

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

ANÁLISIS DE LA ADMINISTRACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS RETINALES DERIVADAS DE LA GLÍA DE MÜLLER BAJO UN TRATAMIENTO CON GABA Y GLUTAMATO, EN UN MODELO DE DAÑO RETINAL

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestra en Biología Experimental

P R E S E N T A

Biol. Exp. Prisca Raquel Bustamante Álvarez

COMITÉ TUTORAL

Dra. Mónica Lamas Gregori

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Dra. Erika Chavira Suárez

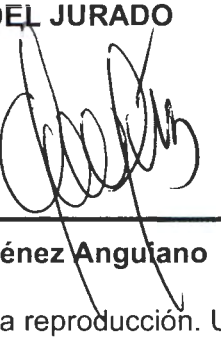
Enero 2014

El trabajo experimental fue realizado en el departamento de Farmacobiología del CINVESTAV Sede Sur bajo la dirección de la Dra. Mónica Lamas Gregori y la microscopía y su análisis se realizó en el Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa bajo la dirección del Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz.

"El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020".

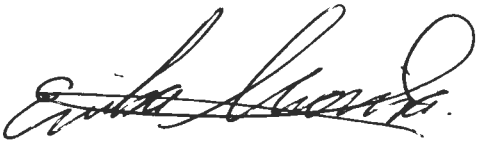
Número de registro de la beca otorgada por CONACYT 255655

MIEMBROS DEL JURADO



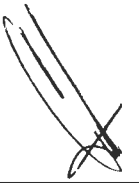
Dra. Anabel Jiménez Anguiano

Área Neurociencias. Depto Biología de la reproducción. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.



Dra. Erika Chavira Suárez

Área de Vinculación Científica Facultad de Medicina-INMEGEN



Dra. Gisela Gómez Lira

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN- Sur



Dra. Ruth Gutiérrez Aguilar

Hospital Infantil de México Federico Gómez

Investigador en Ciencias Médicas "E"

COMITÉ TUTORAL

CODIRECTORA EXTERNA

Dra. Mónica Lamas Gregori

Departamento de Farmacobiología.

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN- Sur

CODIRECTOR INTERNO

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Lab. Fisiología celular.

Departamento. Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

ASESORA

Dra. Erika Chavira Suárez

Área de Vinculación Científica Facultad de Medicina-INMEGEN

AGRADECIMIENTOS

Infinitas gracias a la **Dra. Mónica Lamas** por su invaluable dirección y aportación a mi desarrollo profesional. Sin duda, no puede tener una mejor tutora.

Al **Dr. Luis Gómez-Quiroz** por sus valiosas enseñanzas, su disposición, entusiasmo y críticas para este trabajo, en especial gracias por el apoyo en la microscopía confocal.

A la **Dra. Erika Chavira** por las observaciones y asesoría para el trabajo. Por los consejos y ánimos para mí.

A mi sínodo:
Dra. Gisela Gómez, por la revisión de la presente tesis y todas sus amabilidades.
Dra. Ruth Gutiérrez, por su entusiasmo, disposición y sus comentarios objetivos para mejorar el trabajo.
Dra. Anabel Jiménez, por la revisión del presente trabajo y por inspirarme con su ejemplo la pasión por el trabajo.

Agradezco al Dr. Rafael Gutiérrez por la donación de las ratas GFP^+

Al M. en B.E Roberto Lazarrini, por su amable asistencia técnica en la microscopia confocal.

A la Dra. Silene Ferraro, por su asesoría en la manipulación y cuidado de roedores. También, gracias por los ánimos.

A mis compañeros del laboratorio 13 y a nuestros vecinos del laboratorio 11.

A mi familia y a Rodrigo López, por apoyarme y sostener mi mano.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS IX

RESUMEN X

ABSTRACT XII

INTRODUCCIÓN 1

CAPÍTULO 1: LA RETINA 1

1.1 TIPOS CELULARES DE LA RETINA 1

1.2 ESTRUCTURA 4

1.3 DESARROLLO EMBRIONARIO DE LA RETINA 7

CAPÍTULO 2: CÉLULAS TRONCALES 10

2.1 APLICACIÓN DE LAS CÉLULAS TRONCALES EN MEDICINA REGENERATIVA OCULAR 13

2.2 PRINCIPALES LIMITACIONES 15

2.3 CÉLULAS TRONCALES RETINALES 16

CAPÍTULO 3: LA GLÍA DE MÜLLER COMO CÉLULA PROGENITORA RETINAL Y SU REGULACIÓN 19

3.1 LA GLÍA DE MÜLLER EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS 19

3.2 LA GLÍA DE MÜLLER COMO UNA CÉLULA PROGENITORA RETINAL 22

3.3 MODULADORES EN LA PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LA GLÍA DE MÜLLER 25

3.3.1 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN 25

3.3.2 NEUROTRANSMISORES 27

3.3.2.1 PARTICIPACIÓN DE GABA Y GLUTAMATO EN LA NEUROGÉNESIS ADULTA 29

ANTECEDENTES 30

JUSTIFICACIÓN 33

HIPÓTESIS 33

OBJETIVOS 34

OBJETIVO GENERAL 34

OBJETIVOS PARTICULARES 34

MATERIAL Y MÉTODOS 35

CULTIVOS PRIMARIOS DE GLÍA DE MÜLLER POSITIVOS A LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE (GFP^+) 35

OBTENCIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS EN CULTIVO (NEUROESFERAS) DERIVADAS DE LA GLÍA DE MÜLLER 36

DIFERENCIACIÓN *IN VITRO* DE NEUROESFERAS 36

MODELO DE DAÑO RETINAL *IN VIVO* 37

VIABILIDAD DE LAS NEUROESFERAS GFP^+ TRASPLANTADAS POR EXCLUSIÓN DE AZUL DE TRIPANO 38

INMUNOFLUORESCENCIA 38

ANÁLISIS DE MUERTE CELULAR 40

TRASPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS VÍA INTRAOCULAR 41

PROCESAMIENTO DEL TEJIDO DESPUÉS DEL TRASPLANTE 42

ADQUISICIÓN DE IMÁGENES BAJO MICROSCOPÍA 43

ANÁLISIS ESTADÍSTICO 43

RESULTADOS 44

1. CULTIVOS PRIMARIOS DE GLÍA DE MÜLLER POSITIVOS A LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE (GFP^+) 44

2. GENERACIÓN *IN VITRO* DE CÉLULAS PROGENITORAS O NEUROESFERAS 46

3. MODELO DE DAÑO RETINAL CAUSADO POR NMDA 48

3.1 CAMBIOS EN LAS CAPAS NUCLEARES INDUCIDOS POR LA INYECCIÓN DE NMDA 48

3.2 MUERTE CELULAR 49

3.3 NMDA DISMINUYE EL NÚMERO DE CÉLULAS INMUNOPOSITIVAS A CALBINDINA (CÉLULAS HORIZONTALES) Y RODOPSINA (FOTORRECEPTORES) 50

3.4 GLIOSIS 51

3.5 EXPRESIÓN DE NESTINA 53

4. TRASPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS GFP^+ EN LA RETINA CON DAÑO NEUROTÓXICO 54

4.1 ANÁLISIS TEMPORAL DE LA INCORPORACIÓN DE CÉLULAS TRASPLANTADAS 54

4.2 TRASPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS GFP^+ EN LA RETINA NO DAÑADA 56

4.3 TRASPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS PRE TRATADAS CON NEUROTRANSMISORES: GABA Y GLUTAMATO 57

4.4 CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS GFP$^+$ VISUALIZADAS EN LA RETINA 58

4.5 LAS CÉLULAS PROGENITORAS TRATADAS CON GABA PROLIFERAN EN LA RETINA, A LOS 6 Y 12 DÍAS: EXPRESIÓN DE KI67 60

4.6 LAS CÉLULAS PROGENITORAS TRATADAS CON GABA EXPRESAN UN MARCADOR NEURONAL TEMPRANO (DE B-III TUBULINA) 12 DÍAS DESPUÉS DEL TRASPLANTE 61

RESUMEN DE RESULTADOS **62**

DISCUSIÓN **63**

1. EL TRASPLANTE CELULAR COMO ESTRATEGIA TERAPÉUTICA EN LA RETINA: USO DE LAS CÉLULAS PROGENITORAS DERIVADAS DE LA GLÍA DE MÜLLER **63**

2. MODELO EXPERIMENTAL DE DAÑO RETINAL **65**

2.1 CARACTERÍSTICAS DEL TRASPLANTE MEDIANTE INYECCIÓN INTRAVÍTREA 65

2.2 REACTIVIDAD GLIAL: UN POSIBLE OBSTÁCULO PARA LA INTEGRACIÓN DE LAS CÉLULAS INYECTADAS EN LA RETINA DAÑADA 67

2.3 OTRAS CONSECUENCIAS DEL PROCESO DE DAÑO CELULAR: INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE NESTINA 69

2.4 ANÁLISIS DE LA SOBREVIVENCIA DE LAS CÉLULAS PROGENITORAS DERIVADAS DE LA GLÍA DE MÜLLER EN EL MODELO DE TRASPLANTE RETINAL 70

CONCLUSIÓN **75**

PERSPECTIVAS **76**

BIBLIOGRAFÍA **77**

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN= ácido desoxirribonucleíco

ATP= adenosín trifosfato

BrdU=5-bromo-2-deoxyuridina

CD68= cúmulo de diferenciación 68

CG= Capa de células ganglionares

CNE= Capa nuclear externa

CNI= Capa nuclear interna

CNTF= Factor neurotróficociliar

CPE= Capa plexiforme externa

CPI= Capa plexiforme interna

CRALBP= Proteína de unión al retinaldehído celular

DAPI= 4,6-diamidino-2-phenylindole

DMEM= medio Eagle Modificado de Dulbecco

FGF= Factor de crecimiento epidermal

FGF= Factor de crecimiento fibroblástico

GABA= Ácido gama-aminobutírico

GFAP= Proteína acídica fibrilar glial

GFP= Proteína verde fluorescente

GS= Glutamina sintetasa

K=potasio

Mg= magnesio

Na= sodio

NMDA= *N-m*etil *D-a*spartato

RPC= Células progenitoras retinales

SE= Segmento externo

SI= Segmento interno

VEGF= Factor de crecimiento vascular endotelial

ZMC= Zona marginal ciliar

RESUMEN

Las células gliales de Müller adquieren un potencial neurogénico en pez y pollo como resultado de un daño neurotóxico *in vivo* o en consecuencia a una dosis alta de N-metil-D- aspartato (NMDA) en cultivo. Sin embargo, la glía de Müller en mamíferos no es capaz de regenerar la pérdida de las células retinales a pesar de que se ha demostrado que posee la capacidad de desdiferenciarse, proliferar y diferenciarse hacia diferentes linajes neuronales de la retina. Hallazgos recientes han demostrado que el neurotransmisor GABA media la inducción de la expresión de marcadores neuronales tempranos en células progenitoras de retina postnatal de rata derivadas a partir de la glía de Müller y que el glutamato incrementa su proliferación. En este estudio, corroboramos que neuroesferas retinales, aisladas de cultivos de glía de Müller de ratas transgénicas que expresan constitutivamente la proteína verde fluorescente (GFP^+), poseen características propias de células progenitoras multipotentes que pudieran ser utilizadas en trasplantes con el fin de reemplazar a la retina dañada con nuevas neuronas.

Para poder analizar la posible capacidad regenerativa y el efecto de los tratamientos con glutamato y GABA sobre la sobrevivencia de estas células en el trasplante, establecimos un modelo de daño retinal a través de la inyección intravítrea con NMDA (250 mM). Demostramos por inmunofluorescencia que se desencadenan cambios en las capas retinales, pérdida de células horizontales y fotorreceptores, gliosis (aumento de GFAP) y expresión de Nestina (marcador de células troncales neuronales). Mediante inyección intravítreal realizamos el trasplante de las neuroesferas disociadas GFP^+ tratadas con glutamato o GABA.

Los análisis de microscopía revelaron la presencia de células GFP^+ en la retina 2 y 6 días posteriores al trasplante. A su vez, el pre-tratamiento con GABA induce un incremento moderado pero significativo en el número de células detectables en comparación con las células cultivadas con glutamato y medio control. También observamos que estas células expresaron Ki 67 (marcador de proliferación) y Beta-III Tubulina (marcador neuronal temprano), sugiriendo que la activación de los receptores Gabaérgicos podría representar una señal de especificación neuronal similar a la vía de señalización en progenitores de hipocampo.

ABSTRACT

Müller Glia cells acquire neurogenic potential in fish and avian as a result of neurotoxic injury *in vivo* or a high dose of N-methyl-D-aspartate (NMDA) in culture. However, in mammals Müller cells are not able to regenerate retinal cells lost to pathology in spite of their proven capacity to dedifferentate, proliferate and differentiate to retinal neurons. Recent approaches demonstrated that GABA induces the expression of early neuronal markers in postnatal retinal progenitor cell derived from Müller glia and that glutamate increases the number of proliferating cells.

In the present study we corroborated that retinal neurospheres, isolated from Müller glia primary cultures from transgenic rat expressing green fluorescent protein (GFP^+), have multipotent stem cell characteristics which enable their use for stem cell transplantation in order to replenish the degenerating retina with new neurons.

In order to analyze their regenerative capacity and the effect of GABA and glutamate treatment on the survival or transplanted GFP+ Müller cell-derived progenitors we established an injury rat retinal model through intravitreal injection of 250 mM NMDA. We demonstrated by inmunofluorescence that NMDA triggered changes on retinal layers, horizontal and photoreceptor cell loss, apoptosis, gliosis (increase of GFAP) and expression of nestin (neuronal stem cell marker). We performed intravitreal transplant of GFP+ Müller cell derived progenitors treated with GABA and glutamate. Microscopy analysis revealed the presence of cells GFP^+ in the retina 2 and 6 days after transplant. Pre-treatment of these cells with

GABA induced a statistically significant increase in the number of detected cells compared with cell with glutamate and control medium. These cells expressed Ki67 (marker for proliferation) and Beta-III Tubulina (early neuronal marker) suggesting that the induction of GABA receptor signaling could represent a strategy to enhance neuronal specification through the same pathway characterized in hippocampal progenitors and developing neurons.

INTRODUCCIÓN

Capítulo 1: LA RETINA

La retina es un tejido neurosensor que tapiza la parte posterior del ojo (**Fig. 1**). Por su origen embrionario forma parte del sistema nervioso central. Este tejido es la primera estación del sistema visual y actúa como un receptor de luz capaz de realizar el procesamiento de las imágenes a través de la participación de las diferentes células que lo conforman. El circuito celular retiniano se encarga de recoger y elaborar las sensaciones visuales para transmitirlas al mesencéfalo y tálamo a través de los nervios ópticos. Finalmente, la señal llega a la corteza visual donde es procesada la percepción visual (Sung and Chuang, 2010)

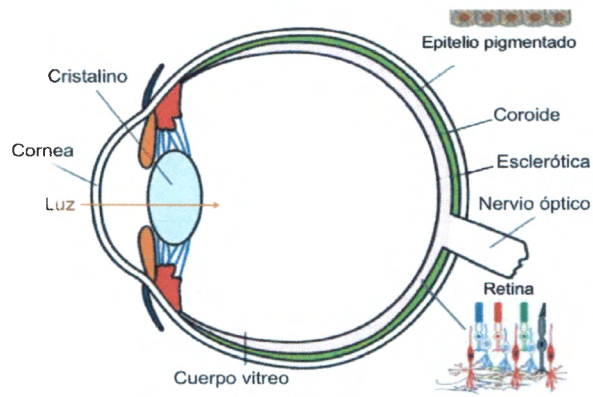


Fig. 1 Diagrama del ojo. La retina, se ubica en la parte posterior del ojo, reviste la cara interna de la coroide y limita su superficie interna con el cuerpo vítreo. Modificado de (Osakada et al., 2009)

1.1 Tipos celulares de la retina

Las células que conforman al circuito celular retiniano son (**Fig. 2 a y b**):

1. Fotorreceptores:

Los fotorreceptores son células sensoras del sistema visual capaces de capturar los fotones del medio externo y transformar la señal luminosa en una señal eléctrica, fenómeno conocido como fototransducción. Las células sensoriales de

la retina son de dos clases: conos y bastones. Los pigmentos contenidos en la porción apical de los fotorreceptores, rodopsina de los bastones y opsinas de los conos generan una cascada de reacciones enzimáticas como respuesta a la luz que conlleva al cierre de canales catiónicos de la membrana del fotorreceptor y finalmente su hiperpolarización (Reynolds and Olitsky, 2011).

a. Bastones: La retina humana contiene aproximadamente 120 millones diseñados para funcionar en condiciones de baja luminosidad, son capaces de responder a un sólo fotón y como consecuencia son altamente fotosensibles.

b. Conos: Existen alrededor de 6 millones de conos en humanos, especializados en mediar la agudeza visual por lo que están involucrados en la visión del color y especializados en la visión diurna (Reynolds and Olitsky, 2011).

Interneuronas:

2. Células bipolares:

La función de células bipolares es recibir la información de los fotorreceptores ubicados en la parte posterior de la retina (capa plexiforme externa) y hacen sinapsis con las células amacrinas y ganglionares en la capa plexiforme interna (Kaufman and Alm, 2004).

3. Células horizontales:

Las células horizontales conectan regiones en la capa plexiforme externa, extendiéndose en sentido tangencial, es decir, median la interacción lateral entre las terminales de los fotorreceptores y las dendritas de las células bipolares (Kaufman and Alm, 2004).

4. Células amacrinas:

Las células amacrinas se encargan de desarrollar interconexiones tangenciales entre las terminales de las células bipolares y las dendritas de las células ganglionares (Kaufman and Alm, 2004).

5. Células ganglionares:

Producen la información eferente, sus axones forman el nervio óptico, el cual se extiende hasta el cerebro (Wyse, 2006).

6. Células gliales: Glía de Müller:

Son el mayor tipo de células gliales en la retina. La célula o glía de Müller es responsable del soporte homeostático y metabólico, mediante el transporte de iones, agua y bicarbonato. Controla la composición del espacio extracelular, provee soporte trófico y antioxidante a los fotorreceptores y a las células que regulan a la barrera hematoretiniana. Participan también en la liberación de glutamato. Evidencia reciente señala que bajo condiciones patológicas, la glía de Müller es capaz de diferenciarse a célula progenitora, reemplazando la pérdida de células.

7. Astrocitos:

Se encuentran en las capas superficiales de la retina rodeando a las células ganglionares, fibras nerviosas y vasos sanguíneos (Wyse, 2006).

8. Microglía:

Son parte del sistema retículo-endotelial de la retina desempeñando funciones fagocíticas. Principalmente se localizan cerca de las fibras nerviosas pero son móviles a todas las partes de la retina (Wyse, 2006).

9. Oligodendrócitos:

Son las células de menor cantidad de la retina. Dan lugar a la vaina de mielina de las fibras nerviosas de la retina (Reynolds and Olitsky, 2011).

1.2 Estructura

Los elementos celulares de la retina están altamente organizados y adaptados para los requerimientos funcionales de la retina. Los diferentes tipos celulares están estratificados en capas. En un corte transversal de retina pueden observarse las siguientes capas (**Fig 2**).

1. Los segmentos internos (SI) y externos (SE) sensibles a la luz. Estas capas están constituidas por los segmentos externos e internos de los fotorreceptores (Kaufman and Alm, 2004).
2. La capa nuclear externa (CNE) esta región está formada por los cuerpos celulares de los fotorreceptores (conos y bastones). Los axones de los conos y las prolongaciones de las células de Müller forman, en este sitio, la capa de fibras de Henle.
3. La capa plexiforme externa (CPE) es una región de alrededor de 50 µm de espesor constituida por las sinapsis entre fotorreceptores, células bipolares y células horizontales.

4. La capa nuclear interna (CNI) esta capa contiene cuatro tipos de células. Las células horizontales que modulan la entrada de impulsos de los fotorreceptores hacia las células ganglionares utilizando el GABA como neurotransmisor; las células bipolares encargadas de conducir la señal desde los fotorreceptores hasta las células amacrinas o ganglionares; las células amacrinas que modulan las señales en la capa plexiforme interna y presentan gran diversidad neuroquímica y; los núcleos de las células de Müller.
5. La capa plexiforme interna (CPI) es donde se establecen las conexiones de las células bipolares, amacrinas y ganglionares (Reynolds and Olitsky, 2011).
6. La capa de células ganglionares (CG) en esta capa las células ganglionares envían sus axones desde el ojo hasta el encéfalo a través del nervio óptico. Además, se localizan los tipos de glía como los astrocitos (responsables del soporte de las células nerviosas), las células microgliales (con capacidad fagocítica) y los pies de la glía de Müller (Kaufman and Alm, 2004).

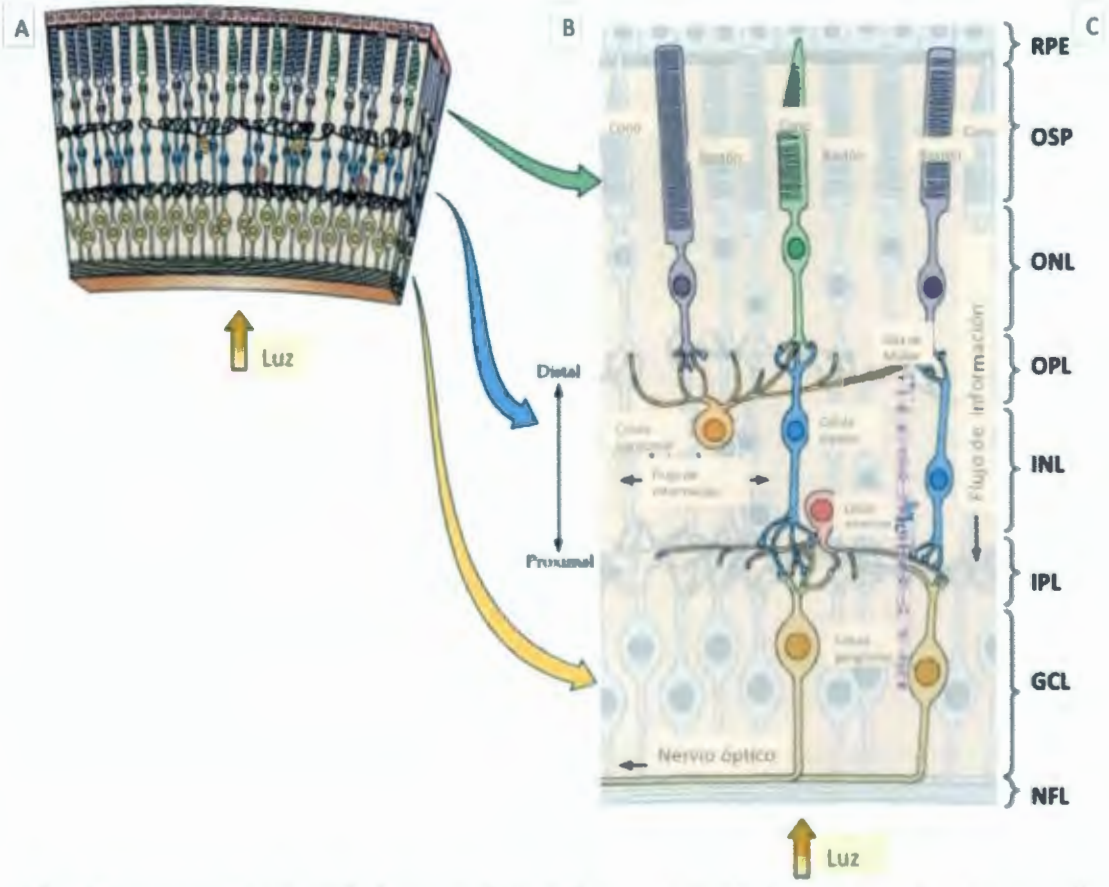


Fig. 2 Esquema de un corte trasversal de retina. La entrada de luz se produce en la región proximal de la retina. b) Diagrama esquemático de los tipos celulares: conos y bastones (fotorreceptores) encargados de sensar los estímulos e introducir la señal eléctrica a través de las células bipolares y horizontales. Las interacciones sinápticas continúan con las células amácrinas, las células bipolares y las células ganglionares, encargadas de transmitir la información a la corteza y formar el nervio óptico que se extiende hasta el cerebro. Se muestra la glía de Müller la única célula que hace contacto con todas las capas retinales. c) Organización histológica de la retina, se observan las capas específicas retinales: NFL Capa de fibras nerviosas, GCL Capa de células ganglionares, IPL capa plexiforme interna, INL capa nuclear interna, OPL capa plexiforme externa, ONL capa nuclear externa, OSP segmento externo y RPE epitelio pigmentado. Modificado de (Osakada et al., 2009)

1.3 Desarrollo embrionario de la retina

Durante la etapa de gastrulación en el desarrollo embrionario, se derivan tres capas germinales que darán pie a los diferentes tejidos: ectodermo, mesodermo y endodermo. La placa neural que deriva del ectodermo, es el precursor embrionario de todo el sistema nervioso, incluida la retina (Kaufman and Alm, 2004).

A medida que se forma la placa neural, diferentes regiones están predeterminadas para constituir partes individualizadas del sistema nervioso central, como los elementos neuronales del ojo. Después de formarse la placa, se enrolla sobre si misma en la línea media del embrión para formar el tubo neuronal, proceso llamado neurulación. Los pliegues neuronales transversales en poco tiempo se transforman en las vesículas ópticas, conectadas por el encéfalo por los tallos ópticos, mismos que después serán los nervios ópticos. Las vesículas se ensanchan y comienzan a invaginarse en su parte lateral. La pared interna de la porción invaginada da lugar a la retina junto con sus primeros elementos gliales, y la pared externa produce el epitelio pigmentado (Kaufman and Alm, 2004).

Los estudios acerca de la caracterización de la secuencia que sigue a la citogénesis en la retina son escasos. Antecedentes señalan que existe una secuencia altamente conservada en la escala filogenética. La retina de los vertebrados se deriva de invaginaciones pareadas del tubo neural durante el desarrollo embrionario (Rapaport et al., 2004).

Los mecanismos moleculares que deciden el destino de la célula retinal durante el desarrollo embrionario involucran dos características importantes: 1) todos los tipos celulares retinales neuronales y la glía de Müller son generados de un

mismo progenitor, a excepción de los astrocitos; 2) no todos los fenotipos son generados al mismo tiempo. Existe un orden temporal de la génesis de los diferentes fenotipos (Rapaport et al., 2004).

Los seis tipos neuronales (bastones, conos, bipolares, amacrinas, horizontales y ganglionares) y un tipo glial (Müller) son generados de una agrupación de células progenitoras retinales multipotentes (RPCs) en una secuencia temporal que se ha conservado en todas los vertebrados

Durante la embriogénesis en mamíferos, las células ganglionares son generadas primero, seguida por la producción de conos, células horizontales y la mayoría de las células amacrinas. Mientras que las células bipolares, la glía de Müller, las células amacrinas restantes y los bastones se forman en días postnatales (Rapaport et al., 2004). Esta noción se apoyó en estudios experimentales en rata acerca de los patrones espaciales y temporales del desarrollo retinal a través de la administración de ^{3}H- metil- timidina, marcador específico de la síntesis del ADN que fue administrada a las ratas preñadas y a crías desde el día embrionario 8 hasta el día postnatal 13. Las células marcadas fueron identificadas por autoradiografía de secciones retinales (**Fig 3)**.

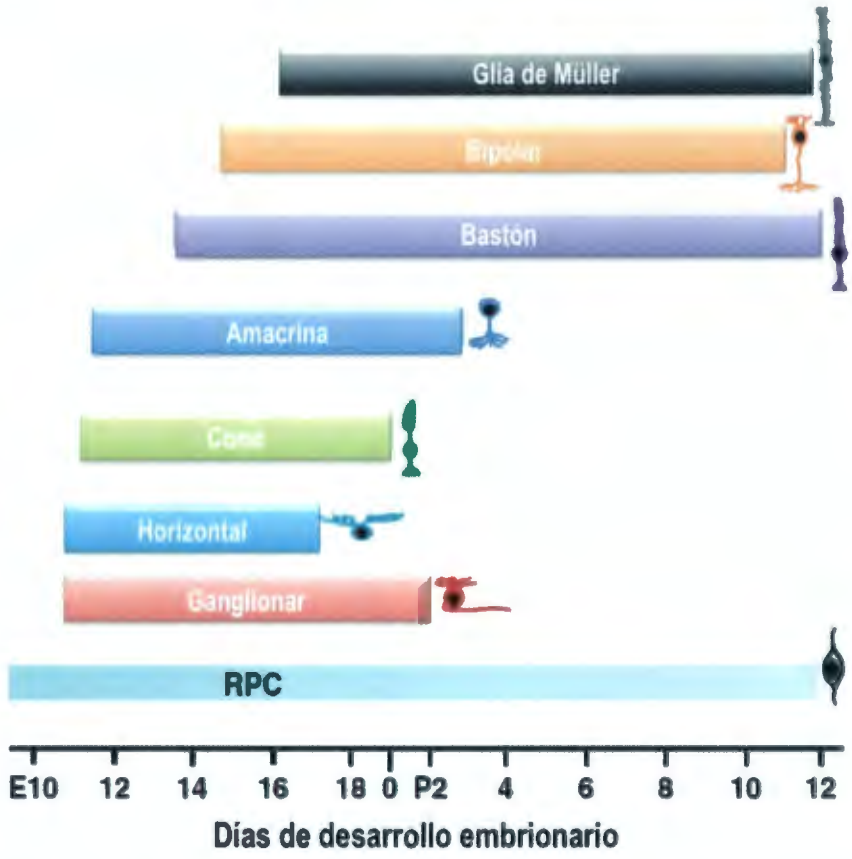


Fig. 3 Orden cronológico del desarrollo embrionario de la retina. Periodos embrionarios y posnatales. Los tipos celulares mostrados se derivan de un mismo progenitor retinal primero las células ganglionares y por último la glía de Müller. Modificado de (Bassett and Wallace, 2012) .

Capítulo 2: CÉLULAS TRONCALES

Las células troncales son células inmaduras, no diferenciadas, con una alta capacidad de autorreplicación, capaces de diferenciarse en uno o más tipos de células especializadas con funciones específicas en el organismo.

La célula troncal permanece en un estado quiescente hasta que recibe la señal para desarrollarse a una célula especializada. Estas células desempeñan un papel importante en la organogénesis durante el desarrollo embrionario y la generación de tejidos en etapas adultas por su característica teórica de dividirse sin límite para reemplazar a otra célula dañada. En los últimos años han generado un gran interés debido a su posible utilización en el tratamiento de enfermedades, hasta hoy incurables, mediante la terapia de trasplante (Kirschtein and Skirboll, 2001).

2.1 Clasificación de las células troncales

Las células troncales han sido aisladas de embriones, fetos, cordón umbilical y algunos tejidos adultos. Dichas células indiferenciadas mantienen diferente potencialidad. Las células derivadas de embriones, fetos y del cordón umbilical (bajo ciertas condiciones) son pluripotentes, mientras que las células troncales obtenidas a partir de tejidos adultos son multipotentes, tienen la habilidad de dar pie a un limitado número de células especializadas sólo del mismo linaje (Osakada et al., 2009).

Una posible clasificación de las células troncales radica en su plasticidad (capacidad de convertirse en diversos tejidos):

1) Las células totipotenciales (como el cigoto), se forman a partir de la fusión de un óvulo y un espermatozoide, seguido de los procesos de división y

diferenciación que dan lugar a cualquier tipo celular incluyendo al tejido extraembrionario y así producir un organismo completo (Carlson, 2000).

2) Las células pluripotenciales, pertenecen a la masa celular interna del blastocisto y dan origen a cualquier órgano o tejido proveniente de las tres capas germinales embrionarias: ectodermo, endodermo y mesodermo (Chambers and Smith, 2004).

3) Las células multipotentes, se originan en etapas más tardías del desarrollo embrionario, después de la gastrulación. Estas últimas tienen la capacidad de convertirse en un linaje específico del órgano donde residen. Entre las multipotentes se encuentran las células neuronales, mesenquimales, hematopoyéticas y del cordón umbilical (precursoras de las células sanguíneas).

Las células multipotentes dan lugar a células progenitoras, las cuales se diferencian posteriormente en tipos celulares específicos, maduros y con funciones especializadas dentro de un tejido. Las células troncales multipotentes presentes en el adulto se conocen como células troncales adultas (**Fig 4**).

La lista de tejidos adultos reportados con células troncales incluyen: médula ósea, médula espinal, sangre, pulpa dental, músculo esquelético, epitelio de piel y del sistema digestivo, cerebro, hígado, cornea y retina (Kirschtein and Skirboll, 2001). Estas células son capaces de renovarse y de diferenciarse en los tipos celulares del tejido del cual se originan (Kirschtein and Skirboll, 2001).

Las células troncales adultas se encuentran en un ambiente especial llamado ¨nicho¨ el cual es variable en su localización dependiendo del tipo de tejido del cual provengan. La función del microambiente es necesaria para inducir la muerte, sobrevivencia, quiescencia, autorrenovación, migración de la célula o reemplazar la pérdida celular debida a los procesos de muerte celular natural o por patologías. En mamíferos adultos la presencia de células troncales es escasa.

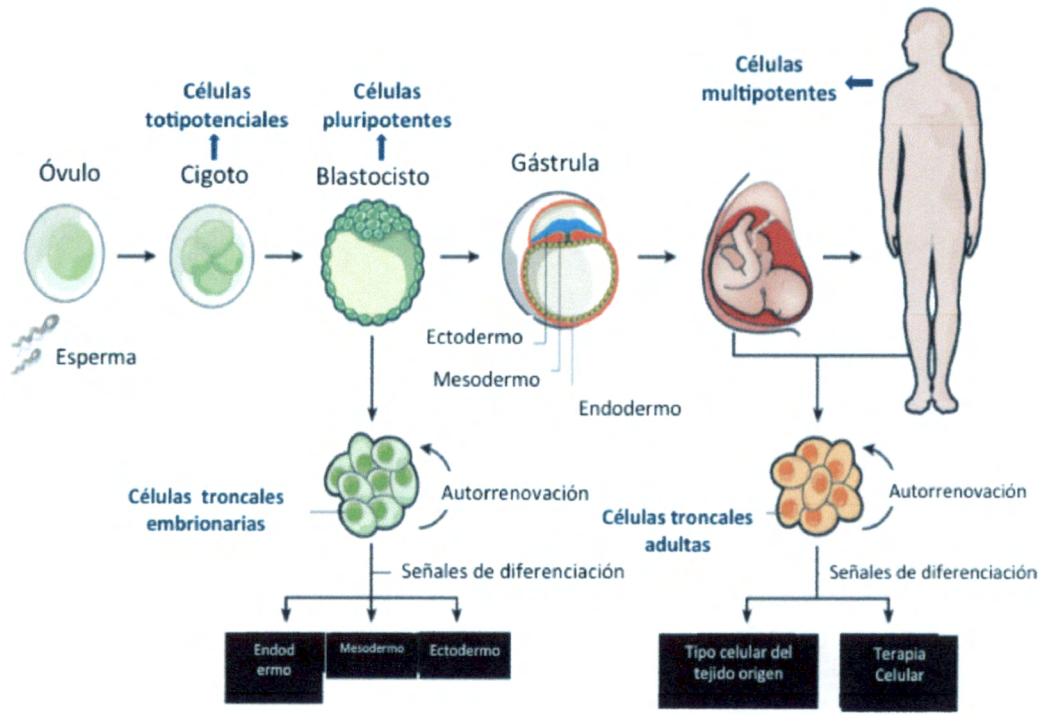


Fig. 4 Esquema de los tipos de células troncales. Inicialmente se clasificaron en: embrionarias, presentes en la masa interna celular durante el desarrollo embrionario, capaces de derivar las tres capas embrionarias: ectodermo, endodermo y mesodermo; y no embrionarias, o adultas presentes en órganos adultos. Además, se pueden clasificar de acuerdo a su plasticidad: totipotenciales, pluripotentes y multipotentes. Cada una con sus propias capacidades y limitaciones. Modificado de (Shevde, 2012).

2.1 Aplicación de las células troncales en medicina regenerativa ocular

Las líneas de investigación actual intentan desarrollar tratamientos para diversas patologías basados en la regeneración de la pérdida de células.

El desarrollo y funcionamiento adecuado de la retina requieren un balance entre los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular programada (apoptosis). Sin embargo, mutaciones genéticas o factores ambientales son capaces de activar vías específicas para inducir apoptosis en la retina contribuyendo al desarrollo de numerosas enfermedades distróficas y degenerativas de ésta. Las retinopatías más comunes son la retinopatía diabética, el glaucoma, la retinopatía del prematuro, la retinitis pigmentosa y la degeneración macular asociada con la edad que ocurren a través del desarrollo de anormalidades vasculares y/o muerte neuronal, generalmente fotorreceptores o células ganglionares.

Se han utilizado como tratamiento de las retinopatías: la terapia génica y el implante de células encapsuladas modificadas genéticamente, con el fin de liberar factores tróficos que permitan la sobrevivencia celular. Además la instauración de sistemas protésicos visuales que se basan en la implantación de microchips que generan impulsos eléctricos actuando como una retina artificial. Por último, la terapia con células troncales de diferentes orígenes al ser trasplantadas vía intraocular o subretitiana han mostrado gran capacidad de reemplazo de las células dañadas (Limb and Daniels, 2008).

Las estrategias que se han utilizado incluyen el reemplazo o sustitución de aquellas neuronas que han sido dañadas (Ahmad et al., 2010), la creación de microambientes neuroprotectores a través de la secreción de factores tróficos o la

activación o diferenciación de células troncales endógenas (Hirami et al., 2009). En estos protocolos para la regeneración se han utilizado células troncales de diversos orígenes (Gamm et al., 2007):

- Células troncales embrionarias (ES): derivadas de la masa celular interna del blastocisto durante el desarrollo embrionario, son inmortales y tienen un potencial casi ilimitado de desarrollo. Tras mantenerse en cultivo mantienen la capacidad de diferenciarse como células del epitelio pigmentado derivadas a partir de la línea de células embrionarias humanas (H9). También se ha descrito su capacidad de rescatar fotorreceptores en un modelo de retinitis pigmentosa (Lund et al., 2006).
- Células mesenquimales (MSC), fácilmente aisladas de la médula ósea o del cordón umbilical y que presentan la ventaja de permitir la realización de trasplantes autólogos. Un ejemplo de ello es la habilidad de diferenciación de las MSC obtenidas de la médula ósea a linajes de células gliales, fotorreceptores y epitelio pigmentado después de trasplantarlas en la retina (Joe and Gregory-Evans, 2010).
- Células progenitoras neurales (NPCs), derivadas del hipocampo adulto que, en microambientes permisivos, se pueden diferenciar y expresar ciertos marcadores retinales. Un ejemplo de ellas son las células troncales derivadas de hipocampo de rata adulta que fueron inyectadas en ojos de ratas con lesión por isquemia y mostraron ser capaces de integrarse a la retina huésped y expresar Map2, marcador de neuronas maduras. Sin embargo la eficacia todavía es controversial (Guo et al., 2003).
- Células pluripotentes inducidas (iPSC): Son generadas de diferentes células

somáticas por reprogramación con múltiples factores (Takahashi and Yamanaka, 2006). Al forzar la expresión de los factores de transcripción: Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4 se pueden reprogramar estas células somáticas a células con características pluripotentes como las células troncales embrionarias. Hallazgos recientes han revelado que las iPSC sin c-Myc contribuyen a la disminución de la isquemia retinal tras ser trasplantadas en el espacio subretinal (Fang et al., 2013).

- Células progenitoras derivadas del ojo aisladas del margen retinal anterior o cuerpo ciliar, del epitelio corneal y de la retina neural, que hasta el momento, parecen ser las mejores candidatas por su capacidad para generar linajes retinales (Limb and Daniels, 2008).

2.2 Principales limitaciones

El fundamento del inicio de la investigación en trasplantes retinianos fue la posibilidad de restablecer la visión para limitar la pérdida de fotorreceptores introduciendo células que mantengan a las células huésped funcionales o reemplazar las neuronas pérdidas. La realización de trasplantes en otros tejidos, como la favorable respuesta obtenida en el trasplante de cornea, sugirió la posibilidad de realizar el trasplante a nivel ocular con la posibilidad de que las nuevas neuronas establezcan nuevas conexiones sinápticas y obtener una capacidad funcional (Pinilla and Cuenca, 2006).

Hasta hoy, los trasplantes realizados han presentado problemas comunes, entre ellos: elegir el tipo celular adecuado, cómo minimizar la reacción inflamatoria postoperatoria y la respuesta inmune, el modo de realización del trasplante, optimizar la eficacia y la valoración del éxito postoperatorio.

Uno de los problemas más comunes es el rechazo de las células trasplantadas. Las células son reconocidas como extrañas por el sistema inmunológico, desencadenando una respuesta cuyo objetivo es la eliminación de elementos extraños (Anderson-Haag, 2013).

Entre una de las complicaciones se encuentran la formación de tumores *de novo*. Además, dado el empleo de inmunosupresores, las infecciones virales han representado una gran limitación después de un trasplante, de cualquier tipo, siendo la infección por citomegalovirus la más común. Ésta produce un estado de inmunosupresión transitoria que favorece la predisposición a las infecciones (Anderson-Haag, 2013).

2.3 Células troncales retinales

Los primeros estudios de regeneración ocular en animales datan de 1740. El naturalista Abraham Trembley descubrió el potencial regenerativo en el animal marino hidra después de un daño ocular. Después, Charles Bonnet descubrió que el tritón era capaz de regenerar sus ojos cuando el órgano en su mayoría era removido. El campo de la regeneración ocular ha involucrado y se ha expandido a diferentes modelos animales. A pesar que la regeneración del cristalino sólo ocurre en anfibios a consecuencia de una transdiferenciación, la regeneración de la retina es posible en especies como: peces, aves y mamíferos, bajo mecanismos complejos de diferenciación y transdiferenciación (Del Rio-Tsonis and Tsonis, 2003).

Tradicionalmente, se consideró que en la retina adulta de mamíferos no existía la capacidad de formación de neuronas nuevas o neurogénesis, aunque por largo

tiempo se había mostrado que los anfibios, como la salamandra, presentan la habilidad de regenerar la retina a lo largo de su etapa adulta de la vida. Las células troncales responsable de la regeneración en esta especie están localizadas en la zona marginal ciliar, situada en la parte anterior del globo ocular (Zhao et al., 2002). Así mismo, la presencia de células troncales en la zona marginal ciliar se ha documentado en mamíferos y pollos. Estudios más recientes han identificado células troncales retinales en la misma región del ojo humano (Limb and Daniels, 2008) (**Fig. 5**).

La evidencia muestra que en condiciones *in vitro* el epitelio pigmentado es hábil para desdiferenciarse y expresar antígenos de neuronas retinales. El epitelio pigmentado constituye una monocapa de células pigmentadas por gránulos de melanina. Se localiza sobre los segmentos externos de fotorreceptores y desempeña un rol en la homeostasis retinal. A pesar de los estudios realizados en cultivo, la capacidad de reemplazo a largo plazo y la evidencia de que las células del epitelio pigmentado constituyan una verdadera población de células troncales *in vivo* aún no ha sido probado definitivamente (Limb and Daniels, 2008).

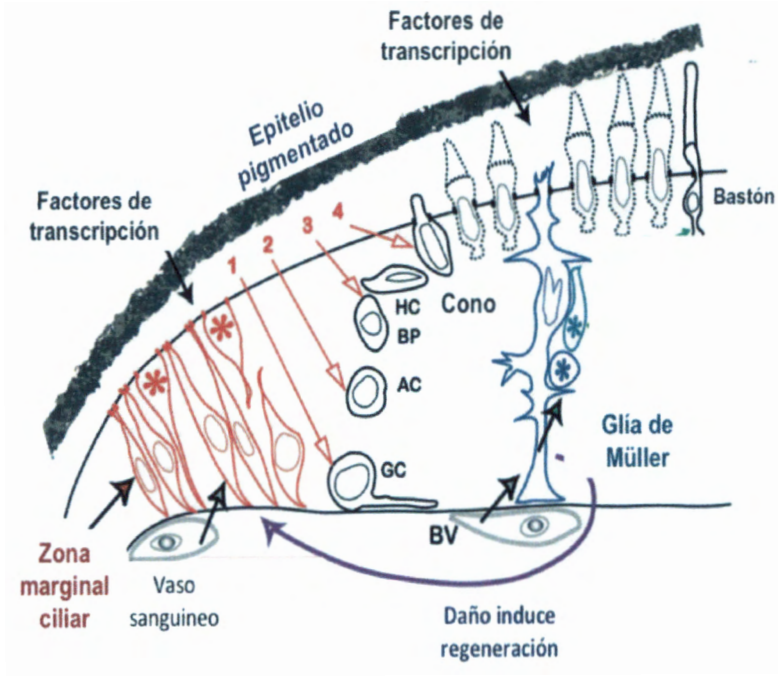


Fig. 5 Nichos de células troncales retinales. Se observan las células neuroepiteliales (en rojo) área conocida como zona marginal ciliar (ZMC). Son células troncales multipotentes, separadas del epitelio pigmentado por la ora serrata y los vasos sanguíneos (BV). Adyacente al epitelio pigmentado, se encuentra la retina, con diversos tipos celulares: Cono; Bastones; HC (célula horizontal); BP (célula bipolar); AC (célula amacrina); GC (célula ganglionar) y la glía de Müller (en azul) la cual se extiende en la retina y crea un nicho que mantiene los progenitores retinales. Un daño retinal induce la reorganización de Müller que se refleja en la organización celular y expresión génica de la ZMC. Modificado de (Raymond et al., 2006).

En células retinales de mamíferos adultos no se ha detectado neurogénesis activa pero, en condiciones *in vitro* con tratamientos exógenos, se ha demostrado que las células de Müller tienen un potencial para adquirir características fenotípicas y funcionales de progenitores retinales con la capacidad de ser una fuente para la regeneración ocular en pollo y mamíferos, de forma similar a lo que ocurre en algunos tipos de peces. Interesantemente, se ha identificado a la población de células de Müller con características troncales también en la retina de humanos.

Capítulo 3: LA GLÍA DE MÜLLER COMO CÉLULA PROGENITORA RETINAL Y SU REGULACIÓN

3.1 La glía de Müller en condiciones fisiológicas

La glía de Müller es la principal célula glial de la retina en vertebrados. De conformación radial, se expande en toda la profundidad de la retina, siendo única para este tejido. Gracias a su morfología y localización, estás células son capaces de establecer interacciones con todos los tipos de células en la retina (Reichenbach and Bringmann, 2013) (**Fig. 6**).

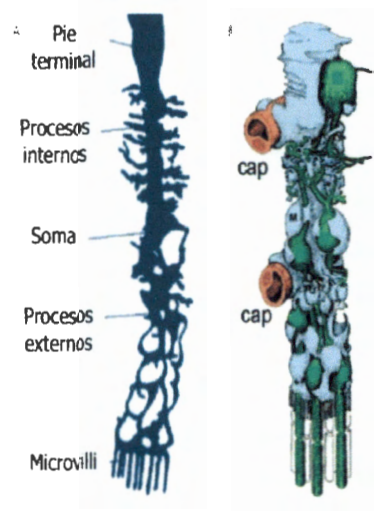


Fig. 6 Esquema de la Glía de Müller. A. Anatomía de la célula de Müller. B. Célula de Müller (azul) en contacto con neuronas de la retina (verde) y vasos sanguíneos (rojo). Modificado de (Bringmann et al., 2006)

El papel desempeñado por las células de Müller es crucial para el mantenimiento de la estructura y función retinal. Específicamente en condiciones normales, las funciones de estas células son:

- Mantener la homeostasis de potasio (K^+) y agua:

La actividad neuronal está asociada con el intercambio de iones sodio (Na^+), calcio (Ca^{2+}) y K^+ entre los compartimientos celulares. Dicha actividad neuronal

puede ser evocada por un estímulo de luz, el cual desembocaría en el incremento de K^+ extracelular en las capas plexiformes y en la disminución en el espacio subretinal. Al finalizar el estímulo de luz hay un incremento en los niveles de K^+ en el espacio subretinal. Si el estímulo no termina, el incremento de potasio extracelular es capaz de causar despolarización neural e hiperexcitabilidad. Las células de Müller retiran el exceso de iones de K^+ del espacio extracelular de las capas plexiformes y liberan cantidades iguales de K^+ en el espacio externo de la retina neuronal (Reichenbach and Bringmann, 2013, Bringmann et al., 2006).

El agua acumulada en la retina es redistribuida por proteínas de transporte de agua, aquaporinas presentes en la membrana de la glía de Müller. (Reichenbach and Bringmann, 2013, Bringmann et al., 2006)

- Metabolismo de radicales libres:

La glía de Müller provee nutrientes como lactato/piruvato para el metabolismo oxidativo de las neuronas retinales. Además, las células de Müller sintetizan el tripéptido glutatión el cual es liberado hacia las neuronas donde actúa como antioxidante protegiendo a estas de los efectos negativos de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Por otra parte, se ha descrito también que estas células remueven los desechos metabólicos y eliminan el dióxido de carbono (CO_2) (Giaume et al, 2007).

- Regulación del flujo de sangre retinal y participación en la formación y mantenimiento de la barrera hemato-retiniana.

La barrera hemato-retiniana limita la transportación inespecífica entre las neuronas y el flujo sanguíneo, además permite el transporte de aminoácidos, glucosa, vitaminas y nucleósidos requeridos para suplir la necesidad energética

(Hosoya and Tachikawa, 2009). La función de las células de Müller como células integrantes de la barrera hemato-retiniana es liberar compuestos vaso-activos, el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF-β,) en respuesta a la estimulación neuronal e inducir cambios vasomotores.

- Reciclaje de neurotransmisores:

En la retina, las sinapsis eléctricas y químicas son esenciales para la transmisión de señales visuales desencadenadas por los fotorreceptores. Las células de Müller están involucradas en la señalización sináptica sensorial de la retina. Poseen transportadores de alta afinidad para neurotransmisores retinales como glutamato, glicina y el ácido γ-aminobutírico (GABA) que retiran rápidamente los neurotransmisores del espacio sináptico.

También expresan glutamina sintetasa, la cual convierte glutamato a glutamina, molécula que es liberada para su recaptura por parte de las neuronas y su posterior conversión en GABA o glutamato. Dicha enzima es exclusiva de la glía de Müller (Reichenbach and Bringmann, 2013).

Igualmente, la célula de Müller contribuye a los procesos de señalización neural dado que expresa diferentes canales iónicos, transportadores transmembranales, enzimas y receptores para varios neurotransmisores como GABA y glutamato (Bringmann, 2006).

- Liberación de factores de crecimiento:

Una de las funciones de la célula de Müller madura es la liberación de los factores de crecimiento neurotróficos, como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF),

el factor neurotrófico ciliar (CNTF) y VEGF (Giaume et al, 2007). Los factores de crecimiento liberados por la glía son cruciales para procesos complejos como la regeneración retinal, como se abordará más adelante (Reichenbach and Bringmann, 2013).

En condiciones patológicas, la glía de Müller al igual que otras células gliales del sistema nervioso central, sufren gliosis reactiva tras un daño o un estrés crónico. La gliosis de la glía de Müller es caracterizada por proliferación, cambios morfológicos, alteraciones en la producción de filamentos intermedios, variaciones en el transporte de iones y en la secreción de moléculas de señalización como VEGF. Sin embargo, la gliosis es importante para la protección y reparación de las neuronas retinales (Dyer and Cepko, 2000).

3.2 La glía de Müller como una célula progenitora retinal

Evolutivamente, la glía de Müller conserva un potencial como célula progenitora en diferentes especies:

En un modelo de pez cebra el cual expresaba la proteína verde fluorescente en la proteína acídica fibrilar glial (GFAP) propia de las células gliales. Se demostró una regeneración ocular como consecuencia de la muerte de los fotorreceptores después de un daño con luz. Esta respuesta es iniciada por la células de Müller que proliferan en la capa nuclear interna (**Fig. 7 A-C**), dando lugar a células progenitoras que continúan dividiéndose y migrando a la capa nuclear externa, donde se diferencian a conos y bastones (Johns and Fernald, 1981) (Bernardos et al., 2007).

En el pollo se ha demostrado que, en respuesta a un daño neurotóxico, la glía de Müller es capaz de re-entrar al ciclo celular, para después migrar a la parte distal

de la retina donde adquiere fenotipo de célula progenitora la cual expresa factores de transcripción y neurofilamentos propios de células progenitoras embrionarias. Un porcentaje de estas células generadas se diferencian a neuronas y otras se desdiferencian nuevamente a glía de Müller pero la mayoría pertenecen como células desdiferenciadas las cuales expresan Pax6 y Chx10 (genes implicados en la proliferación). Esto se demostró ante un daño excitotóxico producido por N-metil-D-aspartato (NMDA) en la retina de pollo, se produce la muerte de las células: horizontales y bipolares. La glía de Müller por su parte es capaz de proliferar, está noción se ha apoyado por la expresión de un marcador de proliferación, 5-bromo-2-desoxiuridina (Brdu) exclusivamente en la glía de Müller (**Fig. 7 D-F**). (Fischer and Reh, 2001, Fischer et al., 2002, Fischer and Reh, 2003). En roedores, la glía de Müller ante respuesta a un daño ocular con niveles subtóxicos de glutamato, se desdiferencia, expresa marcadores de célula progenitora (Nestina), prolifera y migra a la capa nuclear externa donde puede transdiferenciarse a fotorreceptores (Takeda et al., 2008). Además, el potencial de desdiferenciación de la glía de Müller a neuronas ha sido mostrado en modelos *in vivo* de retina murina, después de la inyección intraocular de NMDA la glía es estimulada con factores de crecimientos para entrar al ciclo celular y es capaz de diferenciarse a neurona (Karl et al., 2008).

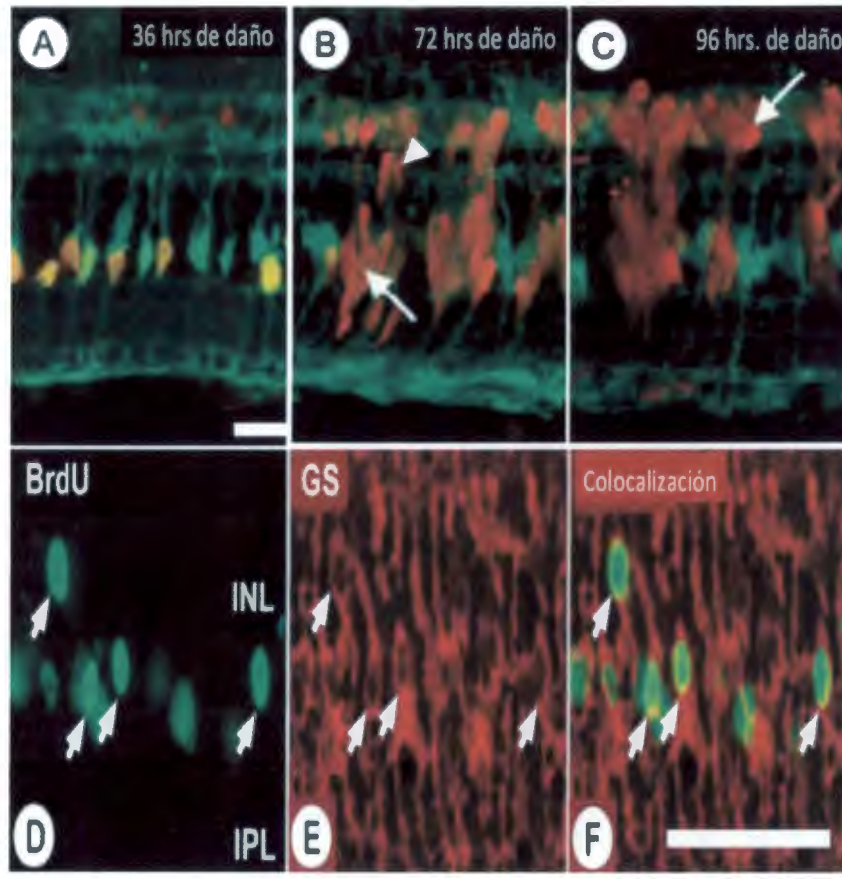


Fig. 7 La glía de Müller como célula progenitora. (A) En la retina de pez cebra 36 horas después a la exposición a luz causa la actividad proliferativa, mostrada por la proteína PCNA en rojo, la glía de Müller prolifera, se observa en verde. después de 72 (B) y 96 hrs (C) la mayoría de las células hijas llegan a ser células progenitoras, muchas de las cuales migran a la capa ON donde continúan proliferando y generan fotorreceptores. En la retina de pollo NMDA induce apoptosis de células neuronales provocando proliferación, indicada por células positivas a BrdU, verde (D) la glía de Müller se distingue por la expresión de glutamanina sintetasa (GS), en rojo (E) después de 2 días del daño, ambas marcas colocalizan (F). IPL, capa plexiforme interna. Modificado de (Fischer and Reh, 2001).

En resumen, en mamíferos, en contraste a anfibios y aves, la respuesta proliferante de la célula de Müller ante un daño es limitada no obstante es capaz de entrar al ciclo celular. Sin embargo ha sido posible estimular la regeneración,

mediante: inyecciones intraoculares de factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento fibroblástico (FGF), insulina o glutamato (Takeda et al., 2008), (Karl et al., 2008). Además, como se detalla más adelante, otros estudios en rata realizados en nuestro laboratorio, han permitido determinar los mecanismos de desdiferenciación, proliferación y diferenciación de la glía de Müller hacia linajes neuronales de la retina (Ramirez et al., 2012, Ramirez and Lamas, 2009).

3.3 Moduladores en la proliferación y diferenciación de la glía de Müller

Los procesos de proliferación y de diferenciación celular en poblaciones de células troncales se encuentran regulados por señales externas (extrínsecas) y por la competencia o receptividad de cada célula que es determinada por los genes que expresan (señales intrínsecas). El programa genético es lo que se manifiesta como ¨troncalidad¨. Se desconoce mucho de los factores que controlan estos procesos y que mantienen poblaciones constantes de células troncales adultas para su diferenciación (Bassett and Wallace, 2012)

3.3.1 Factores de transcripción

Las primeras moléculas evaluadas han sido señales extrínsecas involucradas en el desarrollo. Sin embargo, existen mecanismos intrínsecos controlados por los factores de transcripción, estos componentes de regulación tienen un comportamiento diferente en el desarrollo embrionario y en adulto (Levi and Morrison, 2008).

Numerosos estudios han definido los requerimientos moleculares necesarios para la regeneración en la retina del pez cebra. Gran variedad de factores de

transcripción regulan la regeneración retinal en el pez. Incluyendo el factor promotor del crecimiento de neuritas a-b y el CNTF. CNTF es suficiente para estimular la proliferación de la glia de Müller en la retina sin daño, vía STAT 3 (transductor de señal y activador de la transcripción 3). Se encontró que el complejo proteico Achaete- scute homologo 1 a (Ascl 1 a) que regula tempranamente el proceso de regeneración en la retina del pez además inhibe los factores de transcripción culpables de inhibir la regeneración de la glía de Müller. Dentro de las señales intrínsecas que regulan la diferenciación, se encuentran diversos factores de transcripción proneurales de tipo hélice-bucle-hélice básica (bHLH) como: Ascl1, Neurogenina (Neurog2), Factor 1 de diferenciación neurogénica (NeuroD1), Math 5 y Pax 6, necesarios para la regeneración de 1 o más tipos celulares retinianos (Karl and Reh, 2010). A si mismo, se ha reportado que las chaperonas hspd 1 y mps-1.

La glía de Müller normalmente expresa varios factores necesarios para la generación de células pluripotentes inducidas (iPS), incluyendo Sox2, Klf4 y c-Myc (Takahashi and Yamanaka, 2006).

Como ya se mencionó, cuando la glía de Müller de pollo postnatal responde a un daño neurotóxico provocado por un sobredosis de NMDA a la retina, reinicia la fase mitotótica del ciclo celular. El análisis del daño ocasionado por NMDA y otros neurotóxicos en la retina han demostrado que células de Müller que proliferan expresan una variedad de genes progenitores; éstos regulan la proteína de dominio homeobox Chx10 y la proteína Pax6 para expresar, Cash1/Ascl 1a, FoxN4, Notch 1 y HesD. La re-expresión de estos factores, de los cuales muchos

se sobre expresan en la retina del pez después de una lesión, indican que la glía de Müller ha entrado a un estado de célula progenitora

Varias de las señales intrínsecas o factores de transcripción participantes en la proliferación y diferenciación en la glía de Müller han sido caracterizados gracias a la manipulación *in vitro.* Entre las señales intrínsecas que promueven la regeneración retinal está la señalización de Notch cuya activación temprana es crucial en el proceso de regeneración aunque un efecto prolongado de su actividad limita un reemplazo eficiente (Wang et al., 2009). Conjuntamente, se ha descrito que Sonic hedgog promueve el potencial de célula troncal en las células de Müller, favoreciendo su desdiferenciación (Osakada et al., 2007).

3.3.2 Neurotransmisores

Durante la comunicación neuronal del proceso visual son necesarios los neurotransmisores, tanto excitadores como inhibidores. Los principales son: el glutamato, GABA, la glicina, la dopamina (DA) y la acetilcolina. Además, éstos están implicados en la modulación de la proliferación y diferenciación celular durante el desarrollo de la retina (Martins & Pearson, 2008).

Los principales neurotransmisores en el sistema nervioso central durante la adultez son: GABA y glutamato. Por su parte GABA es el mayor inhibidor mientras que glutamato excitador.(Martins and Pearson, 2008)

GABA es sintetizado por la enzima glutamato descarboxilasa a partir del glutamato. Este neurotransmisor activa los receptores sinápticos y extra sinápticos de $GABA_A$ produciendo la hiperpolarización de las neuronas maduras, la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje y el incremento de

calcio intracelular (Owens and Kriegstein, 2002). Sin embargo, durante el desarrollo, se ha demostrado que actúa como un factor trófico. La despolarización mediada por GABA puede promover la neurogénesis, sinaptogénesis,

Diversos estudios revelan que GABA regula las diferentes etapas en la neurogénesis adulta promoviendo la proliferación, diferenciación y migración neuronal de las células progenitoras hipocampales (Shaoyu et al., 2006). También en la retina, la expresión de los receptores GABA $_{A,\ B}$ y $_{C}$ se ha determinado durante los diferentes tiempos del desarrollo retinal (Martins and Pearson, 2008).

Por otro lado, el glutamato es un aminoácido no esencial que no atraviesa la barrera hematoencefálica. Se sintetiza en la mitocondria de la neurona a partir de glucosa. Luego de sintetizarse se libera hacia el citoplasma en donde se acumula en vesículas sinápticas por un proceso dependiente de Mg^{++}/ATP. La propagación del impulso nervioso hacia la terminal axónica, promueve la liberación de glutamato en la sinapsis a través de un mecanismo dependiente de la concentración intracelular de Ca^{++}, mediante un proceso de exocitosis, para interactuar con sus receptores específicos (Wang and Qin, 2010)

El glutamato ejerce su papel a través de receptores: a) ionotrópicos, activados por ligandos que son permeables a calcio, sodio y potasio, los cuales son: α-amino-3 hidroxi-5- metil- 4 isoxazol propianato (AMPA), los receptores para kainato (KA) y los receptores para N-metil- D aspartato (NMDA); b) metabotrópicos los cuales están acoplados a proteínas G. El glutamato es un neurotransmisor indispensable para el desarrollo neuronal, plasticidad sináptica y bajo condiciones fisiológicas participa en la memoria y aprendizaje (Martins and Pearson, 2008).

3.3.2.1 Participación de GABA y glutamato en la neurogénesis adulta

La formación de nuevas neuronas tal como ocurre durante el desarrollo embrionario, sucede en el cerebro de mamíferos adultos. Se han reportado como áreas neurogénicas la zona subventricular (SVZ) de los ventrículos laterales y la zona subgranular (SGZ) del giro dentado del hipocampo. Estas áreas limitadas el cerebro adulto contienen células troncales neuronales en división que generan células progenitoras intermedias y neuroblastos*. Las evidencias sobre el crecimiento celular sugieren que los neurotransmisores GABA y glutamato juegan un papel en el ritmo de la sobrevivencia, proliferación, migración, formación de sinapsis y la integración de las nuevas neuronas formadas al establecer redes sinápticas. La acción de GABA depende de la presencia y activación tónica de receptores no sinápticos $GABA_A$. En la SVZ, GABA actúa como un regulador de retroalimentación en la producción neuronal y migración (Bordey, 2006). En la SGV, los mecanismos GABAérgicos regulan la diferenciación y el ritmo de integración sináptica. Además, la despolarización por GABA provee un mecanismo básico de excitación- acoplamiento de neurogénesis.

Los receptores de glutamato: AMPAm kainato y NMDA también han sido reconocidos por su papel crucial en las últimas etapas de neurogénesis y como elemento en la plasticidad neuronal en neuronas de recién nacimiento en el cerebro adulto. En suma, la concentración de GABA y glutamato provee homeóstasis en la neurogénesis del prosencéfalo (Vicini, 2008).

*Neuroblasto: Es una célula en división que se convertirá en una neurona después de la fase de migración

ANTECEDENTES

La célula glial de Müller se ha identificado como una célula troncal multipotente capaz de responder a la pérdida de fotorreceptores reemplazando las células perdidas en varias especies, incluidos los mamíferos.

Tanto en nuestro laboratorio como en otros grupos de investigación, se han aislado células con características de progenitores a partir de la glía de Müller de rata postnatal con el objetivo de desarrollar tratamientos de reposición para la retina. Estas células se pueden mantener en cultivo en forma de "retinoesferas" o "neuroesferas" que son morfológicamente similares a las obtenidas a partir de células progenitoras neurales del cerebro. Estas retinoesferas son agrupaciones heterogéneas de células con diferente capacidad proliferativa y de diferenciación. Son estructuras esféricas que alcanzan un tamaño máximo de 100 μm de diámetro. La capacidad proliferativa de estas células se analiza mediante la disociación de las células y su re-siembra para obtener neuroesferas secundarias, terciaras, etc; manteniéndose la capacidad proliferativa durante al menos 10 pasajes (Bez et al., 2003). La capacidad de diferenciación se evalúa mediante la manipulación de las condiciones de cultivo, la eliminación de factores de crecimiento del medio y la evaluación de la expresión de marcadores de diferenciación.

La obtención de estos cultivos, nos ha permitido identificar varios mecanismos por los cuales es posible incrementar el número de células que proliferan o se diferencian a precursores neuronales en la retina en condiciones *in vitro*. Estos mecanismos incluyen la activación de rutas de señalización glutamatérgica

(Ramirez and Lamas, 2009) o GABAérgica (Ramírez et al., 2012) involucrada en la proliferación, la diferenciación celular y en modificaciones epigenéticas (**Fig. 8**). Así, en nuestro laboratorio hemos demostrado que al activarse los receptores NMDA en cultivos de células progenitoras derivadas de la glía de Müller aumenta la proliferación de estas células y la fosforilación del factor de transcripción CREB en el núcleo encargado de la regulación de proliferación, diferenciación y sobreviviencia de nuevas neuronas en distintas áreas del sistema nervioso central (Ramirez and Lamas, 2009).

Además, demostramos que el tratamiento con el neurotransmisor GABA induce la acumulación de los marcadores neuronales tempranos Neuro D1 y Beta III Tubulina (**Fig. 8**) en las células progenitoras obtenidas a partir de cultivos primarios de glía de Müller de la rata postnatal. Sin embargo el efecto puede ser inhibido al bloquear canales de calcio de tipo L (VGCCs), sugiriendo que el flujo de calcio a través de estos canales promueve la diferenciación de células progenitoras derivadas de la glía de Müller a linajes neuronales (Ramírez et al., 2012),

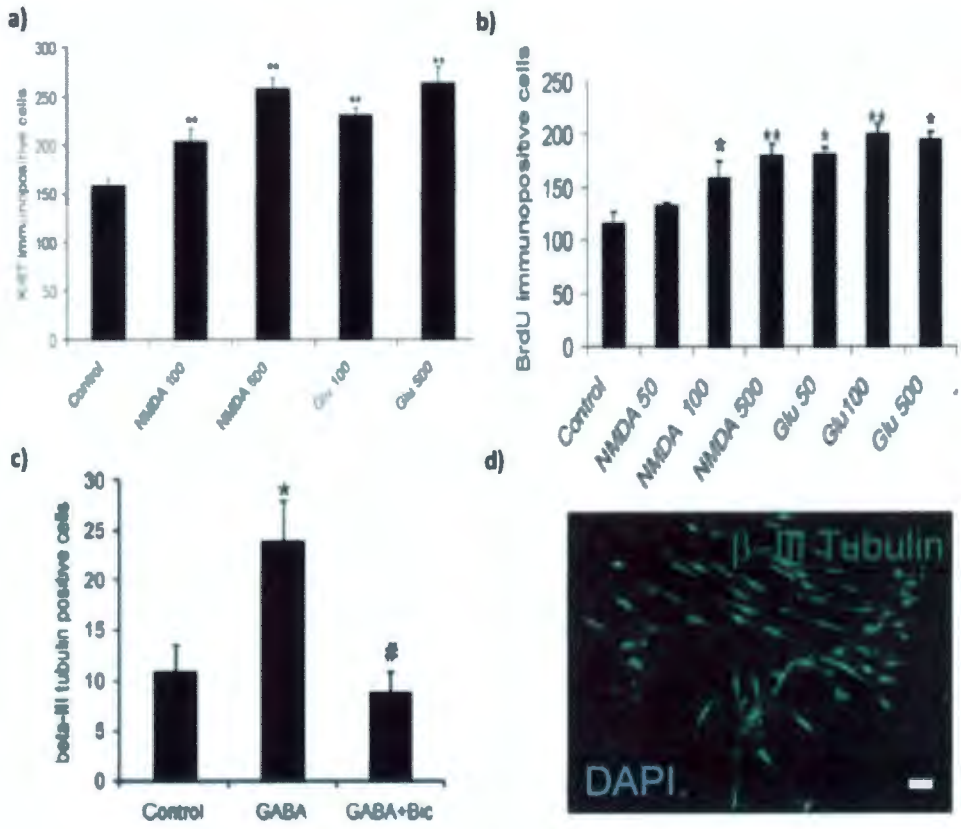


Fig. 8 Efecto del Glutamato y GABA in vitro. Glutamato aumenta el número de células positivas a Ki67 (a) y BrdU (b) ambos indicadores de proliferación. GABA induce la expresión de marcadores de progenitores neuronales temprano, en el gráfico (c) se señala el aumento de células positivas a beta-III Tubulina y se muestra la fotomicrografía representativa de las células progenitoras cultivadas con GABA etiquetadas con el anticuerpo beta-III Tubulina. Bic= bicuculina, antogonista de GABA.

JUSTIFICACIÓN

Todas las retinopatías que cursan con muerte y degeneración neuronal son causa de pérdida de la visión. Aún no existen tratamientos totalmente satisfactorios para dichas patologías, sin embargo, el descubrimiento de la existencia de células progenitoras en la retina adulta ha impulsado intensamente el diseño de terapias regenerativas.

Ramírez y colaboradores en 2012 demostraron que las células progenitoras derivadas de los cultivos primarios de células de Müller tratadas con GABA, expresan marcadores de precursores neuronales en la retina, en cultivo. Sin embargo, se desconoce si este tratamiento podría optimizar el comportamiento de las células progenitoras *in vivo* en un esquema de trasplante. En este proyecto se propone trasplantar células progenitoras GFP^+ en un modelo de daño retinal *in vivo,* identificarlas en la retina gracias a su fluorescencia y con ello definir las condiciones que permitan la sobrevivencia del trasplante.

HIPÓTESIS

El pre-tratamiento de células progenitoras derivadas de la glía de Müller postnatal con GABA y glutamato aumentará la sobrevivencia y capacidad de diferenciación de estas células en un modelo de trasplante en la retina de rata.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la inducción del proceso de diferenciación neuronal de las células progenitoras derivadas de la glía de Müller postnatal bajo un tratamiento con GABA y glutamato aumenta la eficiencia del trasplante de estas células en un modelo de daño retinal *in vivo*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar la población de células progenitoras GFP^+ derivadas de la glía de Müller
2. Optimizar un modelo de daño retinal tóxico.
3. Comparar la eficiencia del trasplante de células progenitoras de la glía de Müller tratadas con GABA y glutamato.
4. Determinar la capacidad de expresión de marcadores neuronales en las células trasplantadas tratadas con o sin GABA.

MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los experimentos fueron realizados con animales de laboratorio tratados y manipulados bajo los lineamientos del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Cinvestav (CICUAL). Se utilizaron ratas de la cepa Sprangue-Dawley-GFP$^+$ (Lois et al., 2002) y Long-Evans. Ambas se mantuvieron en ciclo de luz-oscuridad de 12-12 y tuvieron acceso a su alimento y agua *ad libitum*.

Cultivos primarios de glía de Müller positivos a la proteína verde fluorescente (GFP$^+$)

Se utilizaron ratas transgénicas que expresan constitutivamente la GFP de la cepa Sprague Dawley (Lois et al., 2002), de 3 a 10 días postnatales. Tras su decapitación se les enucleó los ojos y se incubaron en una solución de medio suero reducido modificado DMEM, Opti-MEM (invitrogen), 10% suero fetal bovino, SFB, (Gibco); y una solución de antibióticos: penicilina y estreptomicina (Gibco) a una dilución 1:1000. Durante toda la noche, se almacenaron a temperatura ambiente y se cubrieron de luz, para eliminar las neuronas y permitir la sobrevivencia solamente de la glía. Al día siguiente, los ojos se incubaron por 30 min a 37ºC en una solución de medio Eagle modificado de Dulbecco, DMEM (Invitrogen), tripsina (Gibco) 1% y 70IU/ml de colagenasa tipo I (Sigma). Después, se procedió a la disociación mecánica de la retina. Las células se sembraron en frascos de cultivos de 75 cm^2 (aproximadamente dos retinas por frasco) y se incubaron en medio OPTIMEM/4% SFB/ penicilina-estreptomicina 1:1000 (Gibco),

a 37°C en una atmósfera de 5% CO_2, hasta observar una confluencia celular del 80 % en el frasco.

El protocolo de obtención de glía de Müller (modificado Hicks and Courtois, 1990) es comúnmente usado en nuestro laboratorio. Este método de cultivo ha comprobado un 96% de contenido de glía de Müller puras (Ramirez and Lamas, 2009). La obtención de cultivos primarios que expresen GFP^+ es una de las aportaciones del presente proyecto que nos permitirá identificarla en modelos *ex vivo* e *in vivo*.

Obtención de células progenitoras en cultivo (neuroesferas) derivadas de la glía de Müller

La población de células progenitoras *in vitro*, llamadas también neuroesferas, se obtuvieron a partir de los cultivos primarios de glía de Müller GFP^+ de la cepa Sprague Dawley. Cuando los cultivos de glía de Müller estaban al 80% de confluencia, se desprendieron las células mecánicamente y se sembraron en medio OptiMEM (Gibco) enriquecido con suplemento N2 100X, factores de crecimiento: EGF 30 ng (Prepotech), FGF-2 30 ng (Prepotech) y penicilina-estreptomicina 1:1000. La capacidad proliferativa de las células se evaluó mediante la disociación enzimática con Acutasa (Sigma), resiembra y obtención de neuroesferas secundarias y terciarias.

Diferenciación *in vitro* de neuroesferas

Previamente las neuroesferas terciarias se disociaron enzimáticamente con 200 µM de Acutasa en seguida se cultivaron con 100 µM de GABA (Sigma) o 50 µM de glutamato (Sigma) ambos tratamientos se realizaron durante 24 horas.

Modelo de daño retinal *in vivo*

Para el modelo de daño retinal neurotóxico se utilizaron ratas Long-Evans de 15 a 20 días. Se utilizó como anestesia general pentobarbital sódico (50 mg/kg) y anestésico local clorhidrato de tetracaína, aplicamos una gota sobre la pupila 5 minutos antes de la inyección. Se les dañó la retina mediante una inyección en la parte superior de ojo a la altura de la esclera con una aguja calibre 30 conectada a una jeringa de 10 µl (Hamilton). Se inyectó de 3-4 µl de NMDA (Sigma) a una concentración de 250 mM disuelto en solución salina en uno de los ojos mientras que el ojo control recibió el mismo volumen de solución salina (**Fig. 9**).

Las ratas se recuperaron espontáneamente de la anestesia y fueron devueltas al bioterio con comida y agua *ad libitum*.

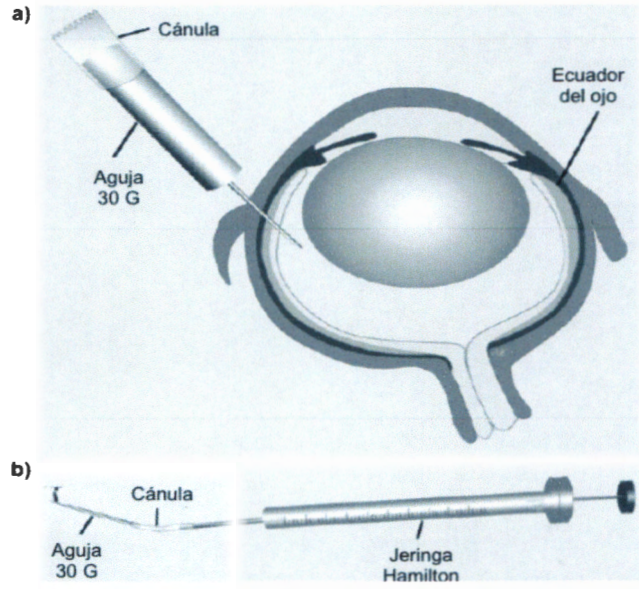


Fig. 9 Diagrama de la inyección intraocular. (a) Se muestra una representación gráfica del sitio de la inyección en el intravítreo. (b) Representación de una jeringa Hamilton acoplada a una cánula y ésta a una aguja dental. Modificado de (Muhlfriedel et al., 2013)

Viabilidad de las neuroesferas GFP^+ trasplantadas por exclusión de azul de tripano

Para los análisis de inmunocitoquímica y el trasplante de neuroesferas se cuantificaron las células por medio del método del análisis de viabilidad de exclusión de azul de tripano. El azul de tripano es un colorante que se incorpora a la membrana plasmática de una célula muerta, por esa razón cuantificamos las células que no estaban teñidas de azul.

El botón celular fue resuspendido en 800 µl de acutasa y 200 µl de amortiguador de fosfatos. De esta solución se tomaron 10 µl de la suspensión celular y 10 µl del colorante azul de tripano. Ambos fueron colocados en una cámara de Neubauer para cuantificar las células disociadas localizadas en los cuadrantes de las esquinas superiores e inferiores. Por último, el número obtenido se dividió entre el número de cuadrantes y se multiplicó por 2; el resultado se elevó a la cuarta potencia.

Inmunofluorescencia

Para cultivo de la glía de Müller y neuroesferas:

Con el fin de evaluar la pureza del cultivo de la glía de Müller y determinar si las neuroesferas expresan marcadores específicos de células progenitoras se realizaron inmunocitoquímicas. Se sembraron aproximadamente 40,000 células de ambos tipos celulares sobre cristales en una placa de 48 pocillos con el medio adecuado para cada tipo celular. Después de aspirar el medio de cultivo, se adicionó paraformaldehido (PFA) (Sigma) 4% durante 10 minutos para fijar a las células. Se procedió a lavar con amortiguador de fosfatos (PBS) y se prosiguió con la imnunofluorencencia.

Para tejido:

Con el fin de confirmar el daño retinal ocasionado por el NMDA, se utilizaron técnicas de análisis proteico y de inmunofluorescencia. Se enuclearon los ojos y se fijaron con PFA (Sigma) al 4% en PBS durante 18 horas. Se criopreservaron por deshidratación en 30% sacarosa (Sigma) durante 24 horas. Después se realizó la inclusión del tejido en medio de temperatura de corte óptima, compuesto OCT (Tissue-Tek®) para cortar en secciones seriales de 8-10 µm en el cristotato (Leica). Los cortes retinales o también llamadas rebanadas retinales se adhirieron en portaobjetos SuperFrost. Finalmente de lavó con PBS para eliminar el compuesto OCT se proseguió con la imnunofluorencencia.

Para cultivos celulares y tejido, se bloquearon las uniones inespecíficas de proteína-anticuerpo con una solución de PBS con albúmina de suero bovino 30%, suero de cabra 5% y se permeabilizó la membrana celular con tween 20/tritón 0.1%. Después se colocó el anticuerpo primario (tabla 1) toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, después cuatro lavados con PBS se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a un fluorócromo, como se indica en la tabla, todos a una dilución 1:500. Para la tinción de núcleos se usó DAPI (Invitrogen) 5 µm/ml o Hoechst 33342 (Sigma) 1 µm/ml durante 5 minutos. Finalmente se adicionó en los portaobjetos 5-8 µl de medio Vectashield® para su análisis en la microscopía de epifluorescencia o confocal.

Tabla 1. **Anticuerpos usados para inmunofluorescencia**

Anticuerpo	Anticuerpo secundario	Célula diana	Dilución	Manufactura
Nestina	Cabra Alexa 468 anti ratón	Célula progenitora neural	1:200	Millipore
Glutamina sintasa	Cabra- Alexa 568 anti conejo	Glía de Müller	1:200	Abcam
Rodopsina	Cabra-Cy5	Fotorreceptores	1:200	Millipore
Calbindina	Cabra- Alexa 568 anti conejo	Célula horizontal	1:500	Millipore
GFAP	Cabra-Alexa 546 anti pollo	Célula ganglionar	1:10000	Millipore
Ki67	Cabra- Alexa 565 anti -conejo	Célula en proliferación	1:500	Millipore
Beta-III Tubulina	Cabra-Alexa 546 anti- pollo	Célula neuronal temprana	1:1000	Millipore

Análisis de muerte celular

La muerte celular por apoptosis causada por la administración de NMDA fue analizada con el "*kit* de Detección de muerte celular *in situ*" (Roche 11684795010) siguiendo las indicaciones del fabricante. El análisis se basa en la unión de deoxi-uridina transferasa terminal (TdT) a extremos del DNA, permitiendo la adhesión del desoxi-uridina-trifostato (dUTP), a la cual se le acopla un fluoróforo.

Se enuclearon los ojos 24 horas después de la inyección de NMDA y se procesaron los ojos con el mismo protocolo para inmunofluorescencia. Los cortes de retina de 10- µm se adhirieron a los portaobjetos para después ser procesados. Para el control positivo se pre-trató la retina con Dnasa I (Sigma)

250U/ml y Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$) 1 mM durante 10 minutos para después ser procesada mientras que para control negativo sólo se adicionó solución de etiquetado.

Trasplante de células progenitoras vía intraocular

Al segundo día de la inducción del daño retinal, las ratas se anestesiaron con una combinación de xilacina (relajante muscular) 5 mg/kg y ketamina (sedante) 50 mg/kg para asegurar un estado de relajación muscular, analgesia y supresión de reflejos.

Por vía intraocular se hizo el trasplante de 5,000 células aproximadamente en 3 µl de suspensión. Tras la recuperación de la anestesia las ratas fueron devueltas al bioterio con comida y agua *ad libitum*. Se esperaron 3, 6 y 14 días para evaluar la incorporación de las células en la retina.

Posterior a la identificación del tiempo con mayor integración celular en la retina y con el fin de evaluar el papel de GABA y glutamato, se dividieron los siguientes grupos de estudio (tabla 2) con n=15 para cada uno, excepto el grupo control del transplante (Grupo 4; n=4). Grupo 1: se les realizó transplante celular con medio control en ambos ojos. Grupo 2: se les trasplantaron las células pre-tratadas durante 24 horas con GABA 100 µM en el ojo antes de la lesión con NMDA y el ojo control (solución salina) fue trasplantado con células en medio control. Grupo 3: Los animales con el ojo dañado recibieron el trasplante de células progenitoras en medio con Glutamato y células en medio control en el ojo no dañado. Grupo 4: consistió en la inyección únicamente de medio de cultivo en los dos ojos. Previo a los transplantes celulares, todos los grupos fueron lesionados de un ojo con NMDA y el otro se le administró solución salina como ojo control.

Tabla 2 Resumen de los grupos de experimentación

Grupo	Rata Long-Evans 16 d	Daño retinal	Trasplante
Grupo 1 n=15	Ojo 1	Solución Salina	Células control
	Ojo 2	NMDA	Células control
Grupo 2 n=15	Ojo 1	Solución Salina	Células control
	Ojo 2	NMDA	Células con GABA
Grupo 3 n=15	Ojo 1	Solución Salina	Células control
	Ojo 2	NMDA	Células con Glutamato
Grupo 4 n=5	Ojo 1	Solución Salina	Medio sin células
	Ojo 2	NMDA	Medio sin células

Procesamiento del tejido después del trasplante

Proceso para cuantificar las células progenitoras trasplantadas visibles en el modelo de daño retinal. Los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico (30 mg/kg) vía intraperitoneal. Los ojos fueron enucleados y criopreservados en sacarosa (Sigma) al 30% en PBS durante 4 horas. Después se embebieron en medio de temperatura de corte óptima, compuesto OCT (Tissue-Tek®) y se congelaron en un baño refrigerante de hielo seco y acetona pura.

Se posicionó el ojo sobre la platina del criostato de manera horizontal con el fin de observar al cristalino en la parte externa. Los cortes realizados fueron coronales hasta distinguir la retina. A partir de la retina, se hicieron cortes de 10 µm de grosor, las primeras dos rebanadas se conservaron mientras que la siguiente se desechó así subsecuentemente hasta obtener 20 rebanadas para análisis. Los cortes seleccionados se adhirieron en los portaobjetos SuperFrost. Por último, las laminillas con el tejido se fijaron en PFA (Sigma) al 4 % en PBS a pH 6.8 durante 10 minutos. Con el fin de identificar las capas nucleares retinales, los núcleos se tiñeron con DAPI 5 mg/ml en PBS.

Adquisición de imágenes bajo microscopía

Las laminillas obtenidas de la inmunofluorescencia y del trasplante se observaron en el microscopio de epifluorescencia Zeiss Axiovert 40 CFL acoplado a una cámara digital. Las imágenes se capturaron en el programa AxioVision. Además, laminillas seleccionadas se observaron en un microscopio confocal LSM 780 NLO y las imágenes se procesaron en el programa Zen 2011.

Análisis estadístico

Para cuantificar las células progenitoras derivadas de la glía de Müller inyectadas vía intraocular en la retina sana y dañada, se cortaron aleatoriamente rebanadas retinales de 10 µm y se cuantificaron las células o aglomerados celulares positivos a la GFP encontrados en las capas retinales. Los resultados se analizaron, mediante la técnica estadística de ANOVA de una vía tomando los valores significativos con $p<0.05$ y como prueba "post hoc" se continuó con la prueba de Kruskal-Wallis con valores de $p<0.05$ como diferencias significativas. Para dicho análisis de uso el programa Prisma versión 5.0 a.

RESULTADOS

1. Cultivos primarios de glía de Müller positivos a la proteína verde fluorescente (GFP^+)

Los cultivos primarios de células de Müller se obtuvieron de retina de rata Sprague Dawley transgénica que expresa constitutivamente la proteína verde fluorescente (GFP^+) de 6 a 10 días postnatal con el fin de obtener neuroesferas GFP^+ para identificarlas después del trasplante vía intravitrea. Las células presentaban una morfología elongada con proyecciones citoplasmáticas, como ya ha sido descrito en cultivos de otras cepas Su capacidad de proliferación y mantenimiento en cultivo tampoco difirió de otros cultivos obtenidos (Ramirez and Lamas, 2009). Todas las células del cultivo fueron inmunopositivas para GFP (**Fig. 10**).

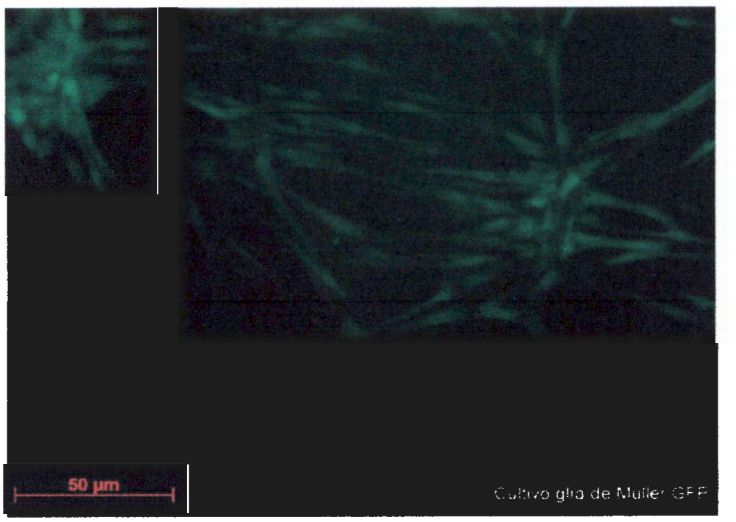


Fig. 10 Cultivo primario de la glía de Müller. Fotomicrografía de las células de Müller GFP^+. Se observan las proyecciones citoplasmáticas de forma fusiforme extendidas en la superficie. Barra de calibración= 50 µm. Aumento original 200X.

Tras obtener el cultivo primario de la glía de Müller, determinamos la pureza del cultivo primario mediante el análisis por inmunofluorescencia de la inmunoreactividad de una proteína específica de las células de Müller, glutamina sintasa (**Fig. 11a**). Coincidiendo con resultados previamente descritos (Ramirez and Lamas, 2009), encontramos que más del 96% de las células expresaban esta proteína. Para corroborar la pureza como cultivo glíal y descartar la presencia de neuronas realizamos una imnunofluorescencia contra el anticuerpo rodopsina (marcador para fotorreceptores). No observamos la presencia del marcaje de rodopsina en el cultivo de Müller (**Fig.11b**). Como control positivo de este experimento marcamos la capa de fotorreceptores con el mismo anticuerpo en un corte de rebanada retinal (**Fig.11c**) en el que observamos la capa de los fotorreceptores (rosa)

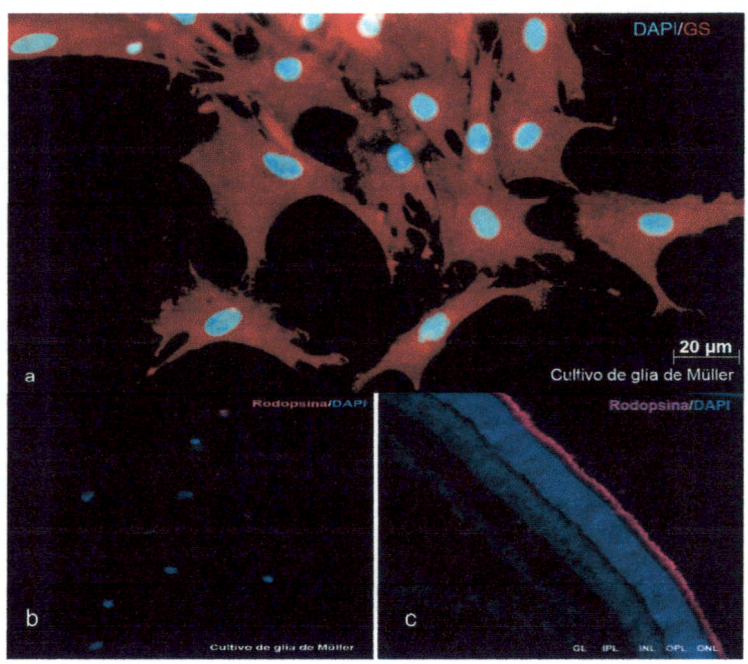


Fig. 11 Fotomicrografía de un cultivo primario de la glía de Müller. (a) La mayoría de las células son inmunopositivas a un marcador específico para la glía de Müller, glutamina sintetasa. Esta tinción que se observa de color rojo en el citoplasma, los núcleos se observan al centro de la glía de color azul. (b) Se muestra una inmunocitoquímica contra el anticuerpo rodopsina y no se

observan células marcadas (ausencia de rojo), en (c) observamos el control positivo de rodopsina (rosa) en un corte de retina. Núcleos teñidos con DAPI (azul). Barra de calibración= 20 µm. Aumento original 200X.

2. Generación *in vitro* de células progenitoras o neuroesferas

A partir del cultivo primario de la glía de Müller en un medio suplementado con factores de crecimiento (FGF y EFG) y libre de suero se obtuvieron neuroesferas primarias. Las neuroesferas o retinoesferas son una población de agregados heterogéneos de células progenitoras neurales generados *in vitro*. El cultivo se mantuvo en medio suplementado favoreciendo así la proliferación de las neuroesferas que, después de 5-6 días de cultivo, adquieren su tamaño máximo, de 100 µm de diámetro aproximadamente (**Fig. 12**).

Después de 6 días de cultivo, las neuroesferas se disociaron mecánicamente con 200 µL de la enzima acutasa y se re-sembraron con medio suplementado para obtener neuroesferas secundarias. Este procedimiento se repitió con el fin generar neuroesferas terciarias y comprobar la capacidad de autorrenovación de las neuroesfera.

En este trabajo usamos neuroesferas del tercer pasaje. Las neuroesferas se caracterizaron mediante el análisis por inmunofluorescencia de la expresión de marcadores de progenitores neurales. Nuestra primera aproximación fue el análisis de la expresión de Sox2. Este factor de transcripción es expresado durante el desarrollo embrionario en las células troncales neuroepiteliales pero existen remanentes de que permanece su expresión activa en las células troncales neuronales multipotentes en la etapa adulta (Brazel et al., 2005). El marcaje de Sox2 se observó en la mayoría de las neuroesferas (**Fig. 12a**). Por otro lado, realizamos una inmunofluorescencia contra el anticuerpo nestina,

marcador característico de células con potencialidad de progenitora neural (**Fig.12a** panel 4). Mediante la microscopía confocal observamos que el marcaje con el anticuerpo se encuentra en el citoesqueleto, dado que nestina es una proteína de filamentos intermedios (**Fig.12b**). Sin embargo, no todas las células de la neuroesfera son positivas a Sox2 ni a nestina. Este resultado subraya el carácter heterogéneo de las neuroesferas que contienen células con diferente potencial progenitor y diferente capacidad de diferenciación.

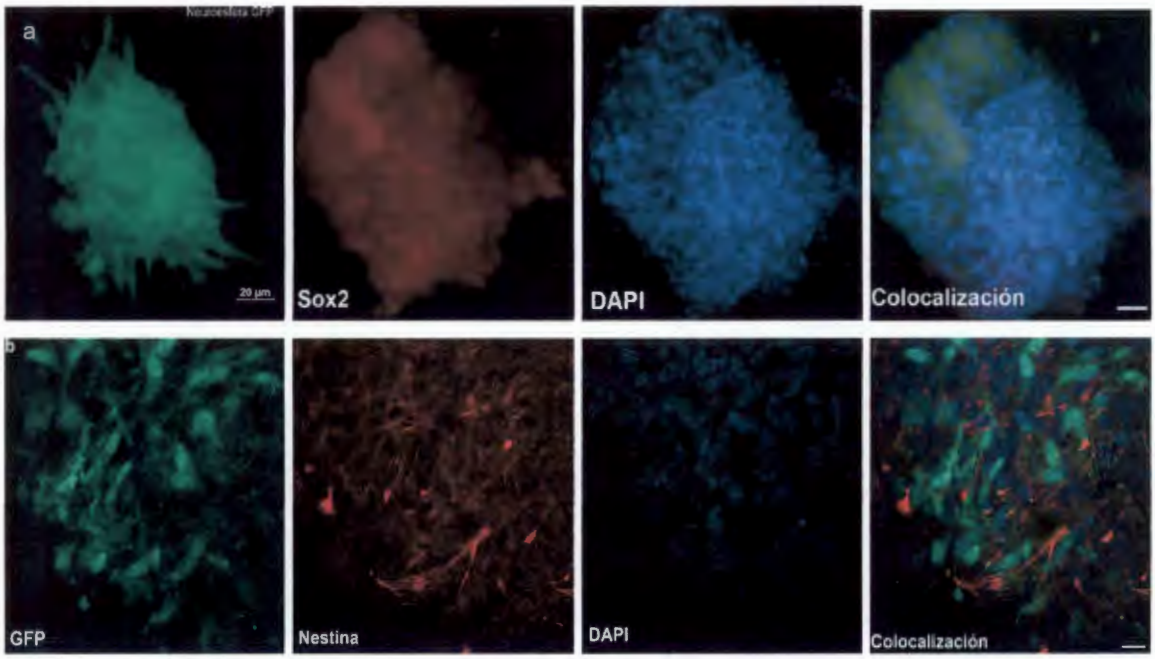


Fig. 12 Cultivo y caracterización de neuroesferas derivada de la glía de Müller GFP$^+$ a) Fotomicrografía representativa de una neuroesfera GFP$^+$ (verde: primer panel); la expresión de Sox2, marcador de células progenitoras neuronales (rojo: segundo panel); la tinción de los núcleos con DAPI (azul; tercer panel) y; la colocalización de la inmunoreactividad de los tres marcadores (cuarto panel). Aumento original 200X. (b) Fotomicrografía representativa de confocal. Apreciamos la expresión de la GFP (verde; primer panel); el marcaje con nestina, marcador de células progenitoras neuronales (rojo: segundo panel); la tinción de los núcleos con DAPI (azul: tercer panel), y; la colocalización de los tres marcajes (cuarto panel). Aumento original 400X. Barra de calibración= 20 µm

3. Modelo de daño retinal causado por NMDA

La sobreestimulación de los receptores NMDA implica apoptosis provocada por excitotoxicidad y la pérdida de los elementos de la capa nuclear interna (INL) de la retina (Chiu et al., 2005) (Lam et al., 1999). Por eso, para optimizar el modelo de daño retinal provocamos una lesión neurotóxica inducida mediante la inyección intraocular con NMDA (250mM).

3.1 Cambios en las capas nucleares inducidos por la inyección de NMDA

Para hacer una primera evaluación de los posibles daños morfológicos, las preparaciones de retina se tiñeron con DAPI y se observaron al microscopio. Una vez infundido el NMDA en el espacio intravítreo observamos 24 horas después un decremento del grosor de la INL (**Fig.13 a**). comparada con la retina control (**Fig.13 b**). Además, es notoria la desintegración de la INL, sugiriendo la pérdida de las células que la integran.

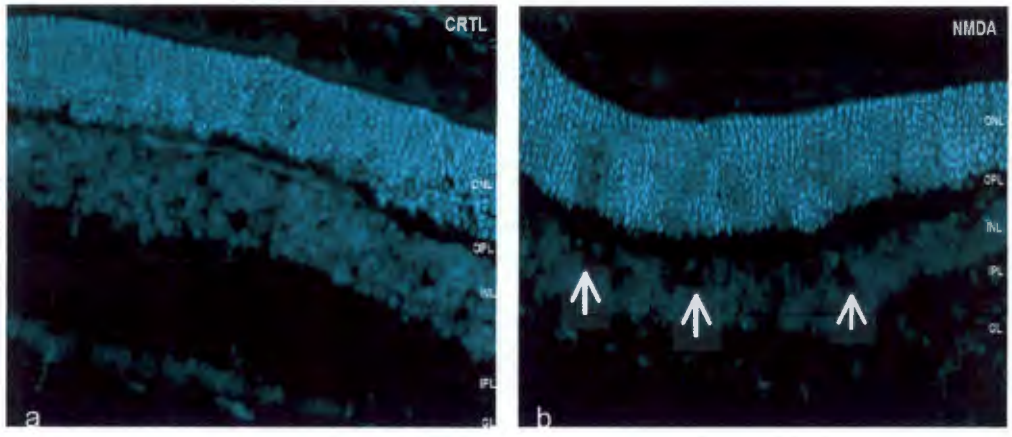


Fig. 13 Caracterización del daño retinal 24 horas después de la inyección intraocular con NMDA (a) Corte retinal de un ojo administrado con solución salina, ojo control. Las capas nucleares se observan sin variaciones. (b) Corte retinal proveniente de un ojo inyectado con NMDA (250mM). En el límite de la INL con la OPL se pierden núcleos (flecha), en la IPL se observan núcleos y un adelgazamiento de la misma. CG Capa de células ganglionares, IPL capa plexiforme interna, INL capa nuclear interna, OPL capa plexiforme externa, ONL capa nuclear externa. Aumento original 200X. Escala de calibración 50 µm.

3.2 Muerte celular

Mediante la técnica de TUNEL evaluamos la presencia de núcleos apoptóticos en la retina un día después de la administración intraocular con NMDA. Observamos en los cortes retinales tratados con NMDA la presencia núcleos apoptóticos localizados a lo largo de las capas retinales (**Fig. 14a**). Sin embargo, cuando se administró solución salina (control) no observamos núcleos en apoptosis (**Fig. 14b**). Para validar nuestros resultados usamos como control positivo una retina tratada con DNAasa, en la que se observan núcleos en su mayoría apoptóticos a los largo de toda la retina (**Fig.14c**).

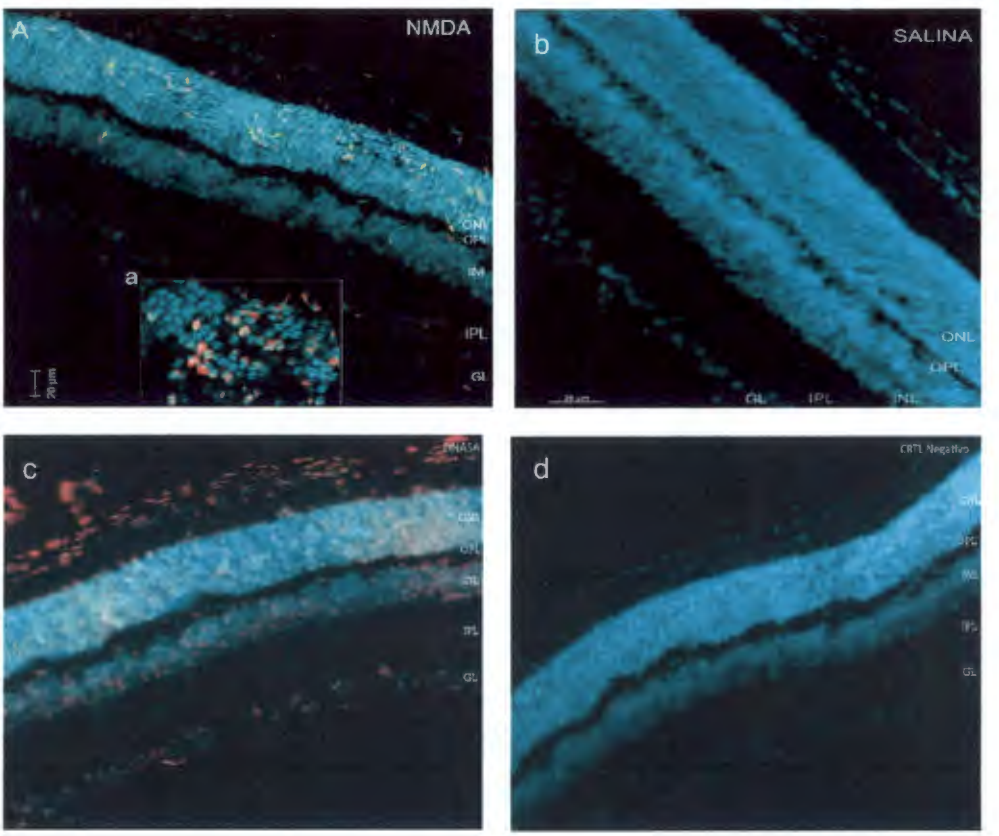


Fig. 14 El tratamiento con NMDA por 24 horas induce apoptosis en la retina. (A) Fotomicrografía representativa de un corte retinal pre inyectado con NMDA. Los núcleos apoptóticos se encuentran de color rojo y señalados con fechas amarillas, (a) ampliación de los núcleos en apoptosis. (b) En el corte retinal control no se observan núcleos apoptóticos. (c) El

corte retinal pre tratado con DNAasa 250 U (control positivo) son notorios la gran cantidad de núcleos apoptóticos a lo largo de la retina. Como control negativo solo se adicionó la solución de etiquetado (d). Aumento original de cada micrografía 200 X. Escala de calibración 20 µm.

3.3 NMDA disminuye el número de células inmunopositivas a calbindina (células horizontales) y rodopsina (fotorreceptores)

La sobreestimulación de los receptores NMDA afecta a la células horizontales de la retina (Chiu et al., 2005). Para corroborar el efecto de daño en dichas células se realizó una inmunofluorescencia para la proteína calbindina, exclusiva de células horizontales. Después de 24 horas de la inyección de NMDA, se observó que disminuye la inmunoreactividad a calbindina (**Fig. 15**).

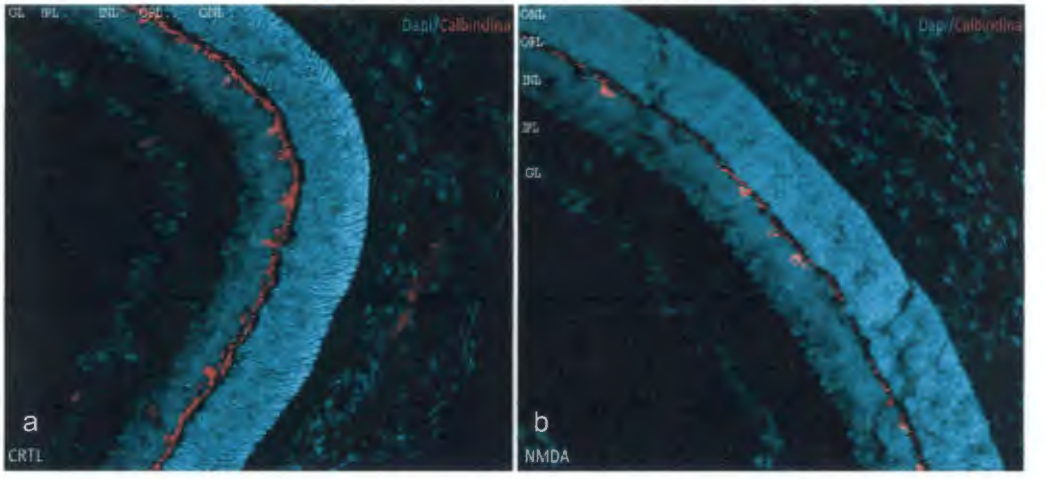


Fig. 15 Cambios en el marcaje de la expresión de la proteína calbindina provocados por NMDA. (a) Corte de retina proveniente de ojo inyectado con solución salina, en la OPL se observa la inmunoreactividad de calbindina, rojo. (b) corte retinal de un ojo inyectado con NMDA; se observa un decaimiento del marcaje de calbindina, rojo. Núcleos teñidos con DAPI, azul. CG Capa de células ganglionares, IPL capa plexiforme interna, INL capa nuclear interna, OPL capa plexiforme externa, ONL capa nuclear externa. Aumento original 200X.

El estado de los fotorreceptores también fue comprobado a las 48 horas después de inducir el daño con NMDA. La inmunofluorescencia correspondiente se realizó

con un anticuerpo anti-rodopsina, marcador específico de bastones. Después de la inyección con NMDA a las 48 horas se observó que disminuye la inmunoreactividad de la capa de los fotorreceptores (zona superior de la ONL) en comparación con la retina inyectada únicamente con solución salina (**Fig.16**).

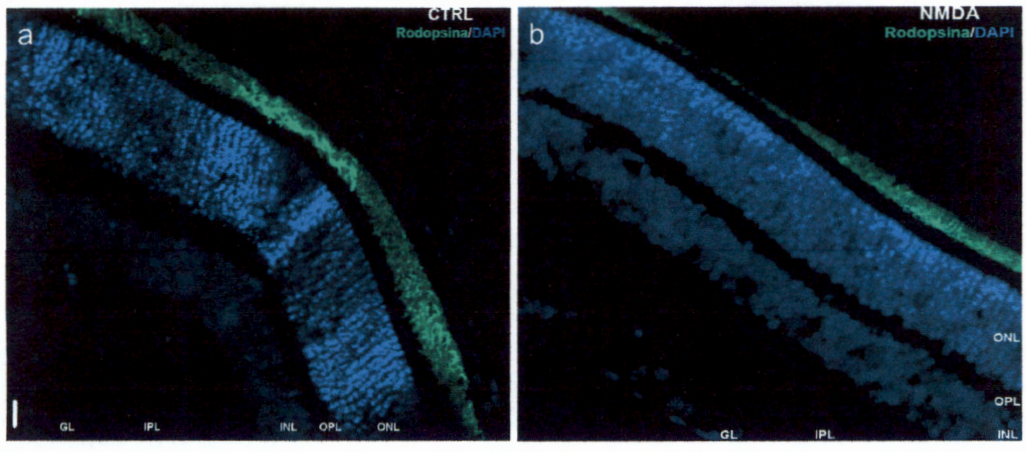


Fig. 16 Fotomicrografía que muestra los cambios en la inmunoreactividad de rodopsina 48 horas después de la inyección de NMDA. (a) Corte de retina sin dañar. La capa de fotorreceptores se observa mediante la inmunoreactividad de rodopsina (verde). (b) Corte de retina dañada con NMDA. El grosor cambia en el marcaje de rodopsina. Núcleos teñidos con DAPI (azul). CG Capa de células ganglionares, IPL capa plexiforme interna, INL capa nuclear interna, OPL capa plexiforme externa, ONL capa nuclear externa. Aumento original 200 X. Escala de calibración 20 µm.

3.4 Gliosis

La proteína acídica fibrilar glial (GFAP) es una proteína del citoesqueleto propia de las células gliales. Su expresión se induce como una respuesta no específica ante un factor o mecanismo patogénico (Bringmann et al., 2006) como parte de una cascada de efectos que, en su conjunto, se denomina gliosis. Para evaluar el proceso de gliosis inducido por la inyección intraocular con NMDA en nuestro modelo, analizamos mediante inmunofluorescencia la inmunoreactividad a GFAP.

En la retina dañada con NMDA se observó que la glía de Müller ha adquirido una prominente inmunoreactividad a GFAP y que los procesos radiales se expanden de la capa de células ganglionares a la capa nuclear interna (**Fig. 17c y d**).. En la retina control la inmunoreactividad de GFAP es selectiva para la capa ganglionar (**Fig. 17a y b**).

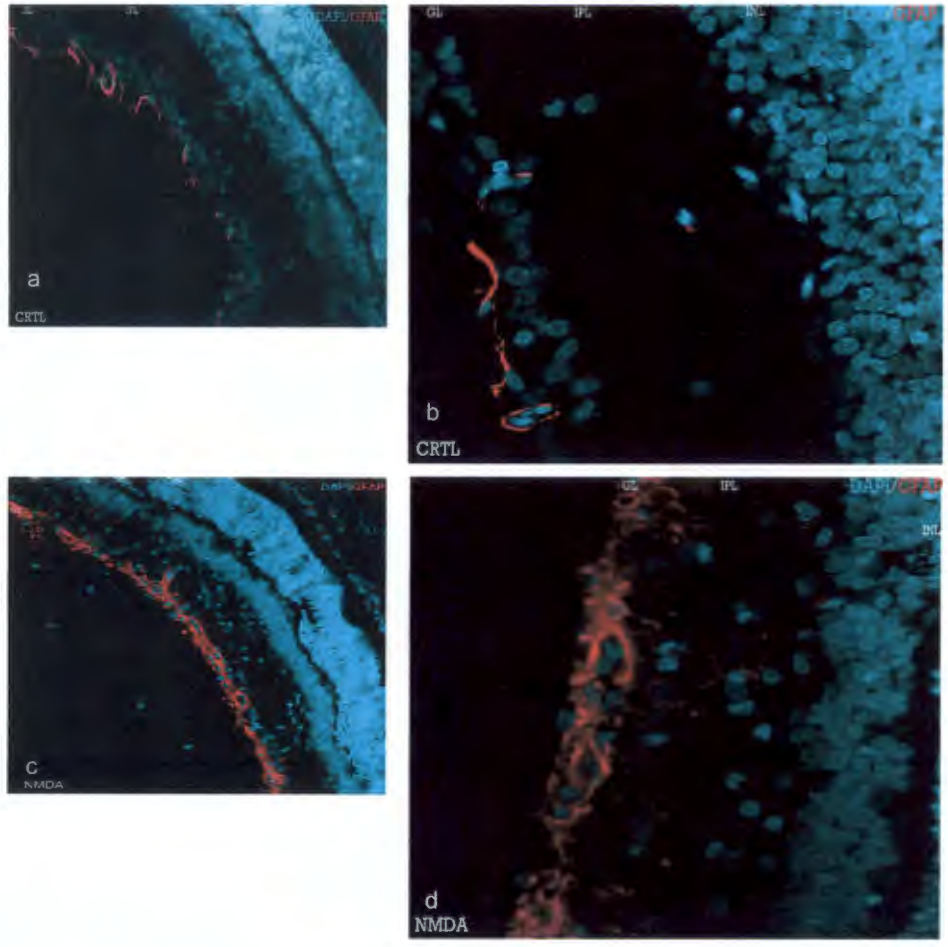


Fig. 17 NMDA induce gliosis en la retina. Como producto de la actividad gliótica en la retina se observa un aumento en la inmunoreactividad de la proteína GFAP, representada en color rojo. (a-b) Corte de retina control (inyección con solución salina). Los astrocitos inmunopositivos a GFAP se muestran específicamente en la GL. (c-d) La inmunoreactividad a GFAP en la glía de Müller se ve incrementada tras la inyección con NMDA 250 mM. Núcleos en azul. CG Capa de células

ganglionares, IPL capa plexiforme interna, INL capa nuclear interna, OPL capa plexiforme externa, ONL capa nuclear externa. A-B aumento original 200X. C-D aumento original 400X.

3.5 Expresión de nestina

Varios estudios han demostrado la capacidad de la glía de Müller para expresar nestina en respuesta a un daño agudo (Yamada et al., 2009, Xue et al., 2006). Mediante una inmunofluorescencia se evaluó la inmunoreactividad de nestina en retina 48 horas después del daño con NMDA. La inmunoreactividad de nestina fue nula en la retina pre inyectada con solución salina (tejido control). Por otro lado, en la retina dañada, la inmunoreactividad de nestina fue localizada en células radiales alargados abarcando la profundidad de la retina (**Fig.18**).

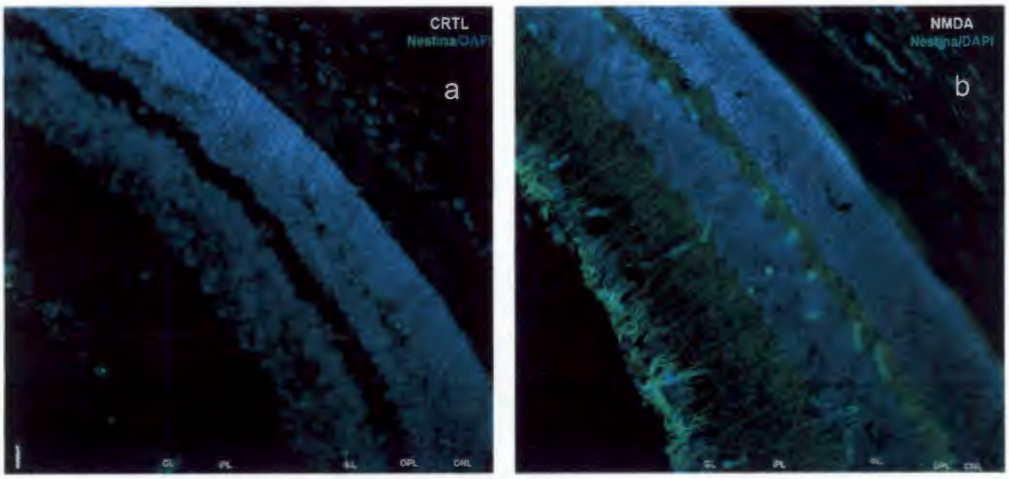


Fig. 18 Expresión de Nestina en retina 48 horas después del daño con NMDA. (a) Corte de retina control. El marcaje de nestina no se observa (verde). (b) Corte de retina dañada. La inmunoreactividad de nestina (verde) se encuentra en las fibras radiales abarcando la capa interna y externa. Núcleos teñidos con DAPI, azul. CG Capa de células ganglionares, IPL capa plexiforme interna, INL capa nuclear interna, OPL capa plexiforme externa, ONL capa nuclear externa. A-B aumento original 200X. C-D aumento original 400X.

4. Trasplante de células progenitoras GFP$^+$ en la retina con daño neurotóxico

Las células progenitoras fueron trasplantadas vía intraocular en las ratas con previo daño retinal ocasionado por el tratamiento con NMDA. Antes de cada trasplante, las células GFP$^+$ disociadas fueron cuantificadas por el ensayo de azul de tripano. 5,000 células provenientes de la disociación mécanica con acutasa de las neuroesferas, se administraron en 3 μl de medio enriquecido con factores de crecimiento y libre de suero (**Fig. 19**).

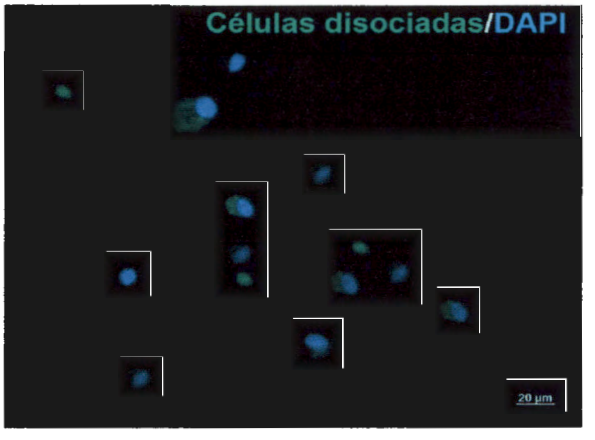


Fig. 19 Fotomicrografía de neuroesferas secundarias disociadas. Las células GFP$^+$ (verde) provenientes de las neuroesferas se observan disociadas. Núcleos teñidos con DAPI (azul). Aumento original 200X. Escala de calibración 20 µm

4.1 Análisis temporal de la incorporación de células trasplantadas

Una vez que corroboramos el efecto de la administración de NMDA 24 y 48 horas, nos propusimos comparar la eficiencia del trasplante de células progenitoras. Con el fin de evaluar la incorporación de las células trasplantadas, se analizó la presencia de células GFP+ en las capas retinales a diferentes tiempos. Estas células se inyectaron en un ojo dañado con NMDA y el segundo se usó como control inyectando solo solución salina (Tabla 2).

Dos y seis días después del trasplante se analizó la localización de las células *in vivo*. Mediante la tinción de las capas nucleares retinales y gracias a la fluorescencia de las neuroesferas derivadas de la glía de Müller, los agregados celulares provenientes de la disociación de las neuroesferas fueron visualizadas. Dichas células GFP^+ se observaron en la retina presentando un mayor tamaño a comparación con su tamaño en cultivo y al tamaño de las otras células retinales. Esto sugiere que células GFP+ se encontraban en forma de agregados celulares (**Fig. 20**).

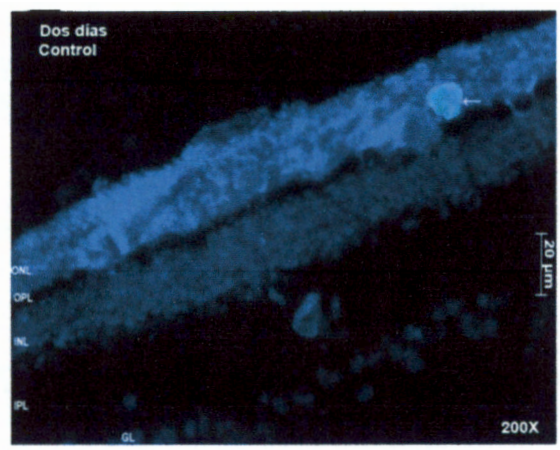


Fig. 20 Fotomicrografía de un corte retinal dos días después de la inyección de células progenitoras en el ojo dañado. Fotomicrografía representativa en la que se observa un agregado celular GFP^+ (verde) proveniente de las células progenitoras cultivadas en medio control. CG Capa de células ganglionares, IPL capa plexiforme interna, INL capa nuclear interna, OPL capa plexiforme externa, ONL capa nuclear externa. Barra de calibración= 20 µm. Aumento original 20X.

Después de 6 días trasplante, se observó un ligero aumento de la cantidad de agregados respecto a los 2 días después del trasplante. Estos agregados celulares se encontraron en diferentes cortes retinales (**Fig. 21**).

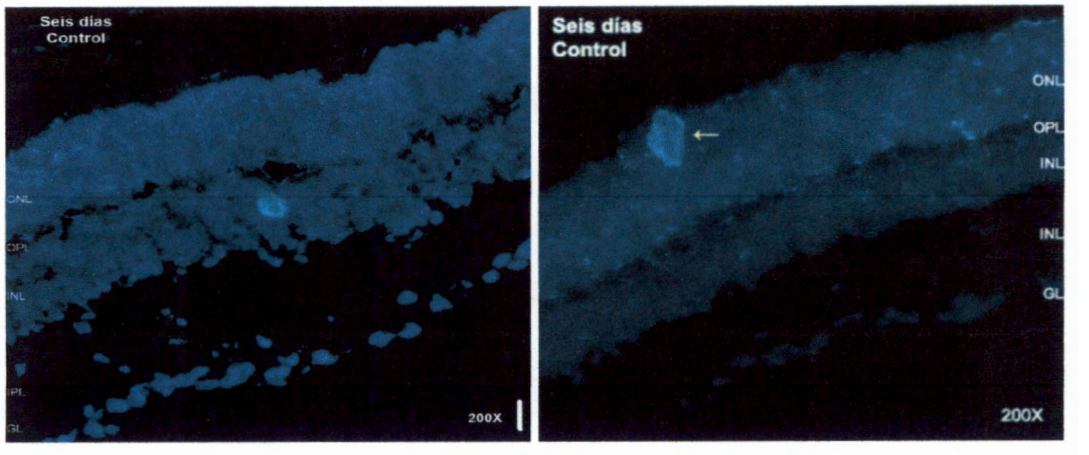


Fig. 21 Microfotografía representativa de la localización de una agregado GFP$^+$ después de 6 días del trasplante vía intraocular. El aglomerado GFP$^+$ (verde) se observa en la capa retinal. CG Capa de células ganglionares, IPL capa plexiforme interna, INL capa nuclear interna, OPL capa plexiforme externa, ONL capa nuclear externa. Barra de calibración= 20 µm. Aumento original 200X.

4.2 Trasplante de células progenitoras GFP$^+$ en la retina no dañada

En un ojo se administraron 2 µl de solución salina y posteriormente se implantaron células progenitoras GFP. Después de 2 y 6 días del trasplante se observó que las células progenitoras GFP$^+$ no invadieron las capas retinales. Algunas células se encontraron en la capa ganglionar pero no fueron estadísticamente significativas. También, la cavidad vítrea y coroides presentaron agregados celulares (**Fig. 22a** panel 1 y 2). Estos datos muestran un número 0.7±0.6 de células progenitoras GFP$^+$ en la retina sin daño neurotóxico.

Por otro lado, como control del trasplante posterior a la inyección con NMDA o solución salina inyectamos medio de cultivo Optimem libre de suero con factores de crecimiento, en ninguno de los cortes retinales observamos células GFP$^+$ **(Fig.22b)**

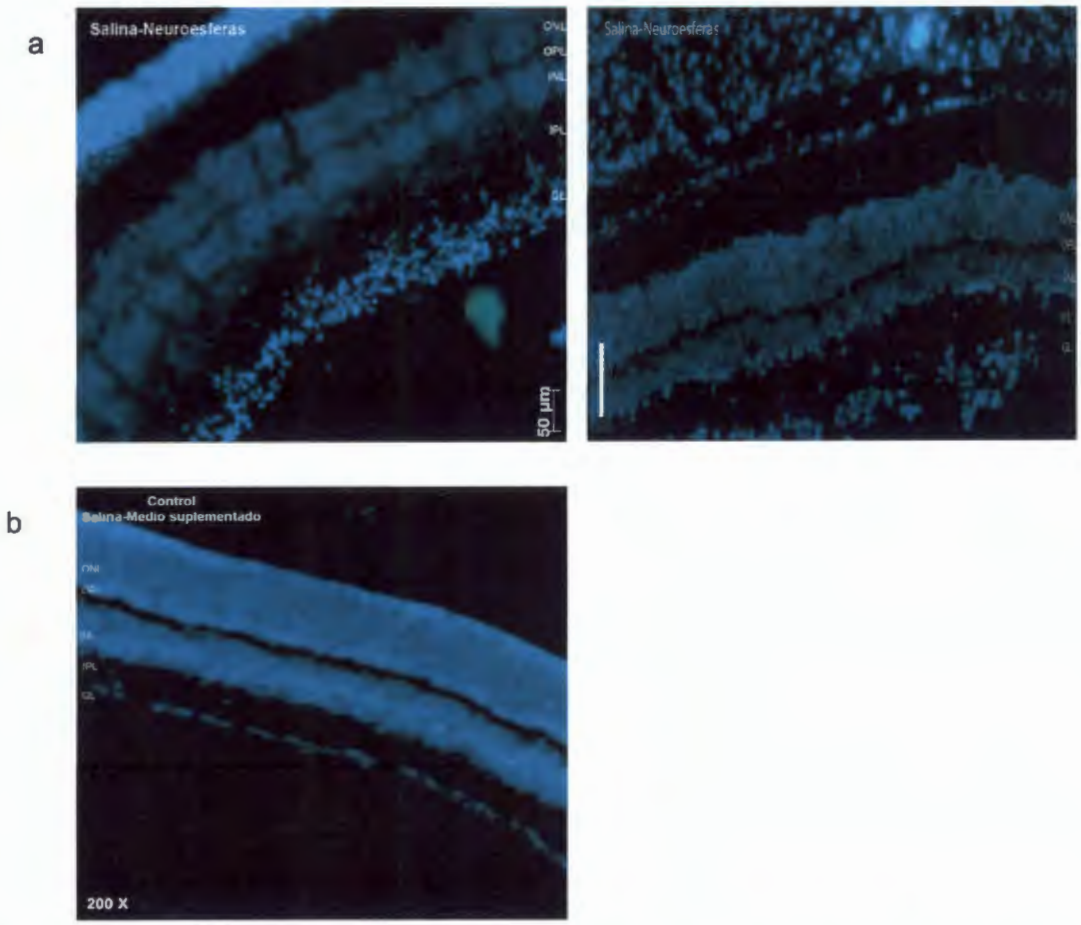


Fig. 22 Trasplante de células progenitoras GFP en la retina sin daño. (a) Cortes representativos de retina control (sin daño) después de la inyección de células GFP^+. En la retina huésped no se observan células; sin embargo se presentan en la periferia. (b) Fotografía representativa del experimento control en el que se inyectó únicamente medio en una retina sin daño. Ninguna célula GFP^+ se observó. Barra de calibración= 20 µm. Aumento original 200X.

4.3 Trasplante de células progenitoras pre tratadas con neurotransmisores: GABA y Glutamato

Un grupo de neuroesferas fueron pretratadas con GABA 100 μM por 24 horas, con el fin de aumentar la capacidad de expresión de marcadores neuronales tempranos, tal como ha sido previamente descrito (Ramirez et al., 2012). Otro grupo de neuroesferas se trató con glutamato 50 μM durante 24 horas, para

favorecer la proliferación celular (Ramirez and Lamas, 2009). Estas neuroesferas fueron inyectadas en ojos pretratados con NMDA.

En la fotomicrografía representativa del trasplante de las células pre tratadas con GABA o glutamato observamos que las células después de la inyección intravítrea formaron agrupaciones GFP^+ en la retina, tal como sucedió en el tratamiento control después de esperar 2 y 6 días. (**Fig. 23**).

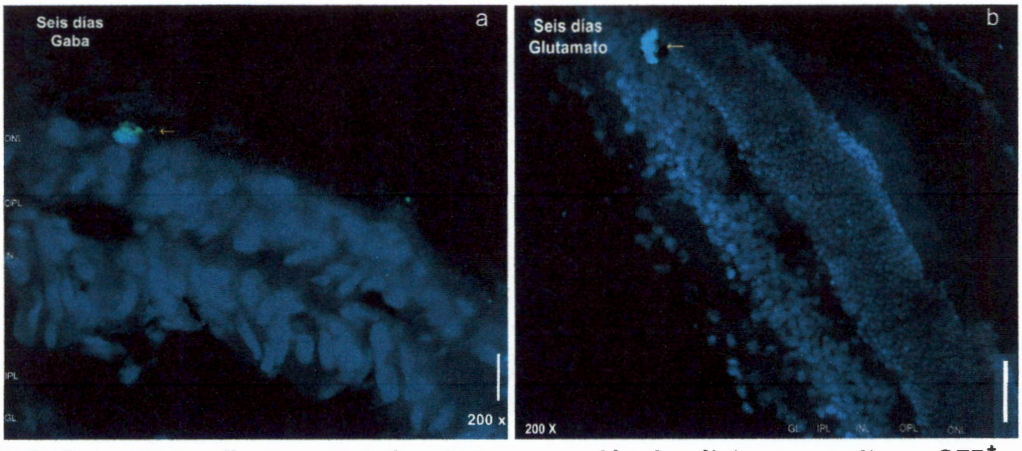


Fig. 23 Fotomicrografía representativa de la agregación de células progenitoras GFP^+ post tratamiento con neurotransmisores. Después de cultivar las neuroesferas con GABA y glutamato, de manera independiente por 24 horas. (a) Observamos un agregado GFP^+ previamente tratado con GABA en la retina. (b) El agregado GFP^+ cultivado con Glutamato se observa en la retina. Núcleos tenidos con DAPI, azul. CG Capa de células ganglionares, IPL capa plexiforme interna, INL capa nuclear interna, OPL capa plexiforme externa, ONL capa nuclear externa. Barra de calibración= 20 µm. Aumento original 200X.

4.4 Cuantificación de células GFP^+ visualizadas en la retina

Para cuantificar el número de agregados celulares presentes en la retina, se obtuvieron 20 rebanadas retinales de 10 µm de grosor. Después de la tinción de los núcleos y gracias a la fluorescencia de las células trasplantadas, se realizaron conteos de las células o agrupaciones celulares GFP^+ de los siguientes tratamientos: medio control, GABA, glutamato y retina sin daño; localizadas en alguna de las capas retinales.

De las células tratadas con GABA hallamos un número mayor de agregados celulares (6.5±1.5) mayor respecto al tratamiento control (3.11±1.2). Con el tratamiento con glutamato se encontraron un número de agrupaciones celulares semejantes al control (3.32±1). Los grupos de retinas sanas con células trasplantadas no mostraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. En todos los grupos lesionados con NMDA y seguidos del trasplante con células progenitoras disociadas bajos los esquemas de: medio control, GABA y glutamato, se observaron un mayor numero de agregados de células, siendo el de GABA el más elevado (**Fig. 24**).

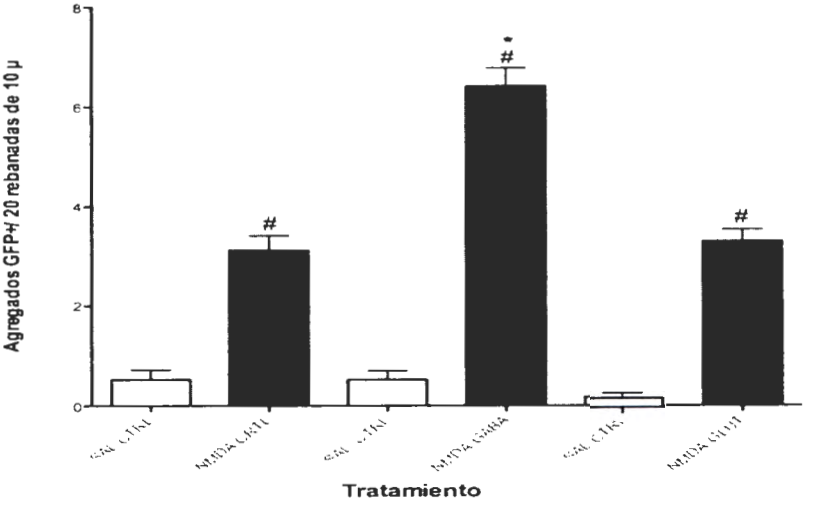


Fig. 24 Gráfico de la cuantificación de agregados positivos a la proteína verde fluorescente dentro de las capas retinales. # = $p<0.05$, señala las diferencias con respecto al grupo control: inyección con solución salina y después células con medio control (sal- control). * = $p<0.05$, indica las diferencias del pre tratamiento con GABA (NMDA-GABA) y con glutamato (NMDA-GLUT). Los tres sufrieron un daño en un ojo por la administración de NMDA. n=15 por grupo.

Estos datos sugieren una mayor eficiencia del trasplante de las células con un previo tratamiento GABAérgico. Por lo que en los siguientes estudios nos enfocamos en células bajo el tratamiento con GABA.

4.5 Las células progenitoras tratadas con GABA proliferan en la retina, a los 6 y 12 días: Expresión de Ki67

La proteína Ki-67, un marcador de proliferación celular, está presente durante todas las fases activas del ciclo celular: G_1, S, G_2 y mitosis; estando ausente en la fase G_0. Para comprobar la capacidad proliferativa de las células disociadas de las neuroesferas trasplantadas en la retina con daño excitotóxico (NMDA), analizamos la expresión de la proteína Ki67 a los 6 y 12 días después del trasplante de células tratadas con GABA. En las siguientes fotomicrografías se observa la expresión de la proteína Ki67 en los aglomerados celulares de las células transplantadas que expresan GFP, ambas agrupaciones se encuentran en la capa nuclear externa (**Fig. 25**).

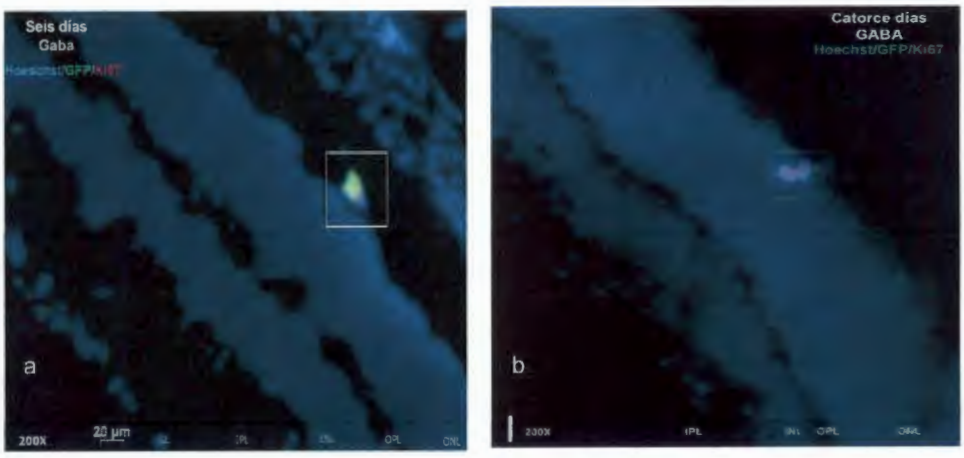


Fig. 25 Expresión de la proteína Ki67, marcador de proliferación. Aglomerado GFP^+ derivado de las neuroesferas disociadas trasplantadas en ojos tratados con NMDA a los (a) 6 días o (b) 12 días después del trasplante. Ambas fotomicrografías se muestra la coexpresión de la proteína Ki67 (rojo) la proteína GFP^+ (verde) y la tinción nuclear con DAPI, azul. CG Capa de células ganglionares, IPL capa plexiforme interna, INL capa nuclear interna, OPL capa plexiforme externa, ONL capa nuclear externa. Barra de calibración= 20 µm. Aumento original 200X.

4.6 Las células progenitoras tratadas con GABA expresan un marcador neuronal temprano (de β-III Tubulina) 12 días después del trasplante

La clase III de la Tubulina β es un elemento de microtúbulos expresado exclusivamente en neuronas, por lo que dicha proteína es un excelente marcador neuronal temprano. Antecedentes en condiciones *in vitro* (Ramirez et al., 2012) demostraron la expresión de la proteína β-III Tubulina en neuroesferas cultivadas con GABA durante 24 horas. Aquí, nosotros comprobamos la expresión de β-III Tubulina en el aglomerado GFP^+ derivado de las neuroesferas, después de 12 días del trasplante en el ojo dañado con NMDA. En la fotomicrografía (**Fig. 26 a**). se observa el aglomerado GFP^+ en la capa nuclear externa de la retina negativo contra el inmunomarcaje de la proteína β-III Tubulina en rojo. Interesantemente en el trasplante de la células GFP^+ pre cultivada con GABA, el aglomerado se observa ubicado al borde de la capa nuclear externa y fue negativo al marcaje de β-III Tubulina (**Fig. 26 b**).

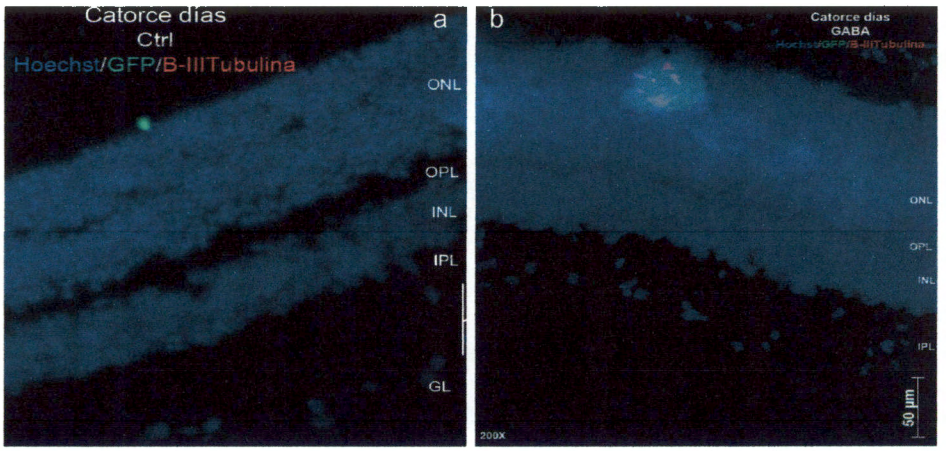


Fig. 26 Expresión de la proteína β-III Tubulina en un agregado GFP^+ tratado con GABA, después de 12 días del trasplante en ojo dañado con NMDA (a) El agregado GFP^+(verde) presenta un marcaje de la proteína β-III Tubulina (rojo). (b), El agregado GFP^+ tratado bajo medio control observado no presenta inmunoreactividad a β-III Tubulina. Los núcleos de ambos cortes

retinales fueron teñidos con Hoeschst, azul. IPL capa plexiforme interna, INL capa nuclear interna, OPL capa plexiforme externa, ONL capa nuclear externa. Barra de calibración= 50 µm. Aumento original 200X.

RESUMEN DE RESULTADOS

Se obtuvo y caracterizó una población de células progenitoras *in vitro* que crecen como neuroesferas derivadas de la glía de Müller bajo un medio suplementado con factores de creimiento con característica progenitora, a partir de la cepa de rata transgénica Sprague-Dawley que expresa constitutivamente la proteína verde fluorescente.

- La inyección intraocular de NMDA 250 mM en 2-4 µl causa apoptosis, gliosis, pérdida de las células horizontales y fotorreceptores en la retina. Además de la expresión de nestina en la retina, indicando que la glía Müller está en un estado de desdiferenciación.
- Al trasplantar 5000 células disociadas provenientes de neuroesferas GFP^+ mediante una inyección en el espacio intravítreo en un ojo antes dañado con NMDA, las neuroesferas GFP^+ forman aglomerados en la retina.
- El pre tratamiento con GABA (100 µM) promueve la visualización de las neuroesferas GFP^+. Despueés de 6 días del trasplante de las neuroesferas GFP^+ en la retina, se indujo la proliferación y diferenciación . Mientras que el pre tratamiento con Glutamato (50 µM) no favoreció la visualización de las neuroesferas GFP^+.
- La retina sin daño es altamente resistente a la entrada de células GFP^+ derivadas de la disociación de neuroesferas.

DISCUSIÓN

Esta tesis constituye una primera aproximación al análisis de la capacidad regenerativa de células progenitoras de la retina postnatal en un modelo de trasplante celular en retina de rata. Nuestros resultados nos han permitido evaluar algunas características relevantes del modelo de trasplante de células progenitoras, la reacción del tejido huésped ante el daño, el proceso temporal de supervivencia, la proliferación y diferenciación de las células trasplantadas y finalmente, el efecto del pre-tratamiento de las células progenitoras con inductores de la proliferación y la diferenciación.

1. El trasplante celular como estrategia terapéutica en la retina: uso de las células progenitoras derivadas de la glía de Müller

En la clínica, el trasplante de células troncales para reparar o regenerar el epitelio corneal humano ha sido exitosamente usado por varios años (Pellegrini et al., 1997). En este caso, la superficie corneal provee un sitio anatómico factible en el cual las células troncales son capaces de implantarse sin usar métodos invasivos. Esto no sucede en tejidos más complejos y menos accesibles como la retina. Sin embargo, la realización de trasplantes retinianos a nivel cerebral, realizados por (McLoon and Lund, 1980) demostraron que el trasplante tenía capacidad de crecimiento axonal con el establecimiento de sinapsis y respuestas fisiológicas. Por lo tanto, es viable sugerir que si el trasplante se realizaba en un sitio cercano a la retina, podría ser posible que las células emplazadas establecieran nuevas conexiones sinápticas y tuvieran capacidad funcional.

Los trasplantes celulares en la retina se realizan con el objetivo de limitar la pérdida patológica de neuronas y para ello, se utilizan dos aproximaciones: el reemplazo de las neuronas perdidas y el trasplante de células capaces de liberar factores tróficos para fortalecer e inducir la sobrevivencia de las neuronas huéspedes. Para ambas aproximaciones la elección del tipo celular para trasplante es crucial.

Se han utilizado, por ejemplo, los precursores de fotorreceptores postmitóticos derivados de retina postnatales. Cuando son trasplantados al espacio subretinal se integran a la capa de fotorreceptores, se diferencian a bastones y establecen conexiones sinápticas con las interneuronas retinales. Además, las células trasplantadas son capaces de formar el camino del circuito visual a la corteza visual reparando la visión (MacLaren et al., 2006) Desafortunadamente, estos hallazgos muestran limitaciones como la baja integración, ya que sólo se visualizan en la retina 35 células de las 200,000 células trasplantadas. Además, aún no se ha identificado el estado ontogénico óptimo de las células donantes para generar las células apropiadas (Pearson et al., 2012).

Una fuente potencial para la regeneración retinal mediante trasplantes es la glía de Müller. Tras una lesión retinal en pollo y pez, las células de Müller se desdiferencian, vuelven a entrar al ciclo celular y forman nuevas neuronas (Fischer and Reh, 2001, Raymond et al., 2006). *In vitro* la glía de Müller prolifera y sobrevive por largos periodos, bajo determinados estímulos, expresa marcadores de células troncales. Por ejemplo, cultivada bajo un microambiente controlado con factores de crecimiento, la glía de Müller es capaz de generar agregados celulares con característica de célula progenitora multipotente (Monnin et al.,

2007) (Liljekvist-Larsson and Johansson, 2005); (Ramirez and Lamas, 2009). En el presente estudio usamos las células progenitoras multipotentes generadas de la glía de Müller como células donantes para el trasplante retinal.

Para cumplir con los objetivos inicialmente planteados para este proyecto, generamos un cultivo de células progenitoras a partir de células de Müller provenientes de una retina que expresaba constitutivamente la proteína verde fluorescente (GFP). Estas células crecen en forma de agregados o retinoesferas, similares a las neuroesferas descritas para células troncales neurales del hipocampo. Mediante análisis de inmunofluorescencia se mostró que las células que forman a las neuroesferas expresan Nestina y Sox2 (**Fig. 12**), marcadores asociados con células progenitoras neuronales en la división y en el mantenimiento de la neurogénesis en el sistema nervioso central (Brazel et al., 2005). El ensayo de neuroesferas se usa frecuentemente como un método para separar y propagar células progenitoras neuronales. El uso de factores de crecimiento, como EGF y FGF, permite la diferenciación controlada de estas células (Monnin et al., 2007).

2. Modelo experimental de daño retinal

2.1 Características del trasplante mediante inyección intravítrea

El modelo de trasplante mediante una inyección en el espacio intravítreo ha sido ampliamente usado en otros estudios (Chiu et al., 2005) (Lam et al., 1999) (Ramirez and Lamas, 2009). La inyección ha demostrado ser útil para el establecimiento del modelo experimental de daño mediante agentes neurotóxicos y para la introducción de células. Entre las ventajas que presenta se sabe que una

correcta inyección no afecta la estructura retinal, se evita la hemorragia y se reduce el riesgo de infección en el animal inyectado. Además si no se tiene contacto con el cristalino la aparición de cataratas es nula (Chiu et al., 2007). Para nuestro desarrollo experimental fue primordial el hecho de poder realizar una segunda inyección después de un tiempo corto mientras que después de una inyección en el espacio subretinal el tiempo ideal de espera para una segunda administración es de 30 días (Wert et al., 2012).

Para establecer el modelo de daño retinal empleamos la inyección intravítrea de NMDA 250 mM. El daño provocado por el NMDA es debido a la excitotoxicidad, que es un mecanismo que promueve la muerte celular mediante la sobreactivación de los receptores glutamatérgicos NMDA. Provoca la entrada excesiva de Ca^{2+}a las células, este desequilibrio de homeostasis de Ca^{2+} se debe a la saturación de los mecanismos de regulación como la bomba de Ca^{2+}, al intercambio de Na^{+}/Ca^{2+}y a las proteínas amortiguaras de Ca^{2+}. Al saturarse estos sistemas, la mitocondria captura el exceso de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial. Después, se induce la despolarización de la membrana mitocondrial, se produce un abatimiento parcial del potencial quimiosmótico por la acumulación de cargas positivas en la matriz mitocondrial y por una sobrecarga ocurre una despolarización irreversible por la activación del poro de transición mitocondrial. El colapso del potencial quimiosmótico reduce la síntesis de ATP (trifosfato de adenosina), la disfunción metabólica, la producción de radicales libres, la activación de proteasas, fosfolipasas, óxido nítrico sintasa y endonucleasas, y la inhibición de síntesis de proteínas (Wang and Qin, 2010).

Un día después de la inyección observamos muerte celular por apoptosis, coincidiendo con otros reportes (Lam et al., 1999) (Fischer and Reh, 2001). Además, nuestros estudios inmunohistoquímicos utilizando un anticuerpo que reconoce a la proteína de unión a Ca^{2+}, calbindina, mostraron cambios estructurales en las capas internas de la retina. Detectamos una disminución significativa en la población de células positivas a calbindina (marcador de células horizontales) en los ojos tratados con NMDA comparados con los controles que fueron inyectados con solución salina. Este resultado concuerda con estudios previos que sugieren que las células horizontales poseen sensibilidad al NMDA (Chiu et al., 2005, Honjo et al., 2000).

La retina dañada además de presentar muerte por apoptosis, desencadena una ligera reactividad glial conocida como ¨gliosis¨ que se hace evidente por la alta inmunoreactividad de GFAP y nestina (**Fig. 16 y Fig. 17**).

2.2 Reactividad glial: Un posible obstáculo para la integración de las células inyectadas en la retina dañada

En la retina, la función de la gliosis, en las primeras etapas después de la lesión, es proteger de un daño mayor al liberar factores neurotróficos y antioxidantes (Bringmann et al., 2006). Por otro lado, la reactividad gliótica tiene también un papel como inhibidor de la supervivencia, migración, extensión de neuritas y formación de sinapsis de las células trasplantadas en el sistema nervioso central (Pekny et al., 2007). Por lo tanto, el mismo acto de inyectar células en la retina podría constituir un impedimento para un exitoso trasplante (Kinouchi et al., 2003). Es importante considerar que el tejido dañado al intentar repararse sufre cambios inflamatorios, como la sobre-expresión de la proteína GFAP (**Fig. 17**), los cuales

limitan la integración funcional de las células progenitoras inyectadas. De hecho, la reactividad glial representa un importante obstáculo en el trasplante porque las células gliales retinales: astrocitos y glía de Müller, constituyen una barrera entre la retina huésped y las células trasplantadas. Esta noción fue apoyada por experimentos realizados en un ratón doble knockout GFAP/vimentina. GFAP y vimentina forman los filamentos intermedios en astrocitos y Müller. En el ratón carente de GFAP y vimentina se presenta una reducción de la reactividad glial en la retina dañada, siendo más receptiva a las células progenitoras trasplantadas en comparación a los animales control (Kinouchi et al., 2003)

En nuestro análisis del modelo experimental de daño con NMDA indica que, en efecto, se produce un aumento de la inmunoreactividad a GFAP localizado en la capa de células ganglionares y en el espacio plexiforme interno de la retina. Según lo expuesto anteriormente, esto podría afectar la capacidad de integración en la retina de las células trasplantadas.

Otros reportes sugieren que tanto la microglía como la producción de un tipo de proteoglicano específico, el condroitín sulfato, inhiben la migración e integración de las células inyectadas (Kinouchi et al., 2003) (Jones et al., 2003) (Uhlin-Hansen and Kolset, 1988) y se ha encontrado que en la retina distrófica existe una alta acumulación de estos proteoglicanos. Se ha sugerido que la liberación de condroitín sulfato es uno de los mecanismos por el cual se inhibe la migración de las células en la retina. La respuesta de la microglía puede ser reducida por una combinación de inmunosupresores: indometacina, prednisolona, ciclosporina y azatioprina (Lawrence et al., 2007, Bull et al., 2008). Sin embargo hay antecedentes que afirman que a pesar de la reducción existen remanentes donde

existe una mayor acumulación de condroitín sulfato indicando que no es suficiente la inmunosupresión para promover la migración de las células administradas (Bull et al., 2008). De hecho, en años recientes se ha podido demostrar la capacidad de sobrevivencia de células trasplantadas en humanos (Francis et al., 2009) y roedores (Hambright et al., 2012) no inmusuprimidos. Esto, aunado al hecho de que existen riesgos asociados al uso de inmunosupresores, tales como la reducción en la vida del animal inmunocomprometido y un aumento de la actividad tumorigénica (Bull et al., 2008), justificó nuestra decisión de no aplicar inmunosupresores durante el procedimiento.

Sería interesante, como perspectiva de este trabajo, analizar la expresión de condroitín sulfato en el modelo de daño retina utilizado y analizar la participación de la microglía en el proceso gliótico.

2.3 Otras consecuencias del proceso de daño celular: Inducción de la expresión de nestina

Después de la administración intraocular de NMDA observamos la expresión de nestina, la cual es un marcador de daño tanto en retina como en otros tejidos aún más sensible que la expresión de GFAP (Xue et al., 2006, Yamada et al., 2009)

La nestina es una proteína liberada de filamentos intermedios evidentemente expresada en células progenitoras. Recientes hallazgos muestran la expresión de nestina en la glía de Müller bajo el proceso de desdiferenciación. La glía de Müller inmunopositiva a Nestina representa una población de células progenitoras en estado de desdiferenciación, ocasionada por daño tóxico o lumínico (Xue et al., 2010, Xue et al., 2006, Valamanesh et al., 2013)

2.4 Análisis de la sobrevivencia de las células progenitoras derivadas de la glía de Müller en el modelo de trasplante retinal

2.4.1 Retina intacta versus retina dañada

Conforme a nuestros resultados (**Fig. 22**), se comprobó la alta resistencia a la entrada de células inyectadas en la retina no dañada. Esto coincide con otros estudios (Takahashi et al., 1998) (Kurimoto et al., 2001) (Chacko et al., 2003) en los que concluyen que para una exitosa integración y migración de las células trasplantadas es necesario realizar el trasplante en una retina con daño agudo. La razón por la cual el daño permitiría una mayor integración o sobrevivencia de las células trasplantadas aún no está esclarecida pero entre los posibles hechos están:

1. La acción de factores tróficos, quimosinas, citocinas producidos durante el daño que promueven la sobrevivencia y migración de las células trasplantadas. Un ejemplo de ello es la producción de la quimosina, el factor derivado del estroma 1, producida por las células gliales, durante el proceso de gliosis reactiva, que define la migración de las células trasplantadas después de un daño isquémico retinal (Shyu et al., 2008)

2. Alteraciones de la barrera hemato-retiniana tras una lesión retinal que facilitan la entrada de las células trasplantadas. En condiciones fisiológicas la función de la barrera hemato-retiniana es el paso selectivo de sustancias a la retina gracias a la presencia de las uniones estrechas entre las células endoteliales (Kurimoto et al., 2001) .

3. Abatimiento de otra barrera natural de la retina: la membrana limitante interna, localizada en la parte superior de la capa de fotorreceptores. En condiciones

fisiológicas esta membrana separa las capas internas de la retina y evita la invasión de células extrañas. Sin embargo tras un daño la membrana es abatida (Kurimoto et al., 2001)

2.4.2 Formación de agregados celulares GFP$^+$

Después de trasplantar las células GFP$^+$ derivadas de neuroesferas retinales, esperamos 2, 6 y 14 días para analizar la visualización de estas células. En el análisis de todos los tiempos, como se presenta (**Fig. 21, Fig. 22 y Fig. 26**) observamos la formación de agregados celulares GFP$^+$, coincidiendo con reportes previos (Wu et al., 2002, Kinouchi et al., 2003). La formación de estas agrupaciones sugiere que las células tienden a volver a un estado aglomerado tal como sucede *in vitro*, donde las células se unen por fibras de colágeno, laminina y fibronectina, proteínas de la matriz extracelular con el objetivo de una crear una neuroesfera (Kearns et al., 2003). Las proteínas de la matriz extracelular, proveen un ambiente permisivo para el crecimiento, diferenciación y migración de las neuroesferas en cultivo (Silva et al., 2009).

La formación de aglomerados permite compartir nutrientes ya que las células de la periferia de la neuroesferas, al tener mayor accesibilidad al oxígeno y nutrientes del ambiente, pueden proveer a las del centro (Bez et al., 2003). Por otra parte, recientes estudios que señalan que al incrementarse la frecuencia de las interacciones célula-célula en una neuroesfera, la vía de señalización Notch es activada (Mori et al., 2006); siendo Notch elemental en la proliferación celular en etapas embrionarias (Wang et al., 2009).

Quedaría por determinar si a tiempos más largos de trasplante, las células que comienzan a diferenciarse pueden escapar de la neuroesfera, migrar e integrarse

como células aisladas. En caso contrario, sería necesario explorar protocolos experimentales para reducir la tendencia de las células a formar agregados, que pudieran incluir el tratamiento previo con proteasas.

2.4.3 Efecto del pre-tratamiento de las células progenitoras con inductores de proliferación y diferenciación neuronal

Nuestro laboratorio describió recientemente que el glutamato actúa como inductor de la proliferación de las neuroesferas derivadas de la glía de Müller (Ramirez and Lamas, 2009) y que el tratamiento con GABA induce la expresión de los marcadores neuronales tempranos β-III Tubulina y NeuroD . En este estudio, incubamos con glutamato, a dosis subtóxicas, las neuroesferas durante 24 horas antes del trasplante. Los resultados no mostraron un aumento de la eficiencia del trasplante tras este tratamiento (**Fig. 24**). Esto representa una discrepancia con otros reportes que atribuyen al glutamato la capacidad para inducir desdiferenciación de la glía de Müller, migración y generación de nuevas neuronas, tanto in vivo como *in vitro* (Takeda et al., 2008) (Reyes-Aguirre et al., 2013) y a la inducción, en cultivo, de la fosforilación de CREB, factor de transcripción implicado en la proliferación, sobrevivencia y diferenciación de nuevas neuronas (Ramirez and Lamas, 2009).

Sin embargo, el pre tratamiento con GABA induce una mayor eficiencia del trasplante de células con característica de progenitores, además de la expresión de Ki67, marcador de proliferación y β-III Tubulina, marcador neuronal temprano (**Fig. 25 y Fig. 26**).

Nuestros resultados podrían sugerir que, en un modelo experimental de trasplante intravítreo, el aumento del número de células a trasplantar o la inducción de su capacidad proliferativa no son fundamentales para un trasplante exitoso. Sin embargo, si es beneficioso estimular a la células progenitoras en cultivo para la expresión de genes proneurales con el fin de dirigirlas a un fenotipo determinado.

Posiblemente la señal GABAérgica que promueve la diferenciación de las células trasplantadas permite una mayor sobrevivencia en la retina. Recordemos que la señalización del receptor $GABA_A$ está involucrada en una variedad de procesos de proliferación y migración celular, crecimiento axonal y dentrítico, formación de sinapsis y plasticidad durante las etapas embrionarias (Vicini, 2008).

Nuestro resultado es apoyado por hallazgos que confirman que en precursores neuronales derivados de la zona subgranular del hipocampo de ratón, GABA causa la despolarización de dichos precursores afectando la migración y diferenciación neuronal (Salazar et al., 2008).

También, nos respaldan estudios enfocados en la activación del receptor $GABA_A$ *ex vivo,* en los cuales después de 28 días de tratamiento se presenta un incremento en el número de células positivas a Ki67 y BrdU. Ante la señal GABAérgica, las células progenitoras sufren una despolarización, por la alta concentración de Cl^-, se incrernenta el Ca^{2+}y se induce la expresión de marcadores neuronales tempranos (Tozuka et al., 2005) siendo esto parte fundamental del proceso de diferenciación neuronal.

En nuestro protocolo experimental, las células son capaces de expresar β-III Tubulina después de 2 semanas del trasplante, coincidiendo con otros estudios enfocados en el trasplante de células derivadas de la glía de Müller (Lawrence et

al., 2007) (Bull et al., 2008) (Liljekvist-Larsson and Johansson, 2005). Esta proteína es el mayor componente de los microtúbulos, los cuales son un componente estructural del citoesqueleto comprometido al mantenimiento de las estructuras celulares, mitosis y transporte intracelular en neuronas (Lee et al., 1990) y está involucrada en la diferenciación de los tipos celulares neuronales (Guo et al., 2010).

En este trabajo, utilizamos β-III Tubulina como un solo marcador para determinar la especificidad neuronal en el análisis de las células inyectadas, lo cual provee una perspectiva limitada acerca del destino final de estas células. Sin embargo, estudios de nuestro laboratorio realizados con células aisladas de las neuroesferas en cultivo y pre-tratadas con GABA, demuestran que el marcador de fotorreceptores Crx (gen homeobox cono-bastón=, puede expresarse 10 días después de la expresión de β-III Tubulina (Reyes-Aguirre et al., 2013). Estos resultados confirman la capacidad de las células de Müller de diferenciación neuronal hacía linajes neuronales retinales más tardíos, como fotorreceptores. Sería por lo tanto relevante, como perspectiva de este trabajo, analizar la expresión de marcadores tardíos de células diferenciadas a tiempos más largos.

CONCLUSIÓN

- La lesión retinal favorece la migración de un trasplante de células progenitoras derivadas de la glía de Müller.

- En un modelo experimental de trasplante intravítreo de células progenitoras derivadas de la glía de Müller, la inducción de la capacidad proliferativa de las células mediante el pre-tratamiento con glutamato no induce un aumento de la sobrevivencia del trasplante.

- Sin embargo, la estimulación de las células progenitoras en cultivo con GABA para la expresión de genes proneurales con el fin de dirigirlas a un fenotipo determinado, induce un aumento de la sobrevivencia del trasplante y la expresión de un marcador neuronal temprano en las células trasplantadas.

PERSPECTIVAS

El presente estudio se enfocó en determinar la eficiencia del trasplante vía intraocular de células disociadas provenientes de neuroesferas bajo el tratamiento con GABA o glutamato. De acuerdo a nuestros resultados sugerimos analizar los siguientes parámetros en investigaciones futuras:

- Probar si la inyección en el espacio subretinal favorece la visualización de las células en la retina dañada.

- Analizar si al inhibir los proteoglicanos de condrotín sulfato se promueve la visualización de las células en la retina.

- Analizar el destino celular de las células trasplantadas a tiempos más largos.

- Comprobar si la inyección intraocular de GABA en el ojo dañado activa la capacidad regenerativa de la glía de Müller

BIBLIOGRAFÍA

AHMAD, S., KOLLI, S., LAKO, M., FIGUEIREDO, F. & DANIELS, J. T. 2010. Stem cell therapies for ocular surface disease. *Drug Discovery Today,* 15, 306-313.

ANDERSON-HAAG, T. 2013. Immunotherapy in Transplantation: Principles and Practice. *Ann Pharmacother.*

BASSETT, E. A. & WALLACE, V. A. 2012. Cell fate determination in the vertebrate retina. *Trends Neurosci,* 35, 565-73.

BERNARDOS, R. L., BARTHEL, L. K., MEYERS, J. R. & RAYMOND, P. A. 2007. Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Muller glia that function as retinal stem cells. *J Neurosci,* 27, 7028-40.

BEZ, A., CORSINI, E., CURTI, D., BIGGIOGERA, M., COLOMBO, A., NICOSIA, R. F., PAGANO, S. F. & PARATI, E. A. 2003. Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization. *Brain Res,* 993, 18-29.

BORDEY, A. 2006. Adult neurogenesis: basic concepts of signaling. *Cell Cycle,* 5, 722-8.

BRAZEL, C. Y., LIMKE, T. L., OSBORNE, J. K., MIURA, T., CAI, J., PEVNY, L. & RAO, M. S. 2005. Sox2 expression defines a heterogeneous population of neurosphere-forming cells in the adult murine brain. *Aging Cell,* 4, 197-207.

BRINGMANN, A., PANNICKE, T., GROSCHE, J., FRANCKE, M., WIEDEMANN, P., SKATCHKOV, S. N., OSBORNE, N. N. & REICHENBACH, A. 2006. Muller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res.* England.

BULL, N. D., LIMB, G. A. & MARTIN, K. R. 2008. Human Muller stem cell (MIO-M1) transplantation in a rat model of glaucoma: survival, differentiation, and integration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* United States.

CARLSON, B. 2000. Segmentación e implantación en Embriología humana y biología del desarrollo, España, Harcourt.

CHACKO, D. M., DAS, A. V., ZHAO, X., JAMES, J., BHATTACHARYA, S. & AHMAD, I. 2003. Transplantation of ocular stem cells: the role of injury in incorporation and differentiation of grafted cells in the retina. *Vision Res,* 43, 937-46.

CHAMBERS, I. & SMITH, A. 2004. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene.* England.

CHIU, K., CHANG, R. C. & SO, K. 2007. Intravitreous Injection for Establishing Ocular Diseases Model. *Journal Visual Experiment.*

CHIU, K., LAM, T. T., YING LI, W. W., CAPRIOLI, J. & KWONG KWONG, J. M. 2005. Calpain and N-methyl-d-aspartate (NMDA)-induced excitotoxicity in rat retinas. *Brain Res,* 1046, 207-15.

DEL RIO-TSONIS, K. & TSONIS, P. A. 2003. Eye regeneration at the molecular age. *Dev Dyn,* 226, 211-24.

DYER, M. A. & CEPKO, C. L. 2000. Control of Muller glial cell proliferation and activation following retinal injury. *Nat Neurosci,* 3, 873-80.

FANG, I. M., YANG, C. M., YANG, C. H., CHIOU, S. H. & CHEN, M. S. 2013. Transplantation of induced pluripotent stem cells without C-Myc attenuates retinal ischemia and reperfusion injury in rats. *Exp Eye Res,* 113, 49-59.

FISCHER, A. J., MCGUIRE, C. R., DIERKS, B. D. & REH, T. A. 2002. Insulin and fibroblast growth factor 2 activate a neurogenic program in Muller glia of the chicken retina. *J Neurosci,* 22, 9387-98.

FISCHER, A. J. & REH, T. A. 2001. Muller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nat Neurosci.* United States.

FISCHER, A. J. & REH, T. A. 2003. Growth factors induce neurogenesis in the ciliary body. *Dev Biol,* 259, 225-40.

FRANCIS, P. J., WANG, S., ZHANG, Y., BROWN, A., HWANG, T., MCFARLAND, T. J., JEFFREY, B. G., LU, B., WRIGHT, L., APPUKUTTAN, B., WILSON, D. J., STOUT, J. T., NEURINGER, M., GAMM, D. M. & LUND, R. D. 2009. Subretinal transplantation of forebrain progenitor cells in nonhuman primates: survival and intact retinal function. *Invest Ophthalmol Vis Sci,* 50, 3425-31.

GAMM, D. M., WANG, S., LU, B., GIRMAN, S., HOLMES, T., BISCHOFF, N., SHEARER, R. L., SAUVE, Y., CAPOWSKI, E., SVENDSEN, C. N. & LUND, R. D. 2007. Protection of visual functions by human neural progenitors in a rat model of retinal disease. *PLoS One,* 2, e338.

GUO, J., WALSS-BASS, C. & LUDUENA, R. F. 2010. The beta isotypes of tubulin in neuronal differentiation. *Cytoskeleton (Hoboken),* 67, 431-41.

GUO, Y., SALOUPIS, P., SHAW, S. J., STEPHANO, P., MAHONEY, M. J. & RICKMAN, D. W. 2003. Neural progenitor cell transplant in optic nerve neuropathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science,* 44, U279-U279.

HAMBRIGHT, D., PARK, K. Y., BROOKS, M., MCKAY, R., SWAROOP, A. & NASONKIN, I. O. 2012. Long-term survival and differentiation of retinal neurons derived from human embryonic stem cell lines in un-immunosuppressed mouse retina. *Mol Vis,* 18, 920-36.

HICKS, D. & COURTOIS, Y. 1990. The growth and behaviour of rat retinal Muller cells in vitro. 1. An improved method for isolation and culture. *Exp Eye Res,* 51, 119-29.

HIRAMI, Y., OSAKADA, F., TAKAHASHI, K., OKITA, K., YAMANAKA, S., IKEDA, H., YOSHIMURA, N. & TAKAHASHI, M. 2009. Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells. *Neuroscience Letters,* 458, 126-131.

HONJO, M., TANIHARA, H., KIDO, N., INATANI, M., OKAZAKI, K. & HONDA, Y. 2000. Expression of ciliary neurotrophic factor activated by retinal Muller cells in eyes with NMDA- and kainic acid-induced neuronal death. *Invest Ophthalmol Vis Sci,* 41, 552-60.

HOSOYA, K. & TACHIKAWA, M. 2009. Inner blood-retinal barrier transporters: role of retinal drug delivery. *Pharm Res,* 26, 2055-65.

JOE, A. W. & GREGORY-EVANS, K. 2010. Mesenchymal Stem Cells and Potential Applications in Treating Ocular Disease. *Current Eye Research,* 35, 941-952.

JOHNS, P. R. & FERNALD, R. D. 1981. Genesis of rods in teleost fish retina. *Nature,* 293, 141-2.

JONES, L. L., SAJED, D. & TUSZYNSKI, M. H. 2003. Axonal regeneration through regions of chondroitin sulfate proteoglycan deposition after spinal cord injury: a balance of permissiveness and inhibition. *J Neurosci,* 23, 9276-88.

KARL, M. O., HAYES, S., NELSON, B. R., TAN, K., BUCKINGHAM, B. & REH, T. A. 2008. Stimulation of neural regeneration in the mouse retina. *Proc Natl Acad Sci U S A.* United States.

KARL, M. O. & REH, T. A. 2010. Regenerative medicine for retinal diseases: activating endogenous repair mechanisms. *Trends Mol Med,* 16, 193-202.

KAUFMAN, P. & ALM, A. 2004. *Fisiología cel ojo, aplicación clínica,* España.

KEARNS, S. M., LAYWELL, E. D., KUKEKOV, V. K. & STEINDLER, D. A. 2003. Extracellular matrix effects on neurosphere cell motility. *Exp Neurol,* 182, 240-4.

KINOUCHI, R., TAKEDA, M., YANG, L., WILHELMSSON, U., LUNDKVIST, A., PEKNY, M. & CHEN, D. F. 2003. Robust neural integration from retinal transplants in mice deficient in GFAP and vimentin. *Nat Neurosci,* 6, 863-8.

KIRSCHTEIN, R. & SKIRBOLL, L. 2001. Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions. *In:* SERVICES, D. O. H. A. H. (ed.). Terese Winslow.

KURIMOTO, Y., SHIBUKI, H., KANEKO, Y., ICHIKAWA, M., KUROKAWA, T., TAKAHASHI, M. & YOSHIMURA, N. 2001. Transplantation of adult rat hippocampus-derived neural stem cells into retina injured by transient ischemia. *Neurosci Lett,* 306, 57-60.

LAM, T. T., ABLER, A. S., KWONG, J. M. & TSO, M. O. 1999. N-methyl-D-aspartate (NMDA)--induced apoptosis in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci,* 40, 2391-7.

LAWRENCE, J. M., SINGHAL, S., BHATIA, B., KEEGAN, D. J., REH, T. A., LUTHERT, P. J., KHAW, P. T. & LIMB, G. A. 2007. MIO-M1 cells and similar muller glial cell lines derived from adult human retina exhibit neural stem cell characteristics. *Stem Cells,* 25, 2033-43.

LEE, M. K., TUTTLE, J. B., REBHUN, L. I., CLEVELAND, D. W. & FRANKFURTER, A. 1990. The expression and posttranslational modification of a neuron-specific beta-tubulin isotype during chick embryogenesis. *Cell Motil Cytoskeleton,* 17, 118-32.

LILJEKVIST-LARSSON, I. & JOHANSSON, K. 2005. Retinal neurospheres prepared as tissue for transplantation. *Brain Res Dev Brain Res,* 160, 194-202.

LIMB, G. A. & DANIELS, J. T. 2008. Ocular regeneration by stem cells: present status and future prospects. *Br Med Bull.* England.

LOIS, C., HONG, E. J., PEASE, S., BROWN, E. J. & BALTIMORE, D. 2002. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science,* 295, 868-72.

LUND, R. D., WANG, S., KLIMANSKAYA, I., HOLMES, T., RAMOS-KELSEY, R., LU, B., GIRMAN, S., BISCHOFF, N., SAUVE, Y. & LANZA, R. 2006. Human embryonic stem cell-derived cells rescue visual function in dystrophic RCS rats. *Cloning and Stem Cells,* 8, 189-199.

MACLAREN, R. E., PEARSON, R. A., MACNEIL, A., DOUGLAS, R. H., SALT, T. E., AKIMOTO, M., SWAROOP, A., SOWDEN, J. C. & ALI, R. R. 2006. Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature.* England.

MARTINS, R. A. & PEARSON, R. A. 2008. Control of cell proliferation by neurotransmitters in the developing vertebrate retina. *Brain Res.* Netherlands.

MCLOON, S. C. & LUND, R. D. 1980. Specific projections of retina transplanted to rat brain. *Exp Brain Res,* 40, 273-82.

MONNIN, J., MORAND-VILLENEUVE, N., MICHEL, G., HICKS, D. & VERSAUX-BOTTERI, C. 2007. Production of neurospheres from mammalian Muller cells in culture. *Neurosci Lett,* 421, 22-6.

MORI, H., NINOMIYA, K., KINO-OKA, M., SHOFUDA, T., ISLAM, M. O., YAMASAKI, M., OKANO, H., TAYA, M. & KANEMURA, Y. 2006. Effect of neurosphere size on the growth rate of human neural stem/progenitor cells. *J Neurosci Res,* 84, 1682-91.

MUHLFRIEDEL, R., MICHALAKIS, S., GARRIDO, M. G., BIEL, M. & SEELIGER, M. W. 2013. Optimized technique for subretinal injections in mice. *Methods Mol Biol,* 935, 343-9.

OSAKADA, F., IKEDA, H., SASAI, Y. & TAKAHASHI, M. 2009. Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into retinal cells. *Nat Protoc.* England.

OSAKADA, F., OOTO, S., AKAGI, T., MANDAI, M., AKAIKE, A. & TAKAHASHI, M. 2007. Wnt signaling promotes regeneration in the retina of adult mammals. *J Neurosci.* United States.

OWENS, D. F. & KRIEGSTEIN, A. R. 2002. Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nature Reviews Neuroscience,* 3, 715-727.

PEARSON, R. A., BARBER, A. C., RIZZI, M., HIPPERT, C., XUE, T., WEST, E. L., DURAN, Y., SMITH, A. J., CHUANG, J. Z., AZAM, S. A., LUHMANN, U. F., BENUCCI, A., SUNG, C. H., BAINBRIDGE, J. W., CARANDINI, M., YAU, K. W.,

SOWDEN, J. C. & ALI, R. R. 2012. Restoration of vision after transplantation of photoreceptors. *Nature,* 485, 99-103.

PEKNY, M., WILHELMSSON, U., BOGESTAL, Y. R. & PEKNA, M. 2007. The role of astrocytes and complement system in neural plasticity. *Int Rev Neurobiol,* 82, 95-111.

PELLEGRINI, G., TRAVERSO, C. E., FRANZI, A. T., ZINGIRIAN, M., CANCEDDA, R. & DE LUCA, M. 1997. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet,* 349, 990-3.

PINILLA, I. & CUENCA, N. 2006. [Update on retinal transplantation and its clinical limitations]. *Arch Soc Esp Oftalmol,* 81, 239-40.

RAMIREZ, M., HERNANDEZ-MONTOYA, J., SANCHEZ-SERRANO, S. L., ORDAZ, B., FERRARO, S., QUINTERO, H., PENA-ORTEGA, F. & LAMAS, M. 2012. GABA-mediated induction of early neuronal markers expression in postnatal rat progenitor cells in culture. *Neuroscience,* 224, 210-22.

RAMIREZ, M. & LAMAS, M. 2009. NMDA receptor mediates proliferation and CREB phosphorylation in postnatal Muller glia-derived retinal progenitors. *Molecular Vision,* 15, 713-721.

RAPAPORT, D. H., WONG, L. L., WOOD, E. D., YASUMURA, D. & LAVAIL, M. M. 2004. Timing and topography of cell genesis in the rat retina. *J Comp Neurol,* 474, 304-24.

RAYMOND, P. A., BARTHEL, L. K., BERNARDOS, R. L. & PERKOWSKI, J. J. 2006. Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult. *BMC Dev Biol,* 6, 36.

REICHENBACH, A. & BRINGMANN, A. 2013. New functions of Muller cells. *Glia,* 61, 651-78.

REYES-AGUIRRE, L. I., FERRARO, S., QUINTERO, H., SANCHEZ-SERRANO, S. L., GOMEZ-MONTALVO, A. & LAMAS, M. 2013. Glutamate-induced epigenetic and morphological changes allow rat Muller cell dedifferentiation but not further acquisition of a photoreceptor phenotype. *Neuroscience,* 254c, 347-360.

REYNOLDS, J. & OLITSKY, S. 2011. Anatomy and Physiology of the retina. Pedriatic retina ed.: Springer Berlin Heidelberg.

SALAZAR, P., VELASCO-VELAZQUEZ, M. A. & VELASCO, I. 2008. GABA effects during neuronal differentiation of stem cells. *Neurochem Res,* 33, 1546-57.

SHAOYU, G., PRADHAN, D., GUO-LI, M. & S., H. 2006. GABA sets the tempo for activity-depent adult neurogenesis. 30, 1-8.

SHEVDE, N. 2012. Stem Cells: Flexible friends. *Nature.* England.

SHYU, W. C., LIN, S. Z., YEN, P. S., SU, C. Y., CHEN, D. C., WANG, H. J. & LI, H. 2008. Stromal cell-derived factor-1 alpha promotes neuroprotection, angiogenesis, and mobilization/homing of bone marrow-derived cells in stroke rats. *J Pharmacol Exp Ther,* 324, 834-49.

SILVA, A., PEREIRA, J., OLIVEIRA, C. R., RELVAS, J. B. & REGO, A. C. 2009. BDNF and extracellular matrix regulate differentiation of mice neurosphere-derived cells into a GABAergic neuronal phenotype. *J Neurosci Res,* 87, 1986-96.

SUNG, C. H. & CHUANG, J. Z. 2010. The cell biology of vision. *J Cell Biol.* United States.

TAKAHASHI, K. & YAMANAKA, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell,* 126, 663-76.

TAKAHASHI, M., PALMER, T. D., TAKAHASHI, J. & GAGE, F. H. 1998. Widespread integration and survival of adult-derived neural progenitor cells in the developing optic retina. *Mol Cell Neurosci,* 12, 340-8.

TAKEDA, M., TAKAMIYA, A., JIAO, J. W., CHO, K. S., TREVINO, S. G., MATSUDA, T. & CHEN, D. F. 2008. alpha-Aminoadipate induces progenitor cell properties of Muller glia in adult mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci,* 49, 1142-50.

TOZUKA, Y., FUKUDA, S., NAMBA, T., SEKI, T. & HISATSUNE, T. 2005. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron.* United States.

UHLIN-HANSEN, L. & KOLSET, S. O. 1988. Cell density-dependent expression of chondroitin sulfate proteoglycan in cultured human monocytes. *J Biol Chem,* 263, 2526-31.

VALAMANESH, F., MONNIN, J., MORAND-VILLENEUVE, N., MICHEL, G., ZAHER, M., MILOUDI, S., CHEMOUNI, D., JEANNY, J. C. & VERSAUX-

BOTTERI, C. 2013. Nestin expression in the retina of rats with inherited retinal degeneration. *Exp Eye Res,* 110, 26-34.

VICINI, S. 2008. The role of GABA and glutamate on adult neurogenesis. *J Physiol.* England.

WANG, L., CHOPP, M., ZHANG, R. L., ZHANG, L., LETOURNEAU, Y., FENG, Y. F., JIANG, A., MORRIS, D. C. & ZHANG, Z. G. 2009. The Notch pathway mediates expansion of a progenitor pool and neuronal differentiation in adult neural progenitor cells after stroke. *Neuroscience.* United States.

WANG, Y. & QIN, Z. H. 2010. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis,* 15, 1382-402.

WERT, K. J., SKEIE, J. M., DAVIS, R. J., TSANG, S. H. & MAHAJAN, V. B. 2012. Subretinal injection of gene therapy vectors and stem cells in the perinatal mouse eye. *J Vis Exp.*

WU, S., SUZUKI, Y., KITADA, M., KATAOKA, K., KITAURA, M., CHOU, H., NISHIMURA, Y. & IDE, C. 2002. New method for transplantation of neurosphere cells into injured spinal cord through cerebrospinal fluid in rat. *Neurosci Lett,* 318, 81-4.

XUE, L., DING, P., XIAO, L., HU, M. & HU, Z. 2010. Nestin, a new marker, expressed in Muller cells following retinal injury. *Can J Neurol Sci,* 37, 643-9.

XUE, L. P., LU, J., CAO, Q., KAUR, C. & LING, E. A. 2006. Nestin expression in Muller glial cells in postnatal rat retina and its upregulation following optic nerve transection. *Neuroscience,* 143, 117-27.

YAMADA, H., TAKANO, T., ITO, Y., MATSUZUKA, F., MIYA, A., KOBAYASHI, K., YOSHIDA, H., WATANABE, M., IWATANI, Y. & MIYAUCHI, A. 2009. Expression of nestin mRNA is a differentiation marker in thyroid tumors. *Cancer Lett,* 280, 61-4.

ZHAO, X., DAS, A. V., THORESON, W. B., JAMES, J., WATTNEM, T. E., RODRIGUEZ-SIERRA, J. & AHMAD, I. 2002. Adult corneal limbal epithelium: a model for studying neural potential of. *Dev Biol,* 250, 317-31.