
VII. TENDENCIAS FUTURAS DEL TRATAMIENTO BASADO EN CÉLULAS MADRE	41
VII.1. Terapia de Reemplazo Celular Combinada de EPR y Células Progenitoras Retinianas.....	41
VII.2. Terapia Génica Combinada con Células Madre	41
VII.3. Ingeniería de Tejidos	42
VII.4. Movilización de células madre específicas de tejidos.....	42
VIII. RETOS FUTUROS.....	43
IX. CONCLUSIONES	45
X. BIBLIOGRAFÍA.....	47

II. RESUMEN

La terapia de reemplazo celular es un tratamiento prometedor para la muerte celular retiniana en diversas enfermedades, como la degeneración macular asociada con la edad (DMAE), la enfermedad de Stargardt, la retinitis pigmentosa (PR) y el glaucoma. Todas estas enfermedades se caracterizan por la degeneración de uno o varios tipos de células retinianas que no pueden regenerarse espontáneamente en los seres humanos. Una vez que se desencadena la degeneración de las células de la retina, ningún tratamiento actual puede revertirla. Se han propuesto enfoques basados en trasplantes como terapia universal para tratar a pacientes con diversas enfermedades concomitantes. Tanto el reemplazo de células muertas como la neuroprotección de las células afectadas son estrategias utilizadas para preservar y mejorar la función visual en modelos animales con degeneración retiniana.

Diversos tipos de células retinianas derivadas de células madre pluripotentes, incluyendo células del epitelio pigmentario de la retina (EPR), fotorreceptores, células ganglionares de la retina (RGC), además de los organoides retinianos; proporcionan fuentes ilimitadas de células para trasplante. Además, las células madre mesenquimales (MSC) son multifuncionales y protegen a las células degeneradas de la retina.

El objetivo de esta revisión es resumir los hallazgos actuales de los estudios preclínicos y clínicos. Comenzamos con una breve introducción de la anatomía ocular, el concepto de la terapia celular y de la célula madre pluripotencial, los procedimientos para la obtención de las células a trasplantar, un repaso de los ensayos y estudios preclínicos, las enfermedades degenerativas de la retina y los tratamientos basados en terapias celulares. Finalmente, se expone las preocupaciones causadas por esta terapia y se concluye esbozando las tendencias futuras con este tipo de tratamiento.

PALABRAS CLAVE: Terapia celular, células madre, enfermedad degenerativa retiniana, trasplante de células madre.

I. INTRODUCCIÓN

El ojo es un órgano importante para la vida humana, debido a que los humanos capturamos la mayoría de la información de nuestro entorno a través de este órgano; por esto es llamado la ventana del cerebro. El ojo es un órgano que detecta la luz. Su función consiste en transformar la energía lumínica en señales eléctricas que son enviadas al cerebro a través del nervio óptico. Respecto a su anatomía y de manera general el ojo posee dos polos, el polo anterior encargado de la refracción enfocando los rayos de luz en la retina; y el polo posterior donde se encuentra el humor vítreo y la retina encargada de la transformación de la señal luminosa en impulso eléctrico para que pueda ser conducido al cerebro (Jin et al., 2018).

En el polo anterior se encuentra la córnea, principal órgano refractivo del ojo, posteriormente encontramos al iris que funciona como un diafragma controlando la cantidad de luz que ingresa hacia la retina. El cristalino se encuentra detrás del iris, tiene una función refractiva en el proceso de acomodación logrando enfocar los rayos luminosos en la fovea. Entre la cámara anterior (entre la córnea y el iris) y la cámara posterior (entre el iris y el cristalino) se localiza el humor acuoso (Kels, Grzybowski, & Grant-Kels, 2015). En el polo posterior se encuentra la retina con la mácula, donde se localiza la fovea, la zona retiniana con mayor grado de discriminación. La retina está formada por varios tipos de células interconectadas, como los fotorreceptores, células bipolares, células horizontales, células de Müller, células amacrinas y células ganglionares que descansan sobre células del EPR (Kirkwood, 2012).

En la retina el estímulo luminoso es transformado en señal eléctrica. La señal visual comienza en los fotorreceptores, estos expresan proteínas fotosensibles principalmente en sus segmentos externos. Existen dos tipos de fotorreceptores, los conos y los bastones, los primeros encargados de la visión fotópica y los segundos de la escotópica. Las células bipolares reciben la señal de los fotorreceptores y la transmiten a las células ganglionares de la retina. Finalmente, todas las señales son reunidas en el nervio óptico y transmitidas al cerebro. Tanto la degeneración de las células como la disrupción de sus sinapsis deterioran el proceso visual (Jin et al., 2018).

El epitelio pigmentario de la retina (EPR) forma una monocapa debajo de los segmentos externos de los fotorreceptores, constituyendo la barrera hemato-retiniana externa. Las

células del EPR cumplen varios roles, como la absorción de la luz dispersada, la regulación del aporte de los nutrientes, secreción de diversos factores paracrinicos, regulación del ciclo retiniano y la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores favoreciendo su reciclaje (Strauss, 2005).

La membrana de Bruch se encuentra entre la coriocapilaris y la membrana basal de los fotorreceptores. Sus principales funciones incluyen regular el intercambio molecular entre la coroides y el EPR, proveer un soporte para la adhesión, migración y diferenciación de éstas células, además de formar una barrera para evitar la migración de las células. Los cambios en la membrana de Bruch como la aparición de depósitos y desechos en la lámina basal, la acumulación de lípidos, cambios en su grosor, y el desarrollo de drusas, comienzan antes de los 30 años. No estando claro el límite entre lo normal y el envejecimiento patológico (Booij, Baas, Beisekeeva, Gorgels, & Bergen, 2010). Bajo la membrana de Bruch se encuentra la coroides, que puede ser dividida en la coriocapilar, la capa de Sattler, la capa de Haller, y la supracoroidea. La coriocapilar es una capa de vasos finos relativamente densa adyacente a la membrana de Bruch, su principal función es brindar oxígeno y nutrientes al EPR y a la capa de los fotorreceptores, además de remover los desechos de la membrana de Bruch (Huynh et al., 2017).

El ojo es fácilmente accesible para la intervención quirúrgica con un limitado trauma debido a su estructura anatómica, es un órgano relativamente independiente y el trasplante celular intraocular es improbable que afecte a otros órganos. Por otro lado, el ojo es una de las pocas áreas del cuerpo que goza del privilegio inmune. Con respecto a la retina, el espacio subretiniano posee propiedades que le brindan un privilegio inmune (Wenkel & Streilein, 1998). Estas células del EPR juegan un importante rol en el mantenimiento del estado de inmunosupresión gracias a la secreción de citoquinas y factores de crecimiento (Sugita, Horie, Yamada, & Mochizuki, 2010).

Las enfermedades degenerativas de la retina se caracterizan por la pérdida de células del EPR y/o de los fotorreceptores en caso de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), la enfermedad de Best, y la retinitis pigmentosa (RP); y la muerte de las células ganglionares en caso del glaucoma, entre otras menos frecuentes como la amaurosis congénita de Leber, coroideremia, distrofias de conos y conos-bastones, atrofia girata, enfermedad de Oguchi, retinosquiasis juvenil. El deterioro visual causado por la degeneración y muerte de células retinianas es irreversible debido a que las células retinianas carecen de capacidad de regeneración y multiplicación (Whitmore et al., 2015).

Las terapias avanzadas para las enfermedades oftalmológicas constan de productos medicinales basados en la transferencia de células, de genes, de células modificadas genéticamente, o en una combinación de las anteriores. La terapia génica y celular tiene el potencial de prevenir, detener o revertir enfermedades de la retina en pacientes con condiciones de ceguera actualmente incurables. En las últimas dos décadas se han producido avances en el conocimiento de la patología de las enfermedades de la retina, junto con el desarrollo de técnicas de transferencia génica y el trasplante de células, han creado optimismo en el tratamiento de enfermedades retinianas que antes inevitablemente conducían a la ceguera de nuestros pacientes (MacLaren, Bennett, & Schwartz, 2016).

El trasplante autólogo de células del epitelio pigmentarias de la retina periférica al espacio submacular brindó pruebas de que el trasplante del EPR es una modalidad terapéutica viable para la enfermedades degenerativas retinianas, ya que los pacientes con degeneración macular sometidos a esta técnica experimentaron una mejoría de su función visual. Sin embargo, la terapia de reemplazo celular está limitada por la escasez de fuentes celulares y por los defectos genéticos de las células de los pacientes sometidos a trasplante autólogo (Binder et al., 2004).

Desde la introducción de las células madre, la terapia de estas ha llegado a convertirse en otra importante área para el desarrollo de tratamientos en enfermedades retinianas como lo están reportando varios investigadores (Mandai, Watanabe, et al., 2017).

Las células madre (*stem cell*) se encuentran en todos los organismos multicelulares, se caracterizan por tener la capacidad de dividirse y autorrenovarse para producir más células madre junto al potencial para generar cualquier tipo celular especializado de su huésped. Las células madre son una fuente para la terapia del reemplazo celular. La obtención de células retinianas derivadas de células madre embrionarias humanas (hESC: *human embryonic stem cells*), de las células madre adultas multipotentes, y de las células madre pluripotentes inducidas (iPSC: *induced pluripotent stem cells*); ha sido explorado ampliamente obteniendo resultados exitosos por muchos grupos. Además, las células madre secretan factores paracrinos que desempeñan funciones neuroprotectoras, inmunomoduladoras, antiapoptóticas y antioxidantes (Jin & Takahashi, 2012). Las células madre mesenquimales son prometedoras para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas. El efecto protector de las células madre mesenquimales en la degeneración de las células ganglionares de la retina ha sido demostrado en modelos animales (Tassoni, Gutteridge, Barber, Osborne, & Martin, 2015).

II. TERAPIA CELULAR

La terapia celular es el conjunto de estrategias que emplea células vivas como agente terapéutico y cuyo objetivo principal es reparar, reemplazar o recuperar la función biológica de un tejido u órgano dañado. Se basa en la utilización principalmente de las células madre o stem cell (SC) que son capaces de autorrenovarse y diferenciarse hacia células somáticas especializadas en las condiciones apropiadas y con los estímulos correctos. Estas propiedades hacen de ellas una herramienta primordial en la medicina regenerativa (Zarbin, 2019).

La terapia celular para las enfermedades retinianas están divididas en dos grupos, aquellas que tienen como meta un efecto protector a través de la secreción de factores paracrinos y otra en la cual la finalidad es el reemplazo o la sustitución de las células retinianas muertas. Las células candidatas a ser reemplazadas por células diferenciadas derivadas de células madre incluyen los fotorreceptores, las células del EPR, y las células ganglionares de la retina. (Maeda, Mandai, & Takahashi, 2019).

Por lo anterior, las enfermedades hereditarias de la retina se pueden beneficiar de la terapia celular porque teóricamente este tratamiento busca su regeneración funcional. En contraste con la terapia génica la cual corrige los genes mutados en células viables, la terapia celular reemplaza las células muertas (Sengillo, Justus, Tsai, Cabral, & Tsang, 2016). Además del mecanismo de reemplazo celular, se ha descrito el efecto protector de las células madre sobre células retinianas sometidas a diversas agentes etiológicos, esto sería fruto del efecto trófico e inmunosupresor de las células madre (Jin et al., 2018). Esta propiedad de las células madre ha sido atribuida al efecto paracrino de las células trasplantadas. Se ha demostrado un efecto neuroprotector en diferentes modelos de degeneración retiniana. Se conoce que las células madre pueden expresar una variedad de factores que pueden proteger a la retina dañada, algunos de estos factores son el factor de crecimiento neurotrófico, el factor neurotrófico derivado del cerebro, factor de crecimiento de fibroblasto β , factor de crecimiento insulínico tipo 1 y el factor de crecimiento ciliar. (Rabesandratana, Goureau, & Orioux, 2018) (Osborne, Sanderson, & Martin, 2018).

III. CÉLULAS MADRE, O STEM CELLS

Las células madre se encuentran en todas las etapas del desarrollo de un organismo, desde el cigoto hasta la muerte. Estas células madre se pueden aislar y cultivarse *in vitro*. Dependiendo de la fuente de donde las obtengamos podemos aislar células madre con diferentes propiedades. Las células madre tienen propiedades similares a las células cancerosas, como autorrenovación, proliferación, baja inmuneidad y actividad de la telomerasa (Liew et al., 2005).

-Indiferenciación: No poseen las características fenotípicas ni citoplasmáticas de los tipos celulares diferenciados. Su morfología es redondeada o fusiforme (Mata-Miranda, Vázquez-Zapién, & Sánchez-Monroy, 2013).

- Autoperpetuación: Mediante divisiones mitóticas que originan nuevas células, de características similares (Alison & Islam, 2009).

- Diferenciación o Pluripotencialidad: Una célula madre puede diferenciarse en otro tipo de célula. En condiciones experimentales o naturales *in vivo*, las células madre pueden abandonar su estado indiferenciado y transformarse en un tipo celular adulto. Esta característica, junto a su capacidad de proliferación convierten a las células madre en una fuente para la obtención de tipos celulares, facultándolas para tratar, mediante terapia regenerativa, algunas enfermedades. (Liew et al., 2005).

-Autorrenovación. Las células madre tienen activada la telomerasa por lo que los telómeros no se acortan después de cada división. Los telómeros de las células madre pluripotentes inducidas aumentan su longitud después de su reprogramación nuclear, hasta alcanzar la longitud de los telómeros de una célula madre embrionaria (Pereira, Tavares, Camargos, & da Silva Filho, 2012).

-Inmunogenicidad. La respuesta inmune de las células madre es baja en comparación con las células madre alogénicas, debido a la escasa expresión del complejo principal de histocompatibilidad I (MHC I) y la falta de expresión de MHC II (Mata-Miranda et al., 2013).

La clasificación de las células madre se da según su potencia (de acuerdo al número de líneas celulares que puede originar) y según su origen (de donde podemos obtenerlas).

III.1. En base a su Potencia:

III.1.1. Totipotentes

Estas células madre pueden transformarse en cualquier clase celular del organismo al que pertenecen y, por tanto, podrían dar lugar a un nuevo ser completo. Las únicas células totipotenciales son el óvulo fecundado y, aproximadamente, las cuatro primeras células que se generan tras su división (cigoto) (Verfaillie, Pera, & Lansdorp, 2002).

III.1.2. Pluripotentes:

Tienen la capacidad de dar lugar a cualquier célula diferenciada del cuerpo, pero no pueden contribuir a la fabricación de membranas extraembrionarias (y por tanto, no pueden sustituir a un óvulo fecundado). El tipo más conocido de célula pluripotencial es la célula madre embrionaria (Alison & Islam, 2009) (Fig. 1).

III.1.3. Multipotentes:

Sólo pueden diferenciarse en un número limitado de tipos celulares. Se encuentran en individuos adultos, por esto son conocidas como células madre adultas. La médula ósea contiene células madre multipotenciales, que pueden dividirse para formar otras células de la médula ósea o dar lugar a cualquier célula sanguínea (glóbulos blancos, rojos o plaquetas), pero no a otros tipos de células (Toh, Foldager, Pei, & Hui, 2014).

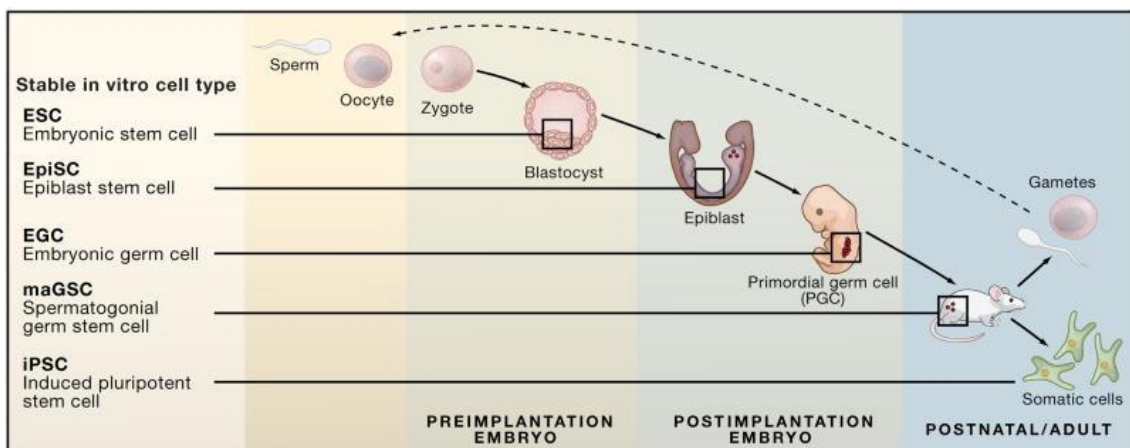


Fig. 1. Desarrollo de las células madre pluripotentes

Se pueden derivar diferentes tipos de células pluripotentes en varias etapas del desarrollo embrionario temprano. Las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) se derivan de la reprogramación directa de células somáticas *in vitro*. Imagen tomada de: Hanna, J. H., Saha, K., & Jaenisch, R. (2010). Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell*, 143(4), 508–25.

III.2. En base a su Origen:

III.2.1. Células Madre Embrionarias Humanas

Desde los primeros cultivos de células embrionarias derivadas de blastocistos de ratón en 1981, se sentaron las bases para la generación de células madre embrionarias humanas. A estas células se las denominó células madre embrionarias o stem cell embrionarias (ESC: Embryonic Stem Cells). Thomson et al. publicó datos sobre la derivación de líneas de células madre embrionaria humana (hESC) a partir de blastocistos en fase de preimplantación (Thomson et al., 1998).

Las características esenciales que permiten que una célula se defina como ESC son (Verfaillie et al., 2002):

- 1) Se derivan de células de la masa celular interna del blastocisto.
- 2) Se pueden reproducir de forma indefinida en el estado embrionario, mediante ilimitadas divisiones simétricas sin diferenciarse.
- 3) Se pueden diferenciar de forma espontánea para dar lugar a células de las tres capas germinales embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo). También se diferencian *in vitro* bajo condiciones apropiadas.
- 4) Pueden dar lugar a cualquier célula del cuerpo; incluso células germinales cuando colonizan un blastocisto huésped, son capaces de integrarse en todos los tejidos fetales durante el desarrollo.

Las características esenciales se pueden reducir a dos: que las ESC se puedan cultivar *in vitro* y que se puedan expandir de forma indefinida manteniendo el carácter indiferenciado (Mata-Miranda et al., 2013).

Limitaciones de las Células Madre Embrionarias

Una limitación es que la derivación de células diferenciadas de las hESCs tiene un grado de eficacia bajo, siendo necesarios un gran número de embriones. Además, hay riesgo que las hESC formen teratomas al ser implantadas en estado indiferenciado, desapareciendo si se implantan tras su diferenciación total. Por otro lado, las células implantadas pueden sufrir un rechazo inmunológico. (Cortes et al., 2009). Finalmente, los aspectos que más afectan a las investigaciones con hESC son los éticos y morales, debido a la destrucción de los embriones humanos para utilizarlos en investigación.

III.2.2. Células Madre Adultas:

Las células madre adultas o somáticas se encuentran quiescentes con una capacidad limitada de diferenciación y autorrenovación, son las encargadas de reemplazar las células que mueren dentro del organismo. Se han aislado numerosos tipos de células madre precursoras de algún linaje celular, esto ha conducido al concepto que todos los tejidos tienen sus propios nichos de células madre (Prósper & Verfaillie, 2003) (Fig. 2).

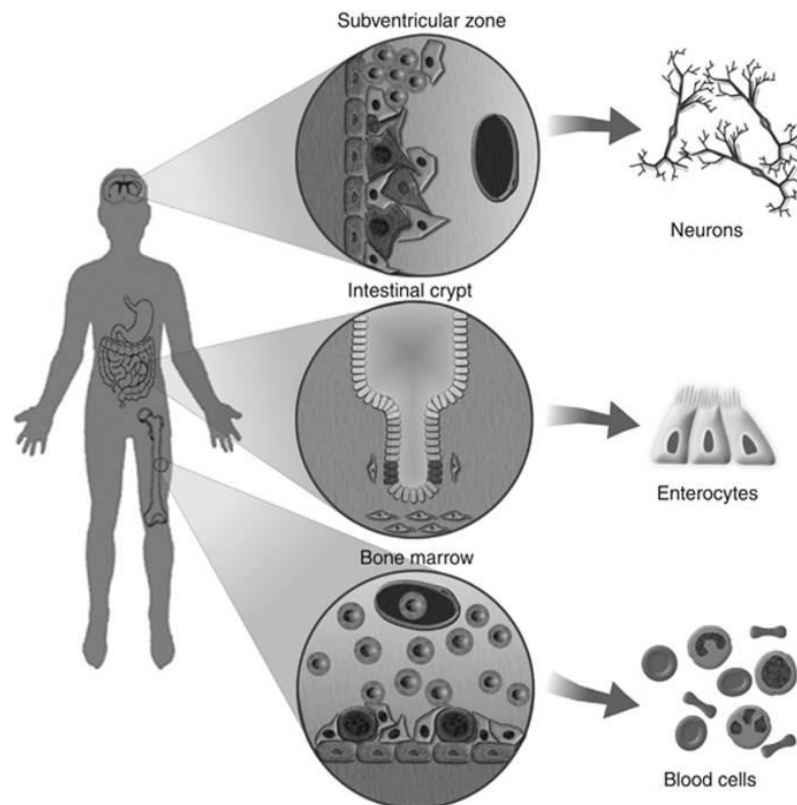


Fig. 2. Células Madre somáticas o adultas.

Están presentes en todos los tipos de órganos y tejidos de los organismos. Son las encargadas de reemplazar las células muertas. Imagen tomada de Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2011). *Biology of stem cells: an overview*. *Kidney International Supplements*. 1(3). 63–67.

La fuente más común de células madre adultas es la médula ósea. Las células madre mesenquimales se encuentran en este tejido y se cree que los resultados terapéuticos en enfermedades no hematológicas se deben a estas células (Grant et al., 2002).

Los compartimientos de la economía corporal como epitelial, hemotopoyético, adiposo, muscular, conjuntival y neural; cuentan con nichos donde se encuentran sus células madre las cuales cuentan con características biológicas definidas (Alison & Islam, 2009).

Dentro de los tipos de células madre adultas tenemos las células madre hematopoyéticas, las células madre mesenquimales, entre otras menos conocidas como las células madre periodontales.

III.2.2.1. Células Madre hematopoyéticas.

Estas células madre se han utilizado en el ámbito clínico desde hace más de 40 años. Se encuentran en la circulación, en la médula ósea y en el cordón umbilical. El uso de estas células en enfermedades no hematológicas ha sido explorado recientemente, varios estudios preclínicos y clínicos se están realizando ([Martin-Rendon. Autologous](#)).

III.2.2.2. Células Madre Mesenquimales

Pueden ser obtenidas de una gran variedad de tejidos, incluyendo la médula ósea y el tejido adiposo. Las células madre mesenquimales (MSC: mesenchymal Stem Cell) han sido investigadas durante más de dos décadas debido a su fácil aislamiento. Las MSC tienen propiedades neuroprotectoras, un alto grado de diferenciación y una carencia de rechazo inmune ([Ding, Shyu, & Lin, 2011](#)).

La MSC han sido inyectadas dentro del espacio subretiniano y en la cavidad vítrea de modelos animales con enfermedades degenerativas de la retina ([Emre et al., 2015](#)). Aunque aún se desconocen los mecanismos subyacentes, se ha observado la mejoría de la función visual después del trasplante de células madre mesenquimales. Un mecanismo probable es que se deba a la secreción de factores neurotróficos por parte de las MSC, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF: brain derived neurotrophic factor) y el factor neurotrófico ciliar (CNTF: ciliary neurotrophic factor), puedan proteger células en procesos degenerativos. Por otro lado, las propiedades inmunomoduladoras de las MSC pueden prevenir la respuesta inmune excesiva de los procesos degenerativos de la retina ([Jin et al., 2018](#)).

Limitaciones de las Células Madre Adultas

Aunque los tres principales problemas de las hESC - problemas éticos, rechazo inmunológico y potencial desarrollo de teratomas - son evitados con el uso de las células madre adultas existen inconvenientes para su uso amplio como su difícil obtención, ya que muchos de los marcadores de la célula madre no son expresados en la superficie.

Por otro lado, aún se desconocen muchos de los mecanismos mediante los cuales estas células actúan terapéuticamente ([Chagastelles & Nardi, 2011](#)).

III.2.3. Células Madre Pluripotentes Inducidas

En el año 2006, Yamanaka et al demostraron que la manipulación de cuatro genes en células somáticas diferenciadas de ratón eran capaces de revertir todo el programa de diferenciación y reprogramar las células a un estadio embrionario (Takahashi & Yamanaka, 2006). Estas células, se denominaron células madre pluripotentes inducidas (iPSCs: induced pluripotent stem cells). La generación de iPSC a partir de células somáticas ofrece un inmenso potencial terapéutico, así como una herramienta para el estudio de enfermedades, desarrollo embrionario, screening de fármacos, etc.

Es importante señalar que el proceso de reprogramación por el cual una célula somática adquiere la pluripotencialidad no es una transformación genética, sino que consiste en una transformación epigenómica (Lister et al., 2011). Para la obtención de iPSCs se modifica la expresión de cuatro genes en células somáticas. Los métodos más utilizados para ello son:

- Realización de una transformación retroviral con los genes OCT-4, SOX2, KLF4 y MYC (Daley et al., 2009).
- Realización de una integración lentiviral de los genes OCT-4, SOX2, NANOG y LIN28A (Yu et al., 2007).
- Reprogramación sin la utilización de vectores episomales integrados (Yu et al., 2009).

En las células somáticas, los promotores de los genes antes mencionados están altamente metilados, reflejando su estado transcripcional reprimido. La formación de iPSC conlleva la activación de estos genes a través de su desmetilación (Mikkelsen et al., 2008).

La principal ventaja de las iPSC es que elimina la controversia generada en torno al uso de embriones humanos congelados. Además, el origen de líneas iPSC, a partir de una célula somática de un individuo facilitaría la aplicación de un trasplante autólogo.

Limitaciones de las Células Madre Pluripotentes Inducidas

La reprogramación de células somáticas implica la reconfiguración epigenómica, dotando a las iPSCs de características similares pero no idénticas, a las hESC. Se ha comprobado que existen diferencias mínimas epigenómicas, en la estructura de la cromatina y expresión de genes entre las hESC y las iPSC. Estos descubrimientos indican que existen diferencias fundamentales entre las ESC y las iPSC (Hanna, Saha, & Jaenisch, 2010).

IV. DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS RETINIANAS A PARTIR DE CÉLULAS MADRE.

IV.1. Obtención de células del epitelio pigmentario de la retina.

Las células madre pluripotenciales, incluyendo a las células madre embrionarias y a las células madre pluripotenciales inducidas, son autorenovables y tienen el potencial para diferenciarse en cualquier tipo celular derivado del ectodermo, endodermo o mesodermo, tal como las células del EPR, los fotorreceptores, y las células ganglionares de la retina. La generación de células pluripotenciales y el establecimiento de la diferenciación somática *in vitro* proveen una ilimitada fuente de células para la terapia del reemplazo celular (Jin et al., 2018).

Existen diferentes métodos para la obtención de EPR derivado de células madre pluripotenciales. La actividad inductora derivada de células estromales (SDIA: stromal cell-derived inducing activity): Este método se ha probado en células de primates, después de 3 semanas de diferenciación el $8 \pm 4\%$ de las colonias de células madre embrionarias (ESC) de los primates que fueron inducidas por SDIA mostraron grandes parches de células de EPR; este EPR tiene las propiedades y funciones del EPR de las células *in vivo*. Si a los cultivos anteriores se inhibe la señalización de las vías de Wnt y Nodal por moléculas pequeñas, como CKI-7 y SB431542, se pueden obtener células de EPR a partir de células madre embrionarias humanas, con este método se obtiene un 26% de EPR derivado de ESC (Osakada et al., 2009). Otro método incluye la adición de nicotinamida y activina A, con este método se obtiene que el 72.9% de las células hECS muestran una morfología escamosa y hexagonal, además de microvellosidades apicales, gránulos de melanina, membrana basal y uniones estrechas (*tight junctions*), características de las células del EPR (Idelson et al., 2009). El trasplante de estas células de EPR derivadas de hECS requiere inmunosupresión por 3 meses. A diferencia del trasplante autólogo de células madre pluripotenciales inducidas que cuentan con una mejor histocompatibilidad.

Sin importar el método por el cual las células de EPR son obtenidas, ciertas características típicas deberían ser consideradas. Las células inducidas deberían mostrar una morfología hexagonal, y expresar marcadores moleculares que participan en la síntesis de pigmento (*Tirosinasa*, *Tyrp1*, *Tyrp2* y *SILVER*), también comprometidos en el ciclo visual (*Rpe65*, *Lrat*, *Rdh5*, y *Rlbp1*) y en la secreción de proteínas (*Transthyretin*, *CNTF* y *PEDF*) en niveles similares a los que muestra el EPR *in vivo*. Adicionalmente, estas células deben

tener microvellosidades con la habilidad de fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores. Las células del EPR se consideran la mejor opción para la terapia de reemplazo celular teniendo en cuenta que tiene una metodología de producción bien establecida y competente (Idelson et al., 2009).

IV.2. Obtención de células neuroretinianas

Las células progenitoras retinianas, las cuales son un tipo de células madre pueden diferenciarse en varios tipos de células retinianas, incluyendo células fotorreceptoras, células ganglionares retinianas, células amacrinas, células bipolares, células horizontales y células de Muller (Jin et al., 2018).

Este método puede ser aplicado para generar células precursoras retinianas a partir de las iPSC. Se ha observado que en ratas en el día 45 de inducción los fotorreceptores derivados de las iPSC expresaron marcadores precursores de los fotorreceptores como CRX y Rodopsina, el último marcador indica la presencia de bastones maduros. Con respecto a las células humanas, las células madre embrionarias o las células madre pluripotenciales inducidas requiere mucho tiempo para obtener células neuroretinianas; bajo condiciones establecidas los precursores celulares de los fotorreceptores como CRX se expresan en el día 80 aproximadamente y cerca de la mitad de células Recoverina + expresan el marcador de fotorreceptores maduros llamado Rodopsina (Hirami et al., 2009).

Estos fotorreceptores derivados de las iPSC pueden ser usados como un modelo para revisar los mecanismos de la retinosis pigmentaria y proveer una fuente celular adecuada para obtener injertos que puedan ser usados en estudios preclínicos en enfermedades como la retinosis pigmentaria (Jin & Takahashi, 2012).

IV.3. Obtención de Organoides Neuroretinianos

La retina neural tiene una compleja morfogénesis, conteniendo varios tipos de células conectadas por varias uniones sinápticas, por lo que improbable que sean reparadas por el trasplante de un solo tipo celular cuando los pacientes padecen una enfermedad ocular en estado terminal.

In vitro se ha intentado generar tejido neuroretiniano de células pluripotenciales, en un sistema de cultivo bidimensional (2D) se puede inducir una estructura similar a una vesícula óptica que contiene células positivas a la rodopsina. Eiraku et al generaron una estructura de copa óptica bien organizada a partir de un sistema de cultivo tridimensional

(3D). En estos organoides retinianos, existen las tres capas de retina neural en forma similar a las de las retinas *in vivo*, y los fotorreceptores en el organoide son más maduros que los de un sistema de cultivo 2D (Eiraku et al., 2011).

Los sistemas de cultivo celular en 3D han mostrado que inducen la formación de una copa óptica en tanto en células madre embrionarias de ratón como humanas. La copa óptica derivada de las hESC contienen la mayor cantidad de componentes neurorretinianos incluyendo fotorreceptores, células ganglionares de la retina y células bipolares.

Un estudio reciente mostró que las iPSC humanas sembradas en matriz polimérica pueden desarrollar dendritas y axones funcionales; este enfoque es prometedor debido a su potencial clínico en el futuro (Li et al., 2017).

Durante el desarrollo retiniano, el destino de varios tipos celulares es controlado por la transcripción ordenada de varios factores en un espacio-tiempo muy preciso. Se espera que la comprensión del perfil de los cambios transcripcionales y epigenéticos que se producen durante la retinogénesis ayude a optimizar los métodos para generar organoides retinales más maduros *in vitro*. Kaewkhaw et al analizaron el transcriptoma de los organoides retinianos en 3D, perfilando los cambios temporales en las firmas de los genes en diferentes etapas. Además, la identificación de marcadores específicos de la superficie celular proporciona pautas para mejorar el desarrollo de fotorreceptores en diferentes etapas, estos datos transcripcionales son útiles para delinear redes reguladoras de genes durante el desarrollo de la retina (Kaewkhaw et al., 2015). Sin embargo, muchos de los procesos reguladores del desarrollo de la retina humana permanecen sin conocerse. Recientemente se ha proporcionado un análisis molecular completo de la retina fetal y caracterizaron las bases celulares del desarrollo foveal (Aldiri et al., 2017), este estudio se centró en la dinámica de la epigenética y la transcriptómica durante la retinogénesis en humanos. Todo ello proporcionó un mapa epigenético y transcripcional que nos sirve como referencia para la estadificación molecular de los organoides retinianos derivados de células madre humanas.

IV.4. Obtención de células retinianas mediante transdiferenciación

La transdiferenciación o la conversión de un tipo celular en otro sin rediferenciación en células madre pluripotenciales, es una forma potencial para generar células o tejidos específicos para cada paciente. La conversión directa de fibroblastos en neuronas se ha logrado mediante la expresión de determinados factores de transcripción tanto en ratones como en seres humanos (Kim et al., 2011).

La inducción y reprogramación celular por pequeñas moléculas inductoras ha logrado grandes avances. Por ejemplo, bajo condiciones químicas establecidas, se pueden obtener neuronas y cardiomiocitos funcionales a partir de fibroblastos (Cao et al., 2016).

En el campo oftalmológico este método ha sido poco estudiado. Un reciente estudio mostró que en ratones adultos, las neuronas retinianas pueden ser generadas a partir de las células de Muller después del daño del NMDA (N-metil-D-aspartato) por la expresión forzada del gen *Ascl1* junto a con un inhibidor de la histona deacetilasa Tricostatina A (TSA) (Jorstad et al., 2017). Estos descubrimientos demuestran el potencial de la reprogramación celular, que puede proveer una nueva vía de tratamiento para las enfermedades retinianas (**Fig. 3**).

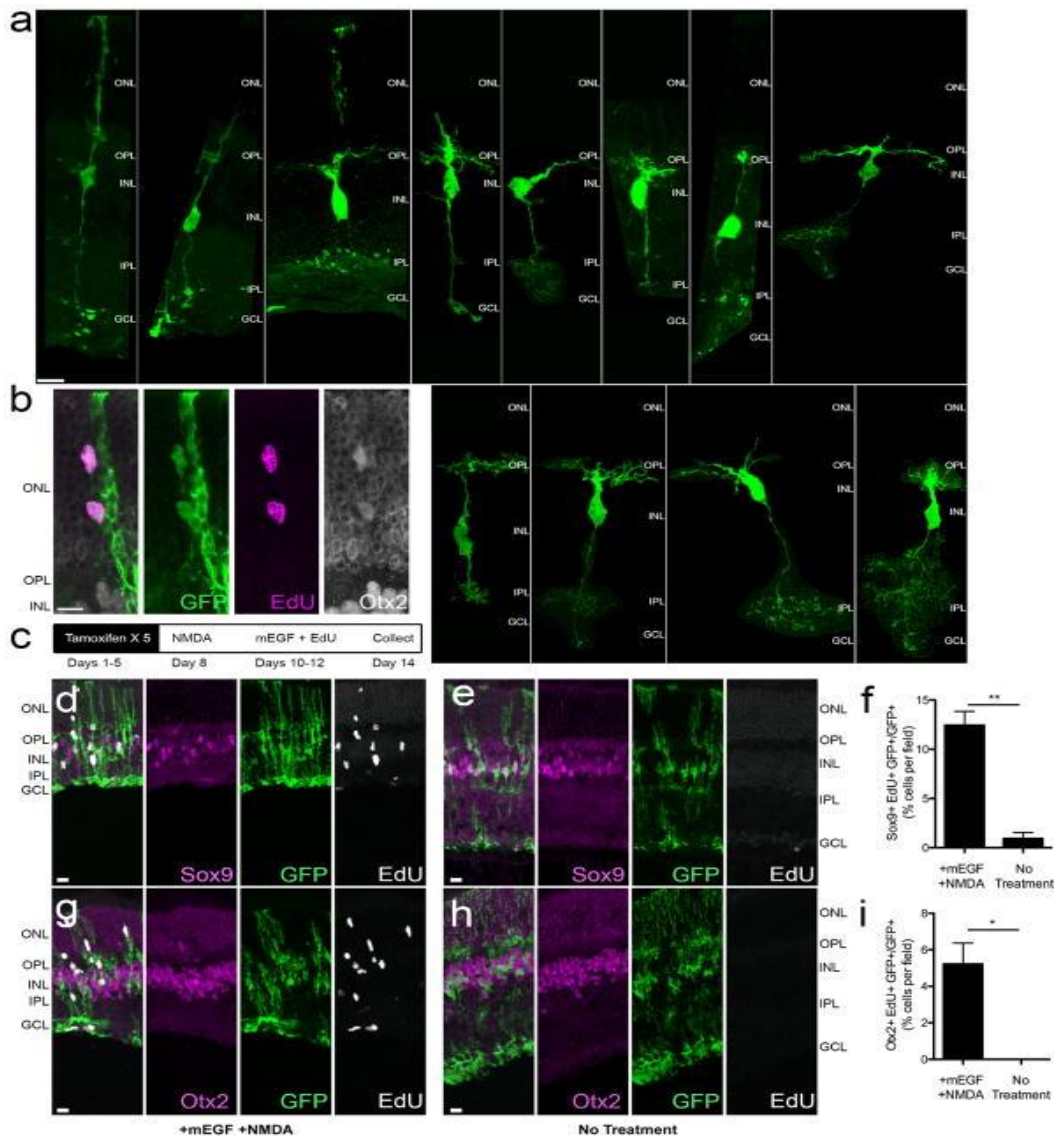


Fig. 3. Neurogénesis y proliferación de células de Muller expresando Ascl1. **a.** Las imágenes muestran la morfología de glias de Muller (GM) y neuronas. Las imágenes fueron tomadas de 2-5 semanas post-TSA. Se observan morfologías híbridas en todos los puntos analizados. **b** Ejemplo de GM expresando GFP + Otx2 + marcado con EdU en la capa nuclear externa; las células teñidas con los tres marcadores fueron muy raras: <1% de GM expresaron GFP + (aproximadamente 1 célula por sección de retina de 3 ratones). **c** Diagrama que muestra el paradigma de tratamiento experimental para el análisis de proliferación. **d** Los ratones que sobreexpresan Ascl1 tratados con factor de crecimiento epidérmico de ratón (mEGF) y NMDA mostraron ejemplos de GM Sox9 + EdU +. **e** La mayoría de GM no se marcaron con EdU cuando los ratones con sobreexpresión de Ascl1 solo recibieron inyecciones intravítreas de EdU (sin tratamiento). **g** Los ratones que sobreexpresan Ascl1 tratados con mEGF y NMDA expresaron trazas de GM Otx2 + EdU +. **h** Los ratones con sobreexpresión de Ascl1 que solo recibieron inyecciones intravítreas de EdU (sin tratamiento) no tuvieron GM que expresaran Otx2 y se etiquetara con EdU.

Imagen adaptada de Jorstad, N. L., Wilken, M. S., Grimes, W. N., Wohl, S. G., VandenBosch, L. S., Yoshimatsu, T., Reh, T. A. (2017). Stimulation of functional neuronal regeneration from Müller glia in adult mice. *Nature*, 548(7665), 103–107.

V. ENSAYOS Y ESTUDIOS PRE-CLÍNICOS LLEVADOS A CABO CON CÉLULAS MADRE EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RETINIANAS

V.1. Reemplazo Celular del epitelio pigmentario de retina

La atrofia de las células del EPR se considera como una forma de degeneración retiniana. Actualmente, las dos estrategias principales para reemplazar las células atróficas de RPE incluyen una suspensión celular de EPR y una lámina de células de EPR. Cuando una suspensión de células del EPR humanas (ARPE-19) fue injertada en ratas, las células se esparcieron a lo largo de las células del EPR del huésped y evitaron la muerte de las células fotorreceptoras (S. Wang, Lu, Wood, & Lund, 2005). El trasplante de células de EPR derivadas de células madre embrionarias humanas en ratas resultó en la recuperación funcional y estructural de la retina severamente dañada. Carr et al. encontraron que las células de EPR derivadas de hESC trasplantadas eran capaces de fagocitar los desechos de los fotorreceptores en ratas, no se encontraron pruebas de formación de teratomas (Carr et al., 2009).

Considerando que la lámina de células de EPR tiene una matriz extracelular y moléculas de adhesión que previenen la apoptosis, el trasplante de la lámina de células de EPR es mejor que el trasplante de suspensión celular para el tratamiento de la DMAE. El trasplante de láminas de células de EPR derivadas de iPSC autólogas en primates no mostró signos de rechazo ni formación de tumores, indicando que las láminas de células podrían ser una forma preferible de sustitución de células para la DMAE (Kamao et al., 2014).

La membrana de Bruch es una importante estructura que mantiene la homeostasis de la retina y brinda soporte para la adhesión, diferenciación y migración de las células del EPR. Para imitar el soporte brindado por la membrana de Bruch *in vitro* se crean soportes a partir de varios materiales, incluyendo polímeros orgánicos, nanofibras de biomateriales y biomateriales biodegradables. El tereftalato de polietileno o colágeno tipo I y poli (ácido láctico-glicólico) (PLGA), la fibroína de seda silvestre regenerada o una mezcla de hialurónico y metilcelulosa. Todos estos materiales son sustratos que brindan sostén a las células del EPR para mantenerlas vivas y funcionales después de ser trasplantada, sin embargo, la supervivencia a largo plazo de las células EPR en el espacio subretiniano y

la inflamación o el rechazo después del trasplante requiere una mayor estudio (Xiang et al., 2014).

Se ha demostrado que la integración del trasplante de las células de EPR derivadas de hESC dentro del espacio subretiniano es crítica para la restauración de la función retiniana largo plazo (Idelson et al., 2009).

En seres humanos se han y están llevando cabo varios ensayos clínicos que trasplantan células del EPR derivadas de células madre ya sean embrionarias o inducidas. Se han experimentado estos tratamientos en pacientes con DMAE y enfermedad de Stargart. Estos pacientes desarrollaron una pigmentación subretiniana visible que representa la integración de las células de EPR derivadas de hESC trasplantadas en el epitelio pigmentario receptor, esto ha sido observado por medio de OCT y fotografías del fondo de ojo. En todos estos pacientes la función visual se estabilizó o mejoró y no se observó ningún efecto adverso importante tras un año de seguimiento (Song et al., 2015).

V.2. Trasplante de fotorreceptores

El trasplante de precursores de fotorreceptores es una forma potencial de tratamiento para las enfermedades degenerativas retinianas causadas por la pérdida de fotorreceptores, como en la DMAE o en la retinosis pigmentaria. Fotorreceptores derivados de iPSC son una fuente viable para la producción de precursores de fotorreceptores para el reemplazo celular. Un estudio trasplantó en ratones *Gnat1^{-/-}* los precursores de fotorreceptores generados a partir de células madre embrionarias de ratones utilizando un protocolo de diferenciación en 3D. Los efectos del trasplante de fotorreceptores tipo bastón estuvieron influidos por los diferentes defectos genéticos, integridad de la membrana limitante externa y por la cicatriz glial (Gonzalez-Cordero et al., 2013).

Fotorreceptores derivados de iPSC han sido probados en ratones. Los precursores de bastones obtenidos de ESC y iPSC podrían generar una nueva capa de fotorreceptores y restaurar la función visual en ratones ciegos, con la reparación del circuito visual (Barber et al., 2013).

Las células precursoras de fotorreceptores derivadas de células madre, al ser trasplantadas podrían integrarse con mayor éxito a la neuroretina receptora mediante la clasificación de sus marcadores de superficie celular, en comparación de aquellas células trasplantadas

sin clasificar. Este procedimiento también disminuiría el número de células proliferantes perjudiciales (Lakowski et al., 2015).

Por otro lado, la inmunosupresión puede ser útil para promover la eficiencia clínica del trasplante celular. Se ha encontrado que los macrófagos y las células T pueden estar relacionados con el detrimento de la integración de los fotorreceptores integrados y que la supresión inmune podría incrementar significativamente la supervivencia de las células fotorreceptoras (West et al., 2010).

Para su aplicación clínica, las células de la retina desarrolladas con factores específicos han sido sometidas a pruebas para testar su capacidad de integración, obteniendo como resultado que el trasplante de células progenitoras de la retina en estadio temprano podría producir un tumor, pero la capacidad de las células en estadio tardío para integrarse en la retina del ratón se reduce en relación con la de las células progenitoras (West et al., 2012).

Estudios iniciales en modelos animales describieron que el trasplante de células madre precursoras de fotorreceptores restauraba parcialmente la visión, se asumió que este fenómeno era gracias a la migración e integración de las células donantes en el tejido receptor. Recientemente este concepto ha sido confrontado por múltiples reportes que proveen evidencia de que los fotorreceptores donantes intercambian material citoplasmático con los fotorreceptores hospederos (Singh et al., 2018). Por estos novedosos hallazgos se ha creado modelos animales para analizar la integración y el intercambio de material entre las células trasplantadas y las receptoras, por ejemplo Waldron et al. Intentaron determinar si los conos derivados de células madre y de donantes se integraban y/o intercambiaban material citoplasmático, encontraron que la transferencia de material está presente en una proporción significativa de células; sorprendentemente, un número considerable de conos también se había integrado aunque no en todos los modelos animales de retina receptora. Esto confirma la aparición de la integración de fotorreceptores en ciertos modelos de degeneración retiniana, todo ello resaltó la importancia del entorno del huésped para determinar el resultado del trasplante (Fig 4) (Waldron et al., 2018). El hallazgo de que el intercambio de material domina sobre la integración celular durante el trasplante de fotorreceptores puede facilitar la reinterpretación de los datos de ayuda funcional anteriores y ofrecer nuevos enfoques para la terapia visual (Nickerson, Ortin-Martinez, & Wallace, 2018).

Aunque se han hecho grandes avances en la transferencia de fotorreceptores derivados de células madre, aún solo se han realizado estudios preclínicos en modelos animales, no habiendo ningún ensayo clínico en pacientes humanos hasta el momento de trasplante de fotorreceptores, sin embargo si se han llevado a cabo ensayos clínicos con células progenitoras retinianas y células stem cell retinianas encontrando que las estas células son capaces de integrarse dentro de la retina degenerada y expresar proteínas específicas de los fotorreceptores y diferenciarse en células retinianas maduras. Otro ensayo clínico iniciado en 2019 determinará la seguridad de este procedimiento, mientras que los resultados secundarios buscarán los fotorreceptores y la preservación de la función visual con el uso de células madre de linaje retiniano (Jones, Lu, Girman, & Wang, 2017).

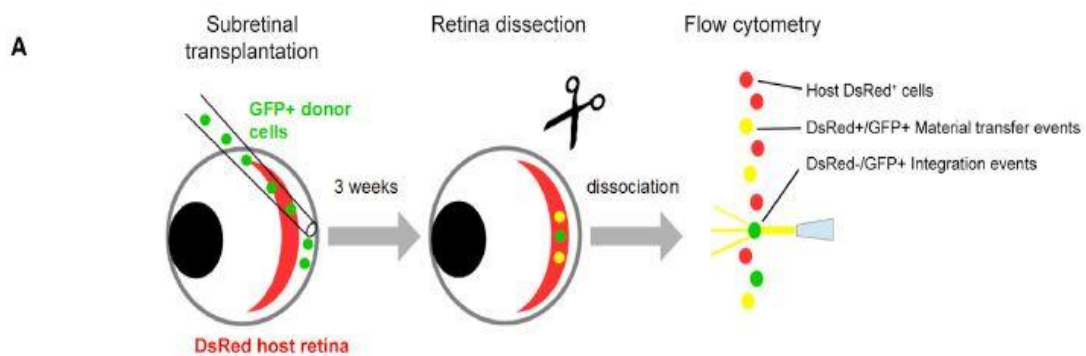


Fig. 4. Esquema del protocolo experimental de Waldron. Después del trasplante de las células fotorreceptoras se buscó la integración de las células trasplantadas en la retina hospedera y el intercambio de materia citoplasmática por medio de la citometría de flujo.

Waldron, P. V., Di Marco, F., Kruczek, K., Ribeiro, J., Graca, A. B., Hippert, C., ... Pearson, R. A. (2018). Transplanted Donor- or Stem Cell-Derived Cone Photoreceptors Can Both Integrate and Undergo Material Transfer in an Environment-Dependent Manner. *Stem Cell Reports*, 10(2), 406–421.

V.3. Trasplante de láminas de retina

El trasplante de láminas de retina fue realizado en animales y humanos hace décadas usando láminas retinianas disecadas de ojos donantes fetales (M J Seiler & Aramant, 1998), (Algvere, Berglin, Gouras, & Sheng, 1994). La restauración de la respuesta visual en el trasplante demostró que la conectividad entre el implante y el receptor contribuyeron a la mejora visual, apoyando la técnica del trasplante de láminas retinianas en modelos animales y humanos (Nazari et al., 2015), (Magdalene J. Seiler & Aramant, 2012).

El desarrollo de protocolos tridimensionales para la obtención de organoides retinianos ha permitido la preparación de tejido retiniano para injertos clínicos. El trasplante de una vesícula óptica derivada de células madre pluripotenciales inducidas y células madre embrionarias en ratones condujo a la formación de una capa de segmentos internos/segmentos externos (IS/OS) completa, además de la formación de sinapsis entre el injerto y las células del receptor; incluso mejorando la función visual como la respuesta a la luz y las descargas de las células ganglionares (Mandai, Fujii, et al., 2017).

Radtke llevo a cabo dos ensayos clínicos tipo I y II, donde trasplantó láminas de retina y EPR de fetos entre 10 y 16 semanas de edad gestacional a pacientes con retinitis pigmentosa y DMAE, no se observaron efectos adversos y 7 de los 10 pacientes del ensayo clínico mostraron mejoría de sus funciones visuales (Radtke, Seiler, Aramant, Petry, & Pidwell, 2002), (Radtke et al., 2008).

A pesar de los avances con el trasplante de organoides retinianos, la aplicación de estos injertos aún enfrenta obstáculos en términos de la generación de tejido retiniano laminado y la conectividad entre el tejido trasplantado y las células neuronales del hospedero.

V.4. Trasplante de células ganglionares

La muerte progresiva de células ganglionares de la retina (RGC: retinal ganglion cell) es una característica típica observada en pacientes con glaucoma. Varios estudios han buscado la diferenciación de células ganglionares a partir de células madre, y su trasplante en enfermedades que comprometan a las RGC como en el glaucoma. (Jin et al., 2018).

Dos retos son la migración de las RGC implantadas a través de la capa nuclear externa y la formación de sinapsis precisas que conecten con las áreas subcorticales.

RGC funcionales y maduras han sido obtenidas de células madre pluripotenciales bajo condiciones químicas definidas, creando una fuente ilimitada de células para la terapia de reemplazo celular; mientras que el análisis transcripcional de las RGC derivadas de células madre pluripotentes humanas fue realizado por Langer ([Langer et al., 2018](#)).

Muchos problemas permanecen sin resolver, como la forma más adecuada de liberar las células ganglionares dentro del ojo para evitar un daño significativo a los fotorreceptores, mejorar la eficacia de la migración y la integración, y mantener la función visual durante un tiempo prolongado después de la implantación.

Actualmente la gran mayoría de estudios concernientes a las RGC son pre-clínicos en modelos animales e incluyen el trasplante de células madre más que el implante de RGC maduras diferenciadas, esto debido a que la terapia de reemplazo basada en las RGCs derivadas de células madre exógenas sigue siendo un reto debido a los complejos circuitos que tienen los cuerpos de las células ganglionares en la retina interna y a la proyección axonal con un destino preciso en los colículos cerebrales ([Cen & Ng, 2018](#)).

Ante este inconveniente se ha utilizado células precursoras retinianas derivadas de células madre humanas con el propósito que se integren en la retina receptora y se diferencien en células ganglionares. Wang et al. demostraron que las células precursoras retinianas podían migrar e integrarse en la capa de células ganglionares teniendo una distribución complementaria en la capa de células ganglionares con las RGS residuales del modelo animal (ratón) receptor, además describió que estas células podían diferenciarse en células ganglionares ([S.-T. Wang et al., 2019](#)).

Otra posible estrategia de tratamiento para las disfunciones de las RGC es mediante la regeneración de células madre retinianas. Las células gliales de Müller pueden ser reprogramadas en células progenitoras retinianas mediante un proceso de diferenciación y re-diferenciación. En retinas de ratones se ha observado que las células de Muller pueden ser reprogramadas, proliferar y diferenciarse en RCG ([Sanges et al., 2013](#)).

Actualmente se están realizando varios ensayos clínicos para tratar las neuropatías ópticas con células madre, resalta entre estos el llevado a cabo en el IOBA-Uva (Valladolid-España) para tratar la neuropatía óptica isquémica no arterítica con células madre mesenquimales, este ensayo se encuentra registrado con el código NCT03173638.

V.5. Trasplante de células madre mesenquimales.

También se han llevado a cabo estudios preclínicos y ensayos sobre el trasplante de células madre mesenquimales indiferenciadas (Labrador-Velandia et al., 2016) (en contraste de las técnicas ya mencionadas anteriormente donde se trasplantaron células retinianas ya diferenciadas *in vitro* derivadas de células madre).

Varios investigadores han descrito que el trasplante de células madre mesenquimales (MSC: mesenchymal stem cell) de tejido adiposo y de médula ósea tiene un efecto neuroprotector de la células RGC degenerativas en modelos animales y no solo de sustitución de las células ya muertas (Emre et al., 2015).

Se ha observado que el número de RGC y axones se incrementan en un corto periodo de tiempo después del trasplante de MSC (Fig. 5). La protección de RGC ha sido funcionalmente demostrada en ratas con glaucoma después del trasplante de MSC obtenidas de la médula ósea (Hu et al., 2013).

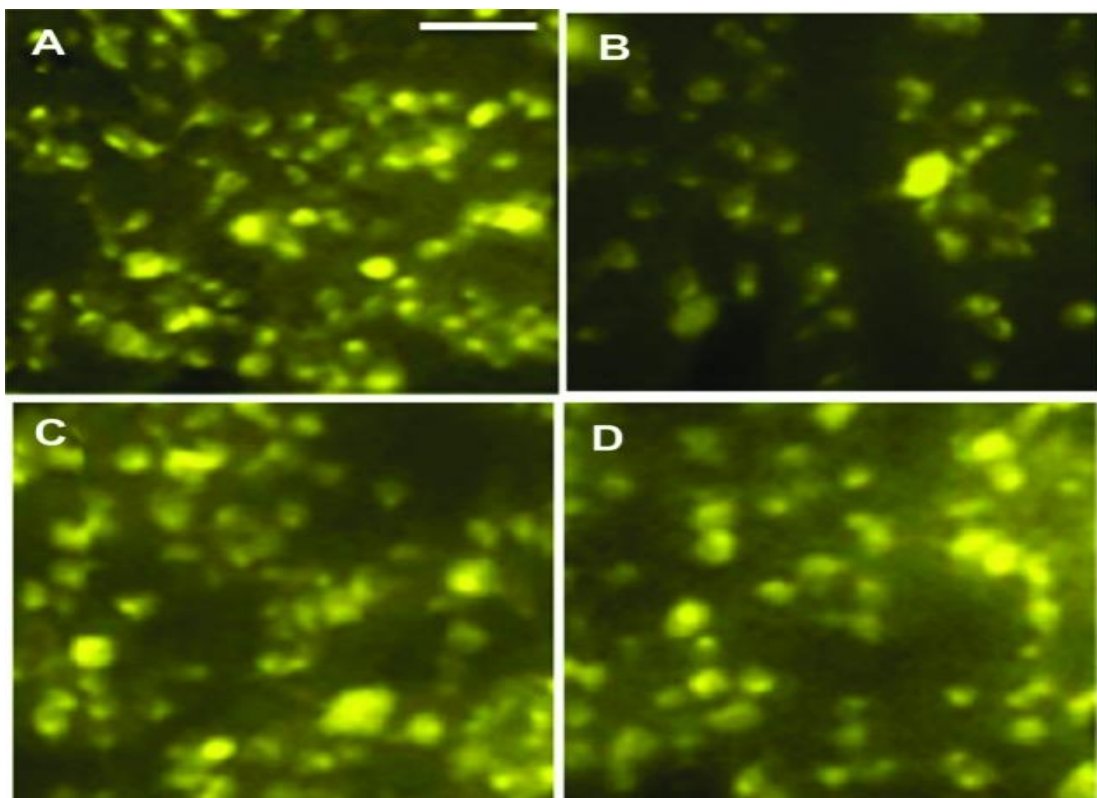


Fig. 5. Recuento con Fluorogold® de las células ganglionares retinianas supervivientes tras la cirugía para la elevación de la PIO. (A) Grupo de control (ratones sanos), (B) grupo de cirugía (ratones intervenidos con láser diodo para bloquear flujo de acuoso), (C) grupo de trasplante con bajo número de células mesenquimales y (D) grupo de trasplante con alto número de células mesenquimales. Imagen tomada de Hu, Y., Tan, H. B., Wang, X. M., Rong, H., Cui, H. P., & Cui, H. (2013). Bone marrow mesenchymal stem cells protect against retinal ganglion cell loss in aged rats with glaucoma. *Clinical Interventions in Aging*, 8, 1467–70.

El método quirúrgico para el trasplante de las MSC también afecta el tiempo de supervivencia de estas células en los ojos receptores de ratas. En tratados con inyección subretiniana, la función retiniana puede ser significativamente mejor que en los ojos de control hasta por 20 semanas, mientras que esta mejora se puede encontrar solo por hasta 12 semanas en los ojos inyectados por vía intravítrea. La inyección subretiniana de MSC puede beneficiar a las células ganglionares retinianas y también a los fotorreceptores (Tzameret et al., 2014).

El efecto trófico e inmunosupresor de las MSC está relacionado a los efectos paracrinos de estas células trasplantadas, que producen factores neuroprotectores. Las MSC pueden expresar una variedad de factores que protegen la retina dañada como el NFG, CNTF, BDNF, Bfgf, y el IGF1. Las MSC ejercen un efecto protector del nervio óptico a través de las células ganglionares y de sus axones en modelos animales de glaucoma. Existe evidencia que demuestra que las MSC podrían ejercer sus efectos terapéuticos a través de la transferencia intercelular a través de túneles formados por nanotubos. Por otro lado, se ha demostrado que las iPSC y las MSC pueden transferir mitocondrias sanas a células del epitelio corneal con defectos mitocondriales adquiridos. El papel de la transferencia mitocondrial de MSC y su mecanismo terapéutico nunca se ha estudiado (Osborne et al., 2018).

Ensayos clínicos de trasplante de células madre mesenquimales autólogas están siendo llevados a cabo, esto gracias a sus propiedades neuroprotectoras, inmunomoduladoras y regenerativas. Las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea son preferidas a aquellas derivadas del tejido adiposo. Un ensayo clínico halló que la inyección intravítrea de MSC derivadas de médula ósea mejoró la agudeza visual a los 3, 6, 9 y 12 meses después del trasplante en pacientes con DMAE (Cotrim, Toscano, Messias, Jorge, & Siqueira, 2017).

Un ensayo clínico fase II fue realizado en 20 pacientes con Retinitis Pigmentosa, halló que el trasplante de MSC mejoraba la calidad de vida durante los primeros 3 meses, aunque estos resultados no permanecieron estables después de los 12 meses de la intervención, dentro de estos pacientes se describió un caso con isquemia y edema macular que obtuvo una mejoría visual y disminución del edema macular (Siqueira et al., 2015).

VI. ENFERMEDADES DE LA RETINA EN LAS QUE SE APLICA LA TERAPIA CELULAR.

VI.1. Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE).

Esta enfermedad afectará aproximadamente a 200 millones de personal en el año 2020. En su estadio temprano, el signo principal de esta enfermedad es la aparición de drusas, las cuales son visibles con un diámetro mayor de 25 μ m. Las drusas están compuestas de lípidos, proteínas, RNA pequeños y gránulos de lipofuscina. Algunos de estos componentes pueden inducir la activación de la cascada de la inflamación, lo cual puede exacerbar la degeneración de células retinianas. El estadio tardío de la DMAE puede ser clasificado en dos formas: DMAE húmeda neovascular y la DMAE no neovascular seca, esta última también llamada atrofia geográfica. En algunos de estos pacientes, los cambios de la coriocapilar pueden ser detectados, observando vasos fantasmas en la coriocapilar cuando existe muerte de células endoteliales. Una posible causa de la muerte de células de la coriocapilar es la acumulación de complejos de ataque a membrana (MAC: membrane attack complex)([Mullins et al., 2014](#)).

En pacientes con DMAE húmeda, la visión central puede disminuir en un corto período de tiempo si la neovascularización coroidea o la fuga de líquido de los vasos afectan la mácula. En pacientes con DMAE seca la pérdida de la visión central es relativamente lenta y progresiva debido a la disminución gradual de la densidad de células del EPR. La disfunción y la degeneración del EPR son comunes en ambas formas de la enfermedad ([Jin et al., 2018](#)).

La patogénesis de la DMAE es compleja y asociada tanto a un componente genético, como a los factores ambientales. La mayoría de estos genes (incluyendo el factor H del complemento (CFH: complement factor H), C2, C3, CFB, receptor toll-like 3 (TLR3: toll-like receptor 3), y receptor toll-like 4 (TLR4)), están comprometidos en las vías del complemento o relacionados con el sistema inmune. Algunas mutaciones de estos genes han sido asociadas con la DMAE. El factor del complemento H que puede ser detectado en las drusas, juega un rol esencial en la regulación de la activación del complemento, las mutaciones en el gen de CFH pueden conducir a la destrucción de los fotorreceptores y las células del EPR ([Collard et al., 2000](#)).

Factores ambientales tales como la dieta, el hábito tabáquico y la exposición a la luz, también han sido asociados a la DMAE.

El daño acumulado en el epitelio pigmentario de la retina, la membrana de Bruch, y la coriocapilar conducen a la disfunción y pérdida de las células del EPR. Esto causa una degeneración de los fotorreceptores con la consecuente disminución de la visión en DMAE seca (atrofia geográfica). En la DMAE húmeda el crecimiento de capilares anormales conduce a la hemorragia y fuga de fluido, siendo estas las principales causa de la disminución visual (Jones et al., 2017).

Actualmente la DMAE es un proceso irreversible, y no cuenta con una cura. Algunos tratamientos que tienen como diana la neovascularización pueden disminuir la progresión de la pérdida visual y los síntomas de la enfermedad. Estos tratamientos que incluyen la inyección de anti-VEGF y la extracción quirúrgica de la membrana neovascular han demostrado ser efectivos en la DMAE neovascular. Sin embargo, la atrofia geográfica permanece sin tratamiento efectivo (Binder et al., 2004).

VI.1.1. Tratamiento

Actualmente existen fármacos para el tratamiento de la DMAE húmeda, sin embargo, no hay un tratamiento para la DMAE seca. Ante este escenario, la sustitución del EPR muerto o disfuncional por EPR sano puede ser un tratamiento para estos procesos degenerativos ya que se han obtenido mejorías de la visión en modelos animales de degeneración retiniana, esto ha animado al uso de estas técnicas basadas en célula madre en pacientes, reportándose resultados satisfactorios (Nazari et al., 2015).

El trasplante autólogo de EPR periférico debajo de la mácula ha proveído evidencia que el reemplazo de células de EPR puede mejorar la función visual; abriendo un potencial terapéutico para la DMAE (Algyere, Berglin, Gouras, Sheng, & Kopp, 1997). La limitada fuente de células autólogas de EPR periférico está evitando que esta técnica se extienda.

Los trastornos de la retina relacionados con la edad son causados principalmente por la degeneración y pérdida de células especializadas de la retina, por lo que las terapias para incrementar su supervivencia o incluso su reemplazo por parte de descendientes de células madre pueden ofrecer enfoques de tratamiento eficaces. Se ha observado que las MSC son productoras de numerosos factores de crecimiento y diferenciación que pueden ayudar a la supervivencia de las células en la retina enferma (Mead, Logan, Berry, Leadbeater, & Scheven, 2017).

El daño de la retina también está asociado con una reacción inflamatoria local que impide el proceso de curación. Se ha observado que las MSC, por sus propiedades

inmunosupresoras, inhiben la producción de citoquinas proinflamatorias por las células retinianas. Estas propiedades inmunorreguladoras de las MSC pueden representar un mecanismo importante para prevenir una reacción inflamatoria local dañina y para apoyar el proceso de curación (Holan, Hermankova, & Kossl, 2017).

Por otro lado, se ha demostrado que las MSC se diferencian en varios tipos celulares, expresando marcadores celulares y características específicas de las células retinianas. El trasplante celular representa una estrategia terapéutica prometedora para el reemplazo de las células muertas en la DMAE en estado avanzado. Varios ensayos clínicos están siendo realizados actualmente para evaluar la seguridad y eficacia de células de EPR derivadas de células madre pluripotenciales para el tratamiento de la DMAE. Los resultados iniciales son alentadores, demostrando la seguridad del procedimiento, al menos dentro de los primeros 5 años, la estabilización y la ganancia de la agudeza visual mejor corregida, lo cual podría explicarse por parcialmente por el trasplante de EPR en receptores que no padecían una enfermedad avanzada (Gasparini, Llonch, Borsch, & Ader, 2018).

Da Cruz et al. están realizando un ensayo clínico fase 1, reclutará 10 pacientes diagnosticados de DMAE exudativa, ha publicado los resultados de los primeros dos pacientes. Para este ensayo su grupo diseñó un parche de EPR que comprende una monocapa de EPR totalmente diferenciada, derivada de células madre embrionarias humanas, sobre una membrana basal sintética recubierta. El parche fue aplicado, utilizando una herramienta microquirúrgica en el espacio subretiniano de un ojo en cada uno de los dos pacientes con DMAE exudativa grave. Las variables principales de evaluación fueron la incidencia y la gravedad de los eventos adversos y la proporción de sujetos con una mejoría en la agudeza visual corregida de 15 letras o más. El estudio del implante y la supervivencia del parche de EPR se realizó mediante biomicroscopía y tomografía de coherencia óptica. En los dos pacientes se reportó que el procedimiento de implante y la supervivencia del mismo fue exitoso y en ambos obtuvieron un aumento de la agudeza visual de 29 y 21 letras, respectivamente, después de 12 meses del trasplante (**Fig. 6**). Sólo se utilizó la inmunosupresión local a largo plazo. Este trabajo apoya la viabilidad y seguridad del trasplante de parches de EPR derivado de hESC como estrategia regenerativa para la DMAE (da Cruz et al., 2018).

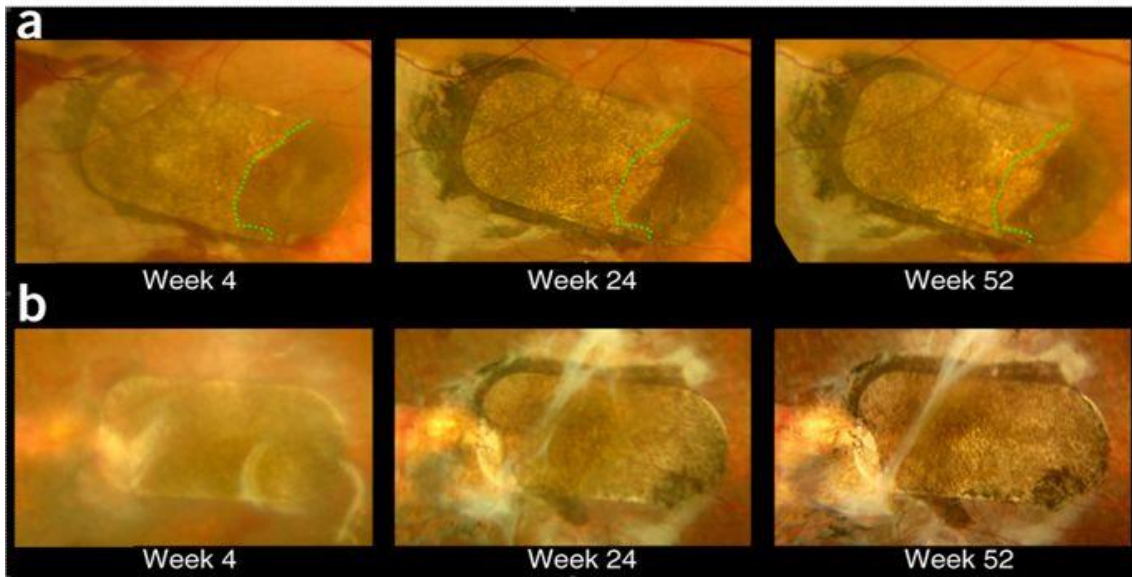


Fig. 6. Se muestra las secuencias de fotografías en color del parche trasplantado en los casos 1 y 2. **(a)** La secuencia del paciente 1 a las semanas 4, 24 y 52 después del trasplante del implante, muestra la expansión centrífuga de las áreas pigmentadas alrededor del parche y la estabilidad de las zonas pigmentadas del mismo; también se muestra la regresión del EPR del receptor en el parche, con el margen original indicado por la línea de puntos. **(b)** La secuencia en el paciente 2 en la semana 4, 24, y 52 muestra la expansión centrífuga de las áreas pigmentadas alrededor del parche y las áreas relativamente estables de pigmentación en el parche. La expansión de las áreas pigmentada en ambos pacientes se estabilizó en la semana 24.

Imagen tomada de: da Cruz, L., Fynes, K., Georgiadis, O., Kerby, J., Luo, Y. H., Ahmado, A., Coffey, P. J. (2018). Phase 1 clinical study of an embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium patch in age-related macular degeneration. *Nature Biotechnology*, 36(4), 328–337.

VI.2. Retinitis Pigmentosa (RP)

La RP es una causa de ceguera en pacientes de mediana edad o menores, afecta a cerca de dos millones de personas alrededor del mundo. La edad de aparición de la RP varía desde la infancia hasta la edad media, además de tener amplia variabilidad en sus fenotipos (Strauss, 2005).

Estos pacientes pueden experimentar ceguera nocturna y pérdida severa de la visión con el desarrollo de la enfermedad, alrededor de los 40 años la mayoría de los pacientes son legalmente ciegos. La ceguera nocturna es causada por la pérdida primaria de los bastones en la periferia retiniana, encargados de la visión excéntrica en condiciones escotópicas. Con la progresión de la enfermedad, aparece la degeneración de los conos que conduce a una pérdida de la visión central y de los colores (Jones et al., 2017).

La RP es una enfermedad retiniana degenerativa heredada que muestra una gran heterogeneidad genética. Los genes causantes de la RP pueden ser categorizados en 8 clases según sus funciones biológicas, estas incluyen: la cascada de la fototransducción, el metabolismo de la vitamina A, los factores de empalme de intrones de RNA, estructural o formación del citoesqueleto, interacción sináptica, tráfico intracelular, pH regulación, preservación de los cilios y la fagocitosis del EPR. A pesar del incremento del número de genes conocidos causantes de la enfermedad, no en todos los pacientes se puede hallar la predisposición genética en los genes hasta ahora conocidos (Jin et al., 2014).

La mayoría de casos de RP son debido a la degeneración celular tanto del EPR, como de los fotorreceptores que son causados por las mutaciones genéticas (Maeda et al., 2019).

VI.2.1. Tratamiento

Dado que el mecanismo de muerte celular en esta enfermedad no es bien conocido, no se han desarrollado tratamientos efectivos. La suplementación dietética es recomendada por muchos oftalmólogos cuando observan progresión en los estadios tempranos de la enfermedad (Jin et al., 2018).

El trasplante de una retina artificial, el sistema de estimulación retiniana “El Argus II”, ha sido aprobado por la FDA y ha logrado mejorar la función visual en pacientes con RP en estadios tardíos (Luo & da Cruz, 2016).

Los ensayos clínicos consistentes en el trasplante de células ARPE 19 que expresan factor neurotrófico, como el factor neurotrófico ciliar (CNTF: ciliar neurotrophic factor) han

dado resultados contradictorios, obteniendo resultados similares al desarrollo natural de la enfermedad (Birch, Bennett, Duncan, Weleber, & Pennesi, 2016).

La terapia de reemplazo celular es considerada un gran método en expansión para su aplicación en esta enfermedad. Para las células madre pluripotenciales inducidas (iPSC) derivadas de pacientes, las estrategias de edición del genoma CRISPR / Cas9 también se pueden integrar para corregir defectos genéticos antes del trasplante (Burnight et al., 2017).

Li et al. realizaron un ensayo clínico fase 1 (ChiCTR-TNRC-08000193) para establecer la seguridad y tolerabilidad del trasplante de células progenitoras retinianas en 8 pacientes con diagnóstico de RP avanzada, siendo estudiados por 24 meses. Se trasplantaron 1×10^6 de células de fotorreceptores alogénicas derivadas de células madre embrionarias humanas. Tras llevar a cabo una vitrectomía estandarizada de 3 puertos, se realizó una retinotomía con una aguja de 39G en la región supero-temporal a la mácula, donde se inyectó la suspensión con las fotorreceptores a trasplantar, creando una ampolla subretiniana. En este estudio se observó una recuperación moderada de la visión y la conservación del grosor de la capa nuclear externa de la retina (**Fig. 7**). Además no se halló ninguna formación tumoral ni rechazo inmune, cuando el tratamiento inmunosupresor no se administró. En este ensayo clínico 5 pacientes mostraron una mejoría estadísticamente significativa de su agudeza visual, y un incremento de la sensibilidad retiniana a las respuestas pupilares en tres de los ocho pacientes entre 2 y 6 meses después del trasplante, pero esta mejoría no apareció a los 12 meses (Liu et al., 2017).

Es posible que la pérdida del efecto después de los 6 meses del trasplante se deba a una reacción inflamatoria crónica presente en los ojos de pacientes con retinitis pigmentosa. Conforme la degeneración retiniana se agrava, un mayor número de células gliales se activa secretando factores inflamatorios que disminuyen la posibilidad de sobrevivencia de las células trasplantadas. (Liu et al., 2013)

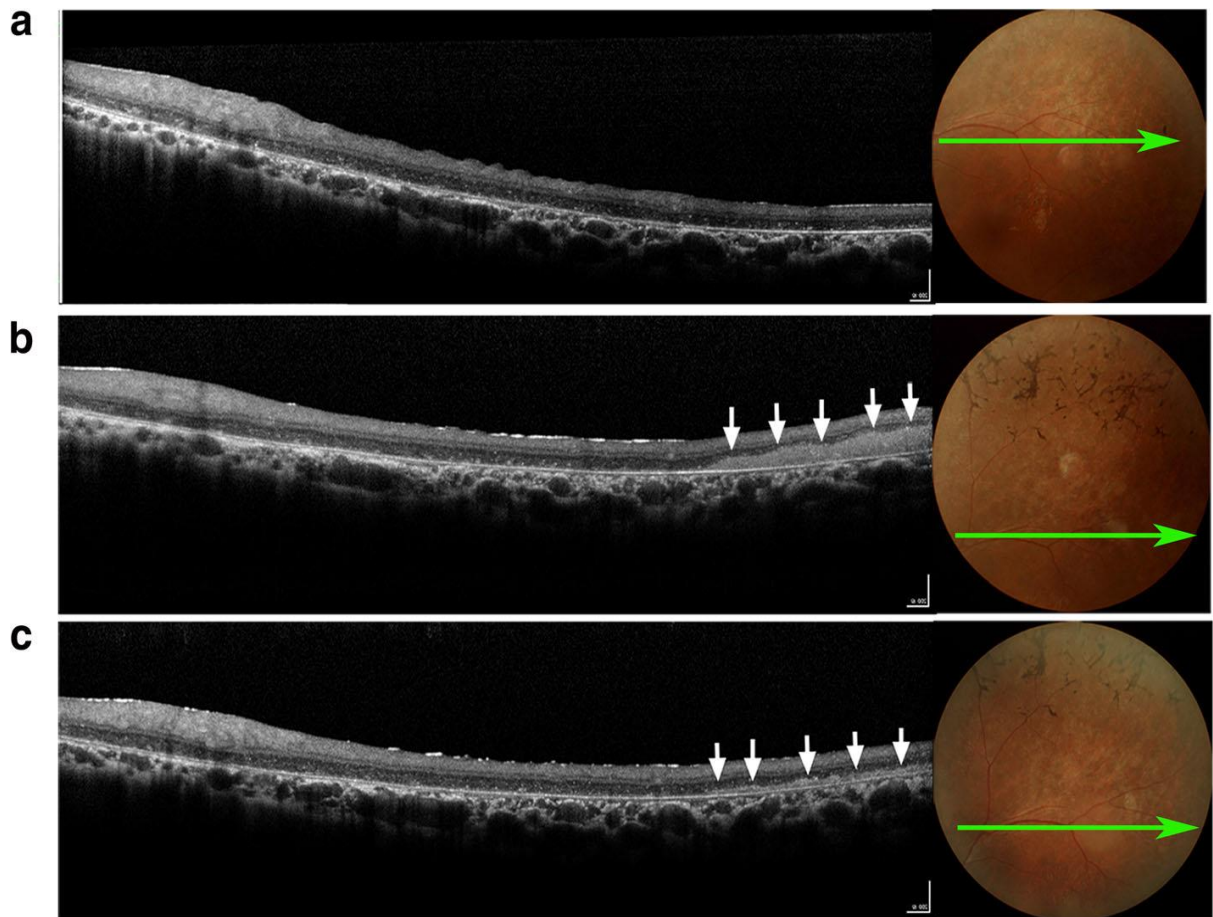


Fig. 7. Representación de la retina y características morfológicas antes y después del trasplante celular en el paciente número 6, diagnosticado de retinitis pigmentosa avanzada. **a:** Imagen de OCT con exploración horizontal a lo largo del área macular superotemporal antes de la cirugía. Se observa la atrofia de los fotorreceptores. **b:** En el día postoperatorio 7, se visualiza una masa de células trasplantadas (flechas) con reflectividad media densa, encontrándose entre la capa degenerada de fotorreceptores y el epitelio pigmentario de la retina. **c:** 1 mes después de la cirugía se puede observar la presencia de células trasplantadas, aunque el grosor se ha reducido notablemente (flechas).

Imagen toma de Liu, Y., Chen, S. J., Li, S. Y., Qu, L. H., Meng, X. H., Wang, Y., Yin, Z. Q. (2017). Long-term safety of human retinal progenitor cell transplantation in retinitis pigmentosa patients. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1), 209.

VI.3. Enfermedad de Stargardt

La enfermedad de Stargardt se caracteriza por el depósito de sustancias similares a la lipofuscina en el EPR con la consecuente muerte de los fotorreceptores en la región macular. Las mutaciones más frecuentes ocurren en el gen ABCR (también conocido como gen ABCA4), el cual consiste de 50 exones y codifica una proteína de 2273 aminoácidos. ABCR es una proteína de casete unida a ATP (ABC: ATP binding cassette) específica para la retina que desempeña un papel clave en el ciclo de los retinoides, la disfunción de este gen conduce a la acumulación de N-retinilideno-Nretinil-etanolamina (A2E), un componente principal de la lipofuscina, en células RPE. La acumulación de A2E parece ser responsable de la pérdida de fotorreceptores y células del EPR, conduciendo a una pérdida severa de la agudeza visual en los pacientes que sufren esta enfermedad.

VI.3.1. Tratamiento

No existe un tratamiento efectivo clínicamente disponible para disminuir la progresión de la enfermedad de Stargardt en nuestros pacientes.

Se ha propuesto que la terapia de reemplazo celular puede compensar la carencia de tratamiento. En la última década, dos estudios han intentado el trasplante del EPR derivado de células madre embrionarias humanas, dentro del espacio subretiniano macular de pacientes con distrofia macular de Stargardt, obteniendo resultados promisorios para esta enfermedad ([Schwartz et al., 2015](#)).

La reparación del EPR degenerado mediante el trasplante de células EPR sanas ofrece la posibilidad de proteger o mejorar la visión mediante la preservación de la función o la supervivencia de las células fotorreceptoras. Manjit et al llevaron a cabo un ensayo clínico fase 1-2 ([NCT01469832](#)) para evaluar la seguridad y la eficacia potencial del trasplante alogénico de células de EPR derivadas de célula madre embrionarias humanas (hESC) en doce pacientes con diagnóstico de enfermedad de Stargardt en estado avanzado, los resultados del ensayo no hallaron evidencia de una respuesta inflamatoria o proliferación intraocular o sistémica no controlada, después de la administración subretiniana de hasta 200000 células de EPR derivado de células madre embrionarias humanas (**Fig. 8**). No hubo eventos adversos graves relacionados con el procedimiento quirúrgico; los eventos adversos intraoperatorios no causaron daño a la función visual más allá del período postoperatorio inmediato ([Mehat et al., 2018](#)).

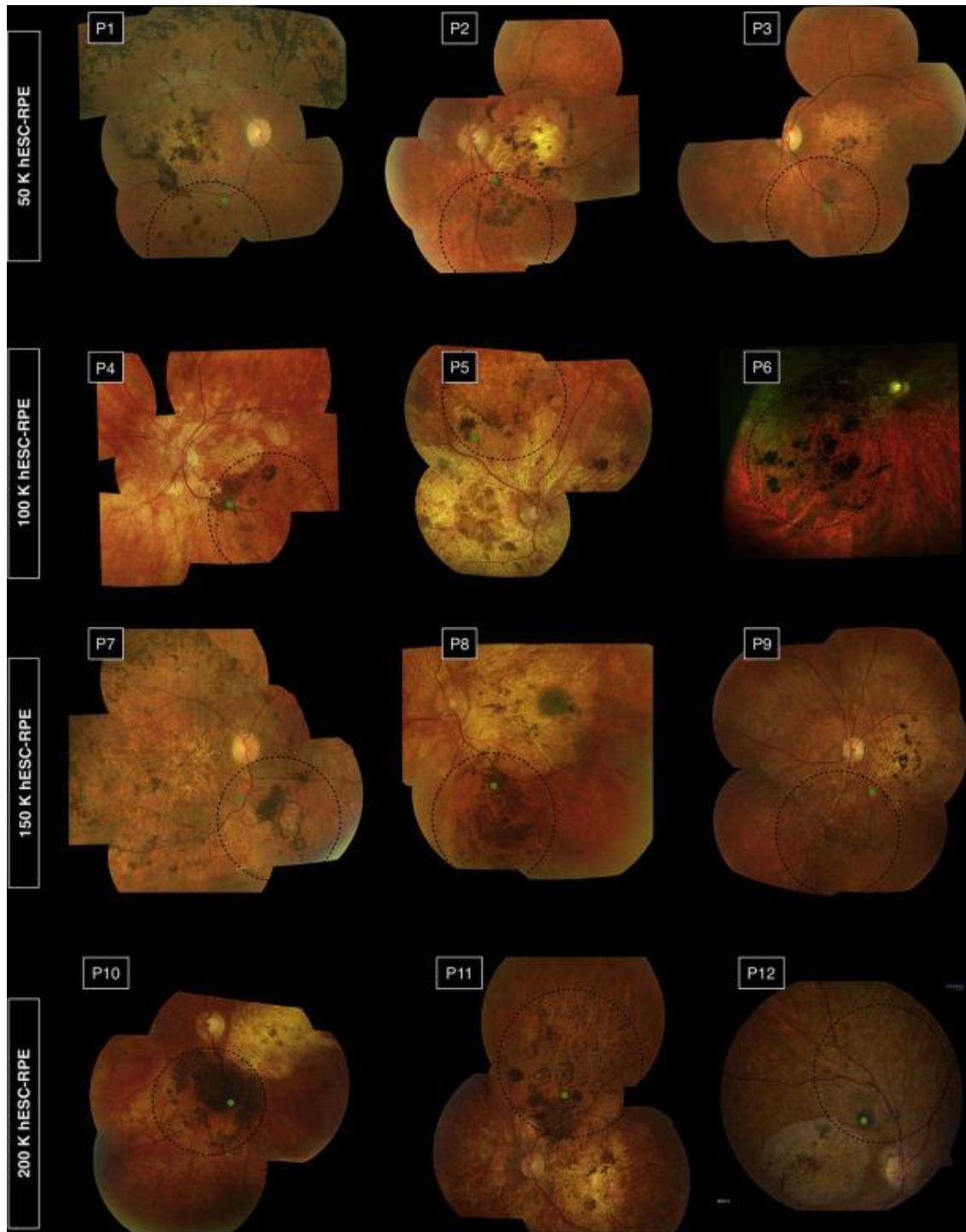


Fig. 8. Fotografías de fondo de ojo de receptores a los 12 meses del trasplante. En cada imagen, el sitio de la retinotomía está indicado por el punto verde, y el área de administración subretiniana está delineada por la línea negra punteada. P = paciente.

Tomado de Mehat, M. S., Sundaram, V., Ripamonti, C., Robson, A. G., Smith, A. J., Borooh, S., ... Bainbridge, J. W. B. (2018). Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells in Macular Degeneration. *Ophthalmology*, 125(11), 1765–1775

Una breve disminución de la agudeza visual en el ojo operado después de la administración de células de EPR derivadas de hESC fue una consecuencia temporal predecible de la cirugía intraocular. También se observó el desarrollo de membranas epirretinianas pigmentadas después de la inyección de células EPR derivadas de hESC y esto es debido al reflujo de la suspensión celular del espacio subretiniano. Por otro lado, se constató que los eventos adversos relacionados con los medicamentos inmunosupresores ocurrieron durante el período de su administración, pero no tuvieron impacto posterior (Mehat et al., 2018).

El desarrollo de la hiperpigmentación dentro del área de inyección en los 12 pacientes participantes de este estudio, fue dosis dependiente y asociada con una señal hiperreflectiva en el OCT, lo cual sugiere la supervivencia de las células de EPR trasplantadas. La alta densidad de la pigmentación en estas áreas puede reflejar un contenido alto de melanina, densidad más alta, hipertrofia o células sobrevivientes del EPR trasplantado organizado en multicapas (Mehat et al., 2018).

Mehat et al observaron que en los ojos trasplantados hubo una extensión local progresiva de la hiperpigmentación durante los primeros 3 meses, mostrando predilección por las áreas de atrofia de la retina receptora, estos hallazgos son consistentes con la migración de las células sobrevivientes trasplantadas, aunque puede representar la migración subretiniana o la liberación de pigmento Sin embargo, la presencia de material subretiniano pigmentado no es una evidencia definitiva de la supervivencia de las células trasplantadas, ya que puede reflejar la persistencia de pigmento de melanina después de su muerte, una consecuencia del trasplante que también podría ser dosis dependiente. Debido a que el trasplante de las células de EPR derivado de las hESC fue alogénico, se administró tratamiento sistémico inmunodepresor para todos los pacientes reclutado en este estudio, el tratamiento duró 13 semanas, no observándose signos evidentes de rechazo ni cambios tras la retirada del tratamiento inmunosupresor (Mehat et al., 2018).

En este ensayo no se encontró ningún beneficio significativo para la función retiniana a los 12 meses en los 12 participantes. Aunque teóricamente el trasplante de células de EPR puede mejorar la función de las células fotorreceptoras superpuestas, el potencial de mejora está limitado, en esta población de pacientes reclutados, por la gravedad de la degeneración retiniana (Mehat et al., 2018).

VI.4. Glaucoma

Es la enfermedad neurodegenerativa más prevalente, afectando a más de 70 millones de personas alrededor del mundo. La etiología del glaucoma es relativamente compleja, observándose, en los pacientes con glaucoma, cambios relacionados a la toxicidad por glutamato, estrés oxidativo y cambios gliales reactivos (Yücel, 2007).

La presión intraocular es determinada por la dinámica de la producción, del flujo y del drenaje del humor acuoso secretado por el cuerpo ciliar. La malla trabecular y el flujo uveoescleral son dos vías independientes para el drenaje del humor acuoso. Tanto la disfunción de la malla trabecular como el bloqueo de la malla por una posición anómala del iris pueden conducir a una de las dos diferentes clases de glaucoma: el glaucoma de ángulo abierto y el glaucoma de ángulo cerrado (Dascalescu et al., n.d.).

VI.4.1. Tratamiento.

Actualmente, el control de la presión intraocular mediante medicación o cirugía son los principales tratamientos que han demostrado disminuir la progresión de esta enfermedad. Aunque estos tratamientos pueden retrasar el desarrollo de la enfermedad, ellos no pueden prevenir la neurodegeneración ni el deterioro de la visión que resulta del daño del nervio óptico y la pérdida de las células ganglionares de la retina, siendo este daño irreversible (Conlon, Saheb, & Ahmed, 2017).

Se ha probado que las MSC extraídas de la médula ósea pueden ejercer un efecto neuroprotector y promover la sobrevivencia de las células ganglionares de la retina en ratas adultas con glaucoma (Hu et al., 2013). Aunque la neuroprotección de las MSC puede proveer otra alternativa potencial para el tratamiento del glaucoma, es mucho más difícil regenerar las células ganglionares de la retina y el nervio óptico más allá de los efectos paracrinos de esta estrategia de tratamiento de reemplazo celular.

- I. Algunos grupos han desarrollado terapias celulares adaptadas para la neuroprotección y la regeneración de RGC. Tras probar diferentes fuentes celulares se ha llegado al consenso que probablemente las MSC son las mejores células para este propósito. Las MSC son incapaces de diferenciarse en células retinianas e integrarse en la retina, pero ha sido reportado que tienen una actividad paracrina que brinda neuroprotección a las células RGC en distintos modelos. Este efecto se ha atribuido a la secreción del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF: platelet-derived growth factor), al factor NGF, BDNF y a la Neurotrofina 3. Estos factores tróficos influyen

en la supervivencia de las RGC y en la regeneración axonal. Además, la liberación de microvesículas por las MSC, la liberación de factores neurotróficos específicos y miARN, podrían mediar el efecto neuroprotector ([Rabesandratana et al., 2018](#)).

Osborne et al realizaron un estudio investigando si las MSC humanas (hMSC) o el factor de crecimiento derivado de las plaquetas recombinante (PDGF), producido por hMSC; podrían retrasar la muerte de RGC en un modelo de explante retiniano humano con lesión del nervio óptico. Los resultados mostraron que las hMSC y el factor de crecimiento secretado PDGF pueden reducir sustancialmente la pérdida y la apoptosis después de la axotomía de las RGC humanas. Las vías neuroprotectoras AKT, ERK y STAT3 se activan en la capa RGC poco después de los tratamientos. Se observó un efecto protector dependiente de la dosis de PDGF en explantes de retina, pero la protección no fue tan importante como la obtenida en el cultivo de hMSC donde se obtuvo recuentos de células RGC similares a los inmediatamente después de la disección de los explantes (**Fig. 9**). Estos resultados demuestran que las hMSC y el PDGF tienen una fuerte acción neuroprotectora en las RGC humanas y pueden ofrecer una estrategia terapéutica para reducir la pérdida visual degenerativa ([Osborne et al., 2018](#)).

En España, específicamente en el IOBA, se está llevando a cabo un ensayo clínico con el objetivo de evaluar la seguridad de la inyección intravítrea de células madre mesenquimales como posible tratamiento para pacientes con neuropatía óptica isquémica anterior no arterítica aguda (NOIANA).

El objetivo general del proyecto es evaluar la seguridad de la administración intravítrea de células madre mesenquimales para el tratamiento de la NOIANA, enfermedad que a día de hoy carece de cualquier tratamiento.

Este ensayo clínico se sustenta en estudios preclínicos previos donde se realizó evaluación de la seguridad y la tolerancia de las células madre mesenquimales tras inyección intravítrea, mediante la observación de los efectos adversos a nivel ocular (exploración oftalmológica) y mediante el estudio histopatológico de los tejidos oculares en conejo. En estos estudios se concluyó que las MSC administradas bajo inyección intravítrea en una dosis de 750.000 cels/50µl, son seguras y bien toleradas, ya que no se ha observado signos de infección y/o inflamación ni cambios tisulares a nivel histológico, que puedan ser considerados relevantes durante un período de seguimiento de seis semanas en conejos

macho y hembra. Este estudio condujo a que la dosis a utilizar en el ensayo clínico fase I/II será de 750.000 cels/50µl.

Por otro lado, también se observó que las MSC permanecen dentro de la cavidad vítrea, tienen especial tropismo por la región vítrea cercana a la cápsula posterior del cristalino y a la cabeza del nervio óptico. Además no se apreció migración extraocular hacia los principales órganos hematopoyéticos ni gonadales en los conejos hembras y machos.(Labrador Velandia et al., 2018).

En estudios preclínicos previos presentes en la literatura y en un estudio preclínico desarrollado por el IOBA, se ha visto que la supervivencia de las MSCs administradas mediante inyección intravítrea es de al menos dos, pero no más de seis semanas tras la inyección intravítrea, lo que sería una gran ventaja para abordar la patología de estudio (NOIANA) dentro de la ventana terapéutica de esta patología (Labrador-Velandia et al., 2016).

Todos estos resultados de estudios previos han permitido establecer los parámetros de seguridad, persistencia, distribución y migración de las MSC en conejos y el desarrollo y realización del ensayo clínico fase I-II en seres humanos

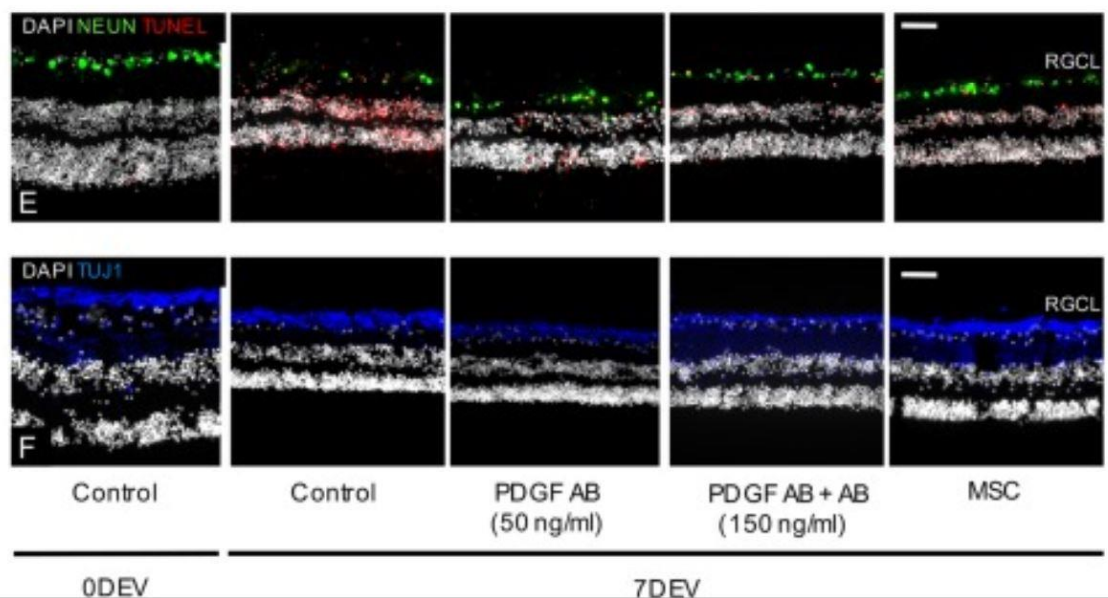


Fig 9. Imágenes ampliadas y representativas de RGCs (NeuN - verde o TUJ1 - azul) en explantes de retina humanos con células apoptóticas marcadas de rojo. × 40 objetivo, barra de escala = 50 µm.

Imagen adaptada de Osborne, A., Sanderson, J., & Martin, K. R. (2018). Neuroprotective Effects of Human Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Derived Growth Factor on Human Retinal Ganglion Cells. *STEM CELLS*, 36(1), 65–78.

VII. TENDENCIAS FUTURAS DEL TRATAMIENTO BASADO EN CÉLULAS MADRE

VII.1. Terapia de Reemplazo Celular Combinada de EPR y Células Progenitoras Retinianas.

La terapia celular basada en células madre para la DMAE se centra principalmente en reemplazar el EPR para mantener la función normal o en sus características paracrinas para retardar-frenar la regeneración, como la fagocitosis, o trasplantar células progenitoras retinianas para regenerar elementos retinianos perdidos, incluyendo los fotorreceptores. Sin embargo, en pacientes con muerte de fotorreceptores en forma extensa, necesitará la sustitución de las células fotorreceptoras junto a células del EPR. Nistor et al desarrollaron un injerto tridimensional que contenía células de EPR y células progenitoras de la retina, derivadas de células madre embrionarias humanas. Este tejido expresó marcadores de células ganglionares de la retina, fotorreceptores y otras células neuronales (Nistor, Seiler, Yan, Ferguson, & Keirstead, 2010).

VII.2. Terapia Génica Combinada con Células Madre

Las células hESC pueden ser manipuladas genéticamente para modificar un gen terapéutico, ya sea activo o en espera de activación posterior una vez que el hESC modificada se haya diferenciado en el tipo de célula deseada. En las iPSC obtenidas a partir de las propias células de un paciente se puede reemplazar un gen defectuoso por una copia normal. Las células madre reparadas podrían entonces ser dirigidas para formar el tipo de tejido necesario, implantadas dentro del ojo y utilizadas para reconstituir el tejido enfermo (Simara, Motl, & Kaufman, 2013).

La restauración de la función normal de los genes en los cultivos de iPSC podría lograrse utilizando vectores virales que se están empleando actualmente en los ensayos clínicos de terapia génica humana. La capacidad de autorrenovación de las células madre también sugiere que hay una mínima necesidad de proporcionar administraciones repetidas de terapia génica y un mejor mantenimiento de los efectos terapéuticos (Maeda et al., 2019).

VII.3. Ingeniería de Tejidos

La implantación de células cultivadas en finas películas de polímero podría proporcionar un medio de trasplante de una lámina de células de EPR con características apicales/basales para el restablecimiento de la función normal de EPR *in vivo*. La evidencia ha demostrado que el uso de un andamiaje de polímeros podría ofrecer una mejor manipulación del entorno extracelular y permitir el grado más apropiado de aplicación, diferenciación y preservación de las funciones celulares (Kundu, Michaelson, Baranov, Young, & Carrier, 2014).

VII.4. Movilización de células madre específicas de tejidos

Se ha diseccionado y cultivado diferentes subregiones de los ojos humanos de diferentes rangos de edad y demostró que las células madre podrían derivarse de la pars plicata y la pars plana con una frecuencia del 0,2%. Para probar la funcionalidad de estas células madre, fueron trasplantadas dentro de ratones NOD/SCID donde sobrevivieron, migraron, se integraron y diferenciaron en diferentes células retinianas incluyendo fotorreceptores (Coles et al., 2004). Por otro lado, se ha demostrado que una subpoblación de EPR humano adulto puede mostrar propiedades de autorrenovación, perder los marcadores EPR y rediferenciarse en células pigmentadas estables y adoquinadas en una sola capa con otras características EPR. Aún está por determinarse si los mecanismos regenerativos están presentes en la retina humana y si pueden ser movilizado para reparar la retina dañada, es decir que haya un potencial regenerativo intrínseco de la retina usando células retinianas endógenas; células de EPR y las células de Muller pueden ser usadas para este propósito, siendo capaces de ser reprogramados en una nueva célula retiniana, por ejemplo fotorreceptores (Zhao et al., 2014).

VIII. RETOS FUTUROS

Existen obstáculos potenciales con respecto al uso de MSC en las enfermedades de la retina.

Primero, es un desafío conocer y controlar los factores secretados por las MSC y cómo estos factores podrían cambiar con el tiempo y con la progresión de la enfermedad.

En segundo lugar, siguen existiendo preguntas sobre el potencial tumorigénico de las células madre, y es que estas células tienen un increíble parecido a las células cancerosas. Hay un riesgo latente de formaciones tumorales como el observado en ratones inmunodeprimidos donde las células madre trasplantadas formaron teratomas. Una posible solución a estos inconvenientes es el trasplante de láminas retinianas donde las células ya se encuentran diferenciadas, y un estudio riguroso de las anomalías cromosómicas y los cambios genómicos que podrían incrementar el potencial tumoral de las células madre.

En tercer lugar, las MSC también secretan factores que causan una gliosis reactiva extensa y una inflamación que podría contribuir al desprendimiento de retina. En explantes humanos, se observó un aumento en la proliferación de la microglía y la gliosis después del tratamiento con hMSC. Esto tendría serias consecuencias para la visión de un paciente y presenta una barrera para el tratamiento basado en MSC sin estrategias antiinflamatorias adecuadas.

Por otro lado, encontramos la limitación derivada de la formación de sinapsis aberrantes y es que es un verdadero reto que las células madre migren a una localización neuroanatómica específica y que luego formen las correctas uniones sinápticas con células que se encuentran en proceso de degeneración, esto teóricamente podría distorsionar y empeorar la imagen percibida por los pacientes.

IX. CONCLUSIONES

1. La evidencia de seguridad respalda ampliamente la justificación de estudios adicionales para explorar el impacto de la intervención en una etapa más temprana de la degeneración cuando las células de fotorreceptores sobrevivientes pueden beneficiarse con una mejor función y supervivencia.
2. Existe evidencia sobre la seguridad y eficacia de estas células, lo que debe promover nuevos ensayos clínicos en pacientes con estadios moderados y leves de las enfermedades degenerativas de la retina.
3. Se necesitan estudios adicionales que intenten solucionar las dudas planteadas por este nuevo enfoque terapéutico, además de ayudar a resolver los obstáculos como la respuesta inflamatoria y el control de la secreción de factores tróficos propios de las células madre.
4. Los siguientes años traerán gran expectativa por la aparición de los resultados y datos de múltiples ensayos clínicos basados en las células madre para el tratamiento de diversas enfermedades oculares.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Aldiri, I., Xu, B., Wang, L., Chen, X., Hiler, D., Griffiths, L., ... St. Jude Children's Research Hospital—Washington University Pediatric Cancer Genome Project. (2017). The Dynamic Epigenetic Landscape of the Retina During Development, Reprogramming, and Tumorigenesis. *Neuron*, *94*(3), 550–568. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.04.022>
- Algere, P. V., Berglin, L., Gouras, P., & Sheng, Y. (1994). Transplantation of fetal retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration with subfoveal neovascularization. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie*, *232*(12), 707–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7534250>
- Algere, P. V., Berglin, L., Gouras, P., Sheng, Y., & Kopp, E. D. (1997). Transplantation of RPE in age-related macular degeneration: observations in disciform lesions and dry RPE atrophy. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie*, *235*(3), 149–58. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9085110>
- Alison, M., & Islam, S. (2009). Attributes of adult stem cells. *The Journal of Pathology*, *217*(2), 144–160. <http://doi.org/10.1002/path.2498>
- Barber, A. C., Hippert, C., Duran, Y., West, E. L., Bainbridge, J. W. B., Warre-Cornish, K., ... Pearson, R. A. (2013). Repair of the degenerate retina by photoreceptor transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(1), 354–359. <http://doi.org/10.1073/pnas.1212677110>
- Binder, S., Krebs, I., Hilgers, R.-D., Abri, A., Stolba, U., Assadoulina, A., ... Feichtinger, H. (2004). Outcome of Transplantation of Autologous Retinal Pigment Epithelium in Age-Related Macular Degeneration: A Prospective Trial. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *45*(11), 4151. <http://doi.org/10.1167/iovs.04-0118>
- Birch, D. G., Bennett, L. D., Duncan, J. L., Weleber, R. G., & Pennesi, M. E. (2016). Long-term Follow-up of Patients With Retinitis Pigmentosa Receiving Intraocular Ciliary Neurotrophic Factor Implants. *American Journal of Ophthalmology*, *170*, 10–14. <http://doi.org/10.1016/j.ajoph.2016.07.013>
- Booij, J. C., Baas, D. C., Beisekeeva, J., Gorgels, T. G. M. F., & Bergen, A. A. B. (2010). The dynamic nature of Bruch's membrane. *Progress in Retinal and Eye Research*, *29*(1), 1–18. <http://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2009.08.003>
- Burnight, E. R., Gupta, M., Wiley, L. A., Anfinson, K. R., Tran, A., Triboulet, R., ... Tucker, B. A. (2017). Using CRISPR-Cas9 to Generate Gene-Corrected Autologous iPSCs for the Treatment of Inherited Retinal Degeneration. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, *25*(9), 1999–2013. <http://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.05.015>
- Cao, N., Huang, Y., Zheng, J., Spencer, C. I., Zhang, Y., Fu, J.-D., ... Ding, S. (2016). Conversion of human fibroblasts into functional cardiomyocytes by small molecules. *Science (New York, N.Y.)*, *352*(6290), 1216–20. <http://doi.org/10.1126/science.aaf1502>
- Carr, A.-J., Vugler, A., Lawrence, J., Chen, L. L., Ahmado, A., Chen, F. K., ... Coffey, P. J. (2009). Molecular characterization and functional analysis of phagocytosis by human embryonic stem cell-derived RPE cells using a novel human retinal assay. *Molecular Vision*, *15*, 283–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19204785>
- Cen, L.-P., & Ng, T. K. (2018). Stem cell therapy for retinal ganglion cell degeneration. *Neural Regeneration Research*, *13*(8), 1352–1353. <http://doi.org/10.4103/1673-5374.235237>
- Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2011). Biology of stem cells: an overview. *Kidney International Supplements*, *1*(3), 63–67. <http://doi.org/10.1038/kisup.2011.15>
- Coles, B. L. K., Angénioux, B., Inoue, T., Del Rio-Tsonis, K., Spence, J. R., McInnes, R. R., ... van der Kooy, D. (2004). Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(44), 15772–7. <http://doi.org/10.1073/pnas.0401596101>

- Collard, C. D., Väkevä, A., Morrissey, M. A., Agah, A., Rollins, S. A., Reenstra, W. R., ... Stahl, G. L. (2000). Complement Activation after Oxidative Stress: Role of the Lectin Complement Pathway. *The American Journal of Pathology*, *156*(5), 1549–1556. [http://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65026-2](http://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65026-2)
- Conlon, R., Saheb, H., & Ahmed, I. I. K. (2017). Glaucoma treatment trends: a review. *Canadian Journal of Ophthalmology*, *52*(1), 114–124. <http://doi.org/10.1016/j.jcjo.2016.07.013>
- Cortes, J. L., Sanchez, L., Ligeró, G., Gutierrez-Aranda, I., Catalina, P., Elosua, C., ... Menendez, P. (2009). Mesenchymal stem cells facilitate the derivation of human embryonic stem cells from cryopreserved poor-quality embryos. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *24*(8), 1844–51. <http://doi.org/10.1093/humrep/dep107>
- Cotrim, C. C., Toscano, L., Messias, A., Jorge, R., & Siqueira, R. C. (2017). Intravitreal use of bone marrow mononuclear fraction containing CD34+ stem cells in patients with atrophic age-related macular degeneration. *Clinical Ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, *11*, 931–938. <http://doi.org/10.2147/OPHTH.S133502>
- da Cruz, L., Fynes, K., Georgiadis, O., Kerby, J., Luo, Y. H., Ahmado, A., ... Coffey, P. J. (2018). Phase 1 clinical study of an embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium patch in age-related macular degeneration. *Nature Biotechnology*, *36*(4), 328–337. <http://doi.org/10.1038/nbt.4114>
- Daley, G. Q., Lensch, M. W., Jaenisch, R., Meissner, A., Plath, K., & Yamanaka, S. (2009). Broader implications of defining standards for the pluripotency of iPSCs. *Cell Stem Cell*, *4*(3), 200–1; author reply 202. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2009.02.009>
- Dascalescu, D., Corbu, C., Coviltir, V., Schmitzer, S., Constantin, M., Burcel, M., ... Potop, V. (n.d.). The ganglion cell complex as an useful tool in glaucoma assessment. *Romanian Journal of Ophthalmology*, *62*(4), 300–303. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30891527>
- Ding, D.-C., Shyu, W.-C., & Lin, S.-Z. (2011). Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplantation*, *20*(1), 5–14. <http://doi.org/10.3727/096368910X>
- Eiraku, M., Takata, N., Ishibashi, H., Kawada, M., Sakakura, E., Okuda, S., ... Sasai, Y. (2011). Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature*, *472*(7341), 51–56. <http://doi.org/10.1038/nature09941>
- Emre, E., Yüksel, N., Duruksu, G., Pirhan, D., Subaşı, C., Erman, G., & Karaöz, E. (2015). Neuroprotective effects of intravitreally transplanted adipose tissue and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an experimental ocular hypertension model. *Cytotherapy*, *17*(5), 543–59. <http://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.12.005>
- Gasparini, S. J., Llonch, S., Borsch, O., & Ader, M. (2018). Transplantation of photoreceptors into the degenerative retina: Current state and future perspectives. *Progress in Retinal and Eye Research*. <http://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2018.11.001>
- Gonzalez-Cordero, A., West, E. L., Pearson, R. A., Duran, Y., Carvalho, L. S., Chu, C. J., ... Ali, R. R. (2013). Photoreceptor precursors derived from three-dimensional embryonic stem cell cultures integrate and mature within adult degenerate retina. *Nature Biotechnology*, *31*(8), 741–7. <http://doi.org/10.1038/nbt.2643>
- Grant, M. B., May, W. S., Caballero, S., Brown, G. A. J., Guthrie, S. M., Mames, R. N., ... Scott, E. W. (2002). Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nature Medicine*, *8*(6), 607–612. <http://doi.org/10.1038/nm0602-607>
- Hanna, J. H., Saha, K., & Jaenisch, R. (2010). Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell*, *143*(4), 508–25. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.008>
- Hirami, Y., Osakada, F., Takahashi, K., Okita, K., Yamanaka, S., Ikeda, H., ... Takahashi, M. (2009). Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells. *Neuroscience Letters*, *458*(3), 126–131. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.04.035>
- Holan, V., Hermankova, B., & Kossel, J. (2017). Perspectives of Stem Cell-Based Therapy for Age-Related Retinal Degenerative Diseases. *Cell Transplantation*, *26*(9), 1538–1541. <http://doi.org/10.1177/0963689717721227>

- Hu, Y., Tan, H. B., Wang, X. M., Rong, H., Cui, H. P., & Cui, H. (2013). Bone marrow mesenchymal stem cells protect against retinal ganglion cell loss in aged rats with glaucoma. *Clinical Interventions in Aging*, 8, 1467–70. <http://doi.org/10.2147/CIA.S47350>
- Huynh, E., Chandrasekera, E., Bukowska, D., McLenachan, S., Mackey, D. A., & Chen, F. K. (2017). Past, Present, and Future Concepts of the Choroidal Scleral Interface Morphology on Optical Coherence Tomography. *Asia-Pacific Journal of Ophthalmology*, 6(1), 94–103. <http://doi.org/10.22608/APO.201698>
- Idelson, M., Alper, R., Obolensky, A., Ben-Shushan, E., Hemo, I., Yachimovich-Cohen, N., ... Reubinoff, B. (2009). Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Functional Retinal Pigment Epithelium Cells. *Cell Stem Cell*, 5(4), 396–408. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2009.07.002>
- Jin, Z.-B., Gao, M.-L., Deng, W.-L., Wu, K.-C., Sugita, S., Mandai, M., & Takahashi, M. (2018). Stemming retinal regeneration with pluripotent stem cells. *Progress in Retinal and Eye Research*. <http://doi.org/10.1016/J.PRETEYERES.2018.11.003>
- Jin, Z.-B., Huang, X.-F., Lv, J.-N., Xiang, L., Li, D.-Q., Chen, J., ... Qu, J. (2014). SLC7A14 linked to autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nature Communications*, 5(1), 3517. <http://doi.org/10.1038/ncomms4517>
- Jin, Z.-B., & Takahashi, M. (2012). Generation of retinal cells from pluripotent stem cells. *Progress in Brain Research*, 201, 171–81. <http://doi.org/10.1016/B978-0-444-59544-7.00008-1>
- Jones, M. K., Lu, B., Girman, S., & Wang, S. (2017). Cell-based therapeutic strategies for replacement and preservation in retinal degenerative diseases. *Progress in Retinal and Eye Research*, 58, 1–27. <http://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2017.01.004>
- Jorstad, N. L., Wilken, M. S., Grimes, W. N., Wohl, S. G., VandenBosch, L. S., Yoshimatsu, T., ... Reh, T. A. (2017). Stimulation of functional neuronal regeneration from Müller glia in adult mice. *Nature*, 548(7665), 103–107. <http://doi.org/10.1038/nature23283>
- Kaewkhaw, R., Kaya, K. D., Brooks, M., Homma, K., Zou, J., Chaitankar, V., ... Swaroop, A. (2015). Transcriptome Dynamics of Developing Photoreceptors in Three-Dimensional Retina Cultures Recapitulates Temporal Sequence of Human Cone and Rod Differentiation Revealing Cell Surface Markers and Gene Networks. *STEM CELLS*, 33(12), 3504–3518. <http://doi.org/10.1002/stem.2122>
- Kamao, H., Mandai, M., Okamoto, S., Sakai, N., Suga, A., Sugita, S., ... Takahashi, M. (2014). Characterization of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium Cell Sheets Aiming for Clinical Application. *Stem Cell Reports*, 2(2), 205–218. <http://doi.org/10.1016/J.STEMCR.2013.12.007>
- Kels, B. D., Grzybowski, A., & Grant-Kels, J. M. (2015). Human ocular anatomy. *Clinics in Dermatology*, 33(2), 140–146. <http://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2014.10.006>
- Kim, J., Efe, J. A., Zhu, S., Talantova, M., Yuan, X., Wang, S., ... Ding, S. (2011). Direct reprogramming of mouse fibroblasts to neural progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(19), 7838–43. <http://doi.org/10.1073/pnas.1103113108>
- Kirkwood, B. J. (2012). Anatomy of the retina. *Insight (American Society of Ophthalmic Registered Nurses)*, 37(4), 5–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23256428>
- Kundu, J., Michaelson, A., Baranov, P., Young, M. J., & Carrier, R. L. (2014). Approaches to Cell Delivery: Substrates and Scaffolds for Cell Therapy. In *Developments in ophthalmology* (Vol. 53, pp. 143–154). <http://doi.org/10.1159/000357369>
- Labrador-Velandia, S., Alonso-Alonso, M. L., Alvarez-Sanchez, S., González-Zamora, J., Carretero-Barrio, I., Pastor, J. C., ... Srivastava, G. K. (2016). Mesenchymal stem cell therapy in retinal and optic nerve diseases: An update of clinical trials. *World Journal of Stem Cells*, 8(11), 376. <http://doi.org/10.4252/wjsc.v8.i11.376>
- Labrador Velandia, S., Di Lauro, S., Alonso-Alonso, M. L., Tabera Bartolomé, S., Srivastava, G. K., Pastor, J. C., & Fernandez-Bueno, I. (2018). Biocompatibility of intravitreal injection of human mesenchymal stem cells in immunocompetent rabbits. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 256(1), 125–134. <http://doi.org/10.1007/s00417-017-3842-3>

- Lakowski, J., Gonzalez-Cordero, A., West, E. L., Han, Y.-T., Welby, E., Naeem, A., ... Sowden, J. C. (2015). Transplantation of Photoreceptor Precursors Isolated via a Cell Surface Biomarker Panel From Embryonic Stem Cell-Derived Self-Forming Retina. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *33*(8), 2469–82. <http://doi.org/10.1002/stem.2051>
- Langer, K. B., Ohlemacher, S. K., Phillips, M. J., Fligor, C. M., Jiang, P., Gamm, D. M., & Meyer, J. S. (2018). Retinal Ganglion Cell Diversity and Subtype Specification from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, *10*(4), 1282–1293. <http://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.02.010>
- Li, K., Zhong, X., Yang, S., Luo, Z., Li, K., Liu, Y., ... Ge, J. (2017). HiPSC-derived retinal ganglion cells grow dendritic arbors and functional axons on a tissue-engineered scaffold. *Acta Biomaterialia*, *54*, 117–127. <http://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.02.032>
- Liew, C., Moore, H., Ruban, L., Shah, N., Cosgrove, K., Dunne, M., & Andrews, P. (2005). Human embryonic stem cells: Possibilities for human cell transplantation. *Annals of Medicine*, *37*(7), 521–532. <http://doi.org/10.1080/07853890500379463>
- Lister, R., Pelizzola, M., Kida, Y. S., Hawkins, R. D., Nery, J. R., Hon, G., ... Ecker, J. R. (2011). Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature*, *471*(7336), 68–73. <http://doi.org/10.1038/nature09798>
- Liu, Y., Chen, S. J., Li, S. Y., Qu, L. H., Meng, X. H., Wang, Y., ... Yin, Z. Q. (2017). Long-term safety of human retinal progenitor cell transplantation in retinitis pigmentosa patients. *Stem Cell Research & Therapy*, *8*(1), 209. <http://doi.org/10.1186/s13287-017-0661-8>
- Liu, Y., Yang, X., Utheim, T. P., Guo, C., Xiao, M., Liu, Y., ... Ma, J. (2013). Correlation of cytokine levels and microglial cell infiltration during retinal degeneration in RCS rats. *PloS One*, *8*(12), e82061. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0082061>
- Luo, Y. H.-L., & da Cruz, L. (2016). The Argus® II Retinal Prosthesis System. *Progress in Retinal and Eye Research*, *50*, 89–107. <http://doi.org/10.1016/J.PRETEYERES.2015.09.003>
- MacLaren, R. E., Bennett, J., & Schwartz, S. D. (2016). MacLaren, R. E., Bennett, J., & Schwartz, S. D. (2016). Gene Therapy and Stem Cell Transplantation in Retinal Disease: The New Frontier. *Ophthalmology*, *123*(10), S98–S106. <http://doi.org/10.1016/j.ophtha.2016.06.041> Gene Therapy and Stem Cell Transplantatio. *Ophthalmology*, *123*(10), S98–S106. <http://doi.org/10.1016/j.ophtha.2016.06.041>
- Maeda, A., Mandai, M., & Takahashi, M. (2019). Gene and Induced Pluripotent Stem Cell Therapy for Retinal Diseases. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *20*(1), annurev-genom-083118-015043. <http://doi.org/10.1146/annurev-genom-083118-015043>
- Mandai, M., Fujii, M., Hashiguchi, T., Sunagawa, G. A., Ito, S., Sun, J., ... Takahashi, M. (2017). iPSC-Derived Retina Transplants Improve Vision in rd1 End-Stage Retinal-Degeneration Mice. *Stem Cell Reports*, *8*(1), 69–83. <http://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.12.008>
- Mandai, M., Watanabe, A., Kurimoto, Y., Hirami, Y., Morinaga, C., Daimon, T., ... Takahashi, M. (2017). Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *New England Journal of Medicine*, *376*(11), 1038–1046. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1608368>
- Mata-Miranda, M., Vázquez-Zapién, G. J., & Sánchez-Monroy, V. (2013). Generalities and applications of the stem cells. *Perinatología y Reproducción Humana*, *27*(3), 194–199. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-53372013000300009
- Mead, B., Logan, A., Berry, M., Leadbeater, W., & Scheven, B. A. (2017). Concise Review: Dental Pulp Stem Cells: A Novel Cell Therapy for Retinal and Central Nervous System Repair. *STEM CELLS*, *35*(1), 61–67. <http://doi.org/10.1002/stem.2398>
- Mehat, M. S., Sundaram, V., Ripamonti, C., Robson, A. G., Smith, A. J., Borooah, S., ... Bainbridge, J. W. B. (2018). Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells in Macular Degeneration. *Ophthalmology*, *125*(11), 1765–1775. <http://doi.org/10.1016/j.ophtha.2018.04.037>
- Mikkelsen, T. S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P., ... Meissner, A. (2008). Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature*, *454*(7200), 49–55.

<http://doi.org/10.1038/nature07056>

- Mullins, R. F., Schoo, D. P., Sohn, E. H., Flamme-Wiese, M. J., Workamelahu, G., Johnston, R. M., ... Stone, E. M. (2014). The membrane attack complex in aging human choriocapillaris: relationship to macular degeneration and choroidal thinning. *The American Journal of Pathology*, *184*(11), 3142–53. <http://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.07.017>
- Nazari, H., Zhang, L., Zhu, D., Chader, G. J., Falabella, P., Stefanini, F., ... Humayun, M. S. (2015). Stem cell based therapies for age-related macular degeneration: The promises and the challenges. *Progress in Retinal and Eye Research*, *48*, 1–39. <http://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.06.004>
- Nickerson, P. E. B., Ortin-Martinez, A., & Wallace, V. A. (2018). Material Exchange in Photoreceptor Transplantation: Updating Our Understanding of Donor/Host Communication and the Future of Cell Engraftment Science. *Frontiers in Neural Circuits*, *12*, 17. <http://doi.org/10.3389/fncir.2018.00017>
- Nistor, G., Seiler, M. J., Yan, F., Ferguson, D., & Keirstead, H. S. (2010). Three-dimensional early retinal progenitor 3D tissue constructs derived from human embryonic stem cells. *Journal of Neuroscience Methods*, *190*(1), 63–70. <http://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.04.025>
- Osakada, F., Jin, Z.-B., Hirami, Y., Ikeda, H., Danjyo, T., Watanabe, K., ... Takahashi, M. (2009). In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction. *Journal of Cell Science*, *122*(17), 3169–3179. <http://doi.org/10.1242/jcs.050393>
- Osborne, A., Sanderson, J., & Martin, K. R. (2018). Neuroprotective Effects of Human Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Derived Growth Factor on Human Retinal Ganglion Cells. *STEM CELLS*, *36*(1), 65–78. <http://doi.org/10.1002/stem.2722>
- Pereira, F. de A. N., Tavares, R. L. C., Camargos, A. F., & da Silva Filho, A. L. (2012). Telomerase activity alterations in sequential passages of mouse embryonic stem cells. *Cell Biology International*, *36*(8), 755–7. <http://doi.org/10.1042/CBI20110591>
- Prósper, F., & Verfaillie, C. M. (2003). *Células madre adultas. Anales del Sistema Sanitario de Navarra* (Vol. 26). Gobierno de Navarra, Departamento de Salud. Retrieved from http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272003000500002
- Rabesandratana, O., Goureau, O., & Orioux, G. (2018). Pluripotent Stem Cell-Based Approaches to Explore and Treat Optic Neuropathies. *Frontiers in Neuroscience*, *12*, 651. <http://doi.org/10.3389/fnins.2018.00651>
- Radtke, N. D., Aramant, R. B., Petry, H. M., Green, P. T., Pidwell, D. J., & Seiler, M. J. (2008). Vision improvement in retinal degeneration patients by implantation of retina together with retinal pigment epithelium. *American Journal of Ophthalmology*, *146*(2), 172–182. <http://doi.org/10.1016/j.ajo.2008.04.009>
- Radtke, N. D., Seiler, M. J., Aramant, R. B., Petry, H. M., & Pidwell, D. J. (2002). Transplantation of intact sheets of fetal neural retina with its retinal pigment epithelium in retinitis pigmentosa patients. *American Journal of Ophthalmology*, *133*(4), 544–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11931789>
- Sanges, D., Romo, N., Simonte, G., Di Vicino, U., Tahoces, A. D., Fernández, E., & Cosma, M. P. (2013). Wnt/ β -Catenin Signaling Triggers Neuron Reprogramming and Regeneration in the Mouse Retina. *Cell Reports*, *4*(2), 271–286. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.015>
- Schwartz, S. D., Regillo, C. D., Lam, B. L., Elliott, D., Rosenfeld, P. J., Gregori, N. Z., ... Lanza, R. (2015). 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 (London, England)*, *385*(9967), 509–16. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61376-3](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61376-3)
- Seiler, M. J., & Aramant, R. B. (1998). Intact sheets of fetal retina transplanted to restore damaged rat retinas. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *39*(11), 2121–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9761291>
- Seiler, M. J., & Aramant, R. B. (2012). Cell replacement and visual restoration by retinal sheet transplants. *Progress in Retinal and Eye Research*, *31*(6), 661–687. <http://doi.org/10.1016/J.PRETEYERES.2012.06.003>

- Sengillo, J. D., Justus, S., Tsai, Y.-T., Cabral, T., & Tsang, S. H. (2016). Gene and cell-based therapies for inherited retinal disorders: An update. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, *172*(4), 349–366. <http://doi.org/10.1002/ajmg.c.31534>
- Simara, P., Motl, J. A., & Kaufman, D. S. (2013). Pluripotent stem cells and gene therapy. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *161*(4), 284–92. <http://doi.org/10.1016/j.trsl.2013.01.001>
- Singh, R., Cuzzani, O., Binette, F., Sternberg, H., West, M. D., & Nasonkin, I. O. (2018). Pluripotent Stem Cells for Retinal Tissue Engineering: Current Status and Future Prospects. *Stem Cell Reviews and Reports*, *14*(4), 463–483. <http://doi.org/10.1007/s12015-018-9802-4>
- Siqueira, R. C., Messias, A., Gurgel, V. P., Simões, B. P., Scott, I. U., & Jorge, R. (2015). Improvement of ischaemic macular oedema after intravitreal injection of autologous bone marrow-derived haematopoietic stem cells. *Acta Ophthalmologica*, *93*(2), e174–e176. <http://doi.org/10.1111/aos.12473>
- Song, W. K., Park, K.-M., Kim, H.-J., Lee, J. H., Choi, J., Chong, S. Y., ... Lanza, R. (2015). Treatment of Macular Degeneration Using Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium: Preliminary Results in Asian Patients. *Stem Cell Reports*, *4*(5), 860–872. <http://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.04.005>
- Strauss, O. (2005). The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. *Physiological Reviews*, *85*(3), 845–881. <http://doi.org/10.1152/physrev.00021.2004>
- Sugita, S., Horie, S., Yamada, Y., & Mochizuki, M. (2010). Inhibition of B-Cell Activation by Retinal Pigment Epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *51*(11), 5783. <http://doi.org/10.1167/iovs.09-5098>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, *126*(4), 663–676. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Tassoni, A., Gutteridge, A., Barber, A. C., Osborne, A., & Martin, K. R. (2015). Molecular Mechanisms Mediating Retinal Reactive Gliosis Following Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *33*(10), 3006–16. <http://doi.org/10.1002/stem.2095>
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, N.Y.)*, *282*(5391), 1145–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9804556>
- Toh, W. S., Foldager, C. B., Pei, M., & Hui, J. H. P. (2014). Advances in Mesenchymal Stem Cell-based Strategies for Cartilage Repair and Regeneration. *Stem Cell Reviews and Reports*, *10*(5), 686–696. <http://doi.org/10.1007/s12015-014-9526-z>
- Tzameret, A., Sher, I., Belkin, M., Treves, A. J., Meir, A., Nagler, A., ... Rotenstreich, Y. (2014). Transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cells as a thin subretinal layer ameliorates retinal degeneration in a rat model of retinal dystrophy. *Experimental Eye Research*, *118*, 135–144. <http://doi.org/10.1016/J.EXER.2013.10.023>
- Verfaillie, C. M., Pera, M. F., & Lansdorp, P. M. (2002). Stem cells: hype and reality. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 369–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12446433>
- Waldron, P. V., Di Marco, F., Kruczek, K., Ribeiro, J., Graca, A. B., Hippert, C., ... Pearson, R. A. (2018). Transplanted Donor- or Stem Cell-Derived Cone Photoreceptors Can Both Integrate and Undergo Material Transfer in an Environment-Dependent Manner. *Stem Cell Reports*, *10*(2), 406–421. <http://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.12.008>
- Wang, S.-T., Chen, L., Zhang, P., Wang, X.-B., Sun, Y., Ma, L.-X., ... Zhou, G.-M. (2019). Transplantation of Retinal Progenitor Cells from Optic Cup-Like Structures Differentiated from Human Embryonic Stem Cells In Vitro and In Vivo Generation of Retinal Ganglion-Like Cells. *Stem Cells and Development*, *28*(4), 258–267. <http://doi.org/10.1089/scd.2018.0076>
- Wang, S., Lu, B., Wood, P., & Lund, R. D. (2005). Grafting of ARPE-19 and Schwann cells to the subretinal

- space in RCS rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46(7), 2552–60. <http://doi.org/10.1167/iovs.05-0279>
- Wenkel, H., & Streilein, J. W. (1998). Analysis of immune deviation elicited by antigens injected into the subretinal space. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 39(10), 1823–34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9727405>
- West, E. L., Gonzalez-Cordero, A., Hippert, C., Osakada, F., Martinez-Barbera, J. P., Pearson, R. A., ... Ali, R. R. (2012). Defining the Integration Capacity of Embryonic Stem Cell-Derived Photoreceptor Precursors. *STEM CELLS*, 30(7), 1424–1435. <http://doi.org/10.1002/stem.1123>
- West, E. L., Pearson, R. A., Barker, S. E., Luhmann, U. F. O., Maclaren, R. E., Barber, A. C., ... Ali, R. R. (2010). Long-term survival of photoreceptors transplanted into the adult murine neural retina requires immune modulation. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 28(11), 1997–2007. <http://doi.org/10.1002/stem.520>
- Whitmore, S. S., Sohn, E. H., Chirco, K. R., Drack, A. V., Stone, E. M., Tucker, B. A., & Mullins, R. F. (2015). Complement activation and choriocapillaris loss in early AMD: Implications for pathophysiology and therapy. *Progress in Retinal and Eye Research*, 45, 1–29. <http://doi.org/10.1016/J.PRETEYERES.2014.11.005>
- Xiang, P., Wu, K.-C., Zhu, Y., Xiang, L., Li, C., Chen, D.-L., ... Jin, Z.-B. (2014). A novel Bruch's membrane-mimetic electrospun substrate scaffold for human retinal pigment epithelium cells. *Biomaterials*, 35(37), 9777–9788. <http://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2014.08.040>
- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I. I., & Thomson, J. A. (2009). Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences. *Science*, 324(5928), 797–801. <http://doi.org/10.1126/science.1172482>
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., ... Thomson, J. A. (2007). Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science*, 318(5858), 1917–1920. <http://doi.org/10.1126/science.1151526>
- Yücel, N. G. (2007). Glaucoma as a neurodegenerative disease. *Current Opinion in Ophthalmology*, 18(2), 110–114. <http://doi.org/10.1097/icu.0b013e3280895aea>
- Zarbin, M. (2019). Cell-Based Therapy for Retinal Disease: The New Frontier (pp. 367–381). http://doi.org/10.1007/978-1-4939-8669-9_23
- Zhao, J. J., Ouyang, H., Luo, J., Patel, S., Xue, Y., Quach, J., ... Zhang, K. (2014). Induction of retinal progenitors and neurons from mammalian Müller glia under defined conditions. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(17), 11945–51. <http://doi.org/10.1074/jbc.M113.532671>