



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SEDE SUR

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

**Evaluación de los cambios de expresión de microRNAs enriquecidos en la glía de  
Müller de *Mus musculus* en un modelo de daño retiniano *in vivo*.**

Tesis que presenta  
BIOL. MOL. BRENDA ESTRADA LEYVA

Para obtener el grado de  
Maestra en Ciencias  
en  
NEUROFARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA EXPERIMENTAL

Directora de la Tesis:  
Dra. Mónica Lamas Gregori

Ciudad de México

Noviembre, 2018



Este trabajo se realizó en el laboratorio 13 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) Sede Sur bajo la dirección de la Dra. Mónica Lamas Gregori, gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) mediante la beca de maestría con el número de registro **589920** y el financiamiento con número de proyecto **CB-2013-01 219847**.



Agradezco...

A la Dra Mónica Lamas Gregori por aceptarme en su laboratorio, por guiarme a través del proyecto tanto académico como de vida y por apoyarme en las buenas y en las malas. La quiero y admiro mucho, doctora.

Al comité tutorial: la Dra. Claudia González Espinosa por su guía, formación en el método científico y apoyo cuando necesitaba orientación. Gracias por aterrizar mis ideas sobre los experimentos. A la Dra. Anayansi Molina Hernández por prestarse a tener conversaciones enriquecedoras y amenas sobre el proyecto. Gracias por abrirme la mente e invitarme a pensar diferente.

Al CONACyT por la beca y el dinero del proyecto. Y al CINVESTAV por la oportunidad de hacer la maestría en las instalaciones de la sede sur, a la parte administrativa, a los del bioterio, a los vigilantes y a los de intendencia.

Al laboratorio 13 (Heber, Luis, Ireri, Leopoldo, Bladimir, Cristina, Rocío, Nacho, Karla, Rebeca, don Toño) por ser parte del camino de la investigación científica que es tanto una pasión como una tortura, a veces, pero que al final todos compartimos y disfrutamos.

Al laboratorio 11, en especial a Alfredo Sánchez Ibarra y a Rodolfo Pérez Lagunes por ser mis ángeles guardianes y los que me ayudaron cuando alguna técnica me era extraña.

A la Dra. Carolina López Rubalcava por su comprensión y buenos tratos siempre. A la Dra Janet Murbartián Aguilar por ayudarme con reactivos de último minuto. A la Dra. Silvia Cruz y a Araceli por recordarme que hay esperanza en la vida y que vale la pena luchar por ella. Y al Dr. Alfredo Meneses, al Dr. Emilio Galván y al Dr. Enrique Hong por estar siempre al pendiente de mí.

A mis amigos entrañables que se volvieron familia: Lizzy, Ivonne, Martín, Héctor, Nashiely, Valeria, Helena, Brenda, Gabriel, Daniela, Charlie, Julia, Alan, Misraim, Ángel, el Dr. Édgar Vázquez, los de LBM y la Profa. Calderón.

Le dedico este trabajo a mi madre por siempre estar allí en las buenas y en las malas y por hacerme la persona que soy. También a mi familia por apoyarme y por siempre transmitirme esa energía para seguir adelante. A mis angelitos Mayita, Muñeca y Fernando que están en el cielo pero nos mandan sus bendiciones y, por supuesto, a mis doctores (Dr. Felipe A. Méndez Salcido, Dr. Dennis Lacayo, Dr. Eduardo Maafs, Dr. David Kershenobich y al Instituto de Nutrición Salvador Zubirán) por ayudarme a sobrevivir una de las enfermedades más desafiantes de la vida.

Gracias a Dios por otorgarme una segunda oportunidad en la vida, llena de amor, bendiciones, lecciones y buenas experiencias.

## Índice

|  |      |
|--|------|
| LISTA DE FIGURAS .....   | VII  |
| LISTA DE TABLAS .....  | IX   |
| LISTA DE ABREVIATURAS .....  | X    |
| RESUMEN .....  | XII  |
| ABSTRACT .....   | XIII |
| 1. INTRODUCCIÓN .....  | 14   |
| 1.1 LA RETINA. ....  | 14   |
| 1.2 LA GLÍA DE MÜLLER COMO PARTE ESENCIAL DE LA GLÍA RETINIANA.....  | 14   |
| 1.3 MECANISMOS DE REGENERACIÓN RETINIANA DEPENDIENTES DE LA GLÍA DE MÜLLER.  | 17   |
| 1.4 MODELOS EXPERIMENTALES DE DAÑO Y REGENERACIÓN RETINIANA DEPENDIENTE DE LA GLÍA DE MÜLLER <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> . ....   | 18   |
| 1.5 EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPITELIAL (EGF), FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS (FGF) Y LA INSULINA COMO FACTORES DE CRECIMIENTO INDUCTORES DE LA REPROGRAMACIÓN CELULAR HACIA UN ESTADO PLURIPOTENTE..... | 19   |
| 1.6 EL GLUTAMATO Y EL NMDA COMO FACTORES NEUROACTIVOS INDUCTORES DE LA REPROGRAMACIÓN CELULAR HACIA UN ESTADO PLURIPOTENTE.....  | 21   |
| 1.7 LA MEMORIA EPIGENÉTICA LIMITA LA REGENERACIÓN COMPLETA. ....   | 23   |
| 1.8 LOS MICRORNAs: RNAs NO CODIFICANTES Y PEQUEÑOS QUE REGULAN LA EXPRESIÓN GÉNICA.....  | 23   |
| 1.9 LOS MICRORNAs ESTÁN INVOLUCRADOS EN PROCESOS DE REPARACIÓN TISULAR Y DE REGENERACIÓN.....  | 25   |
| 1.10 PREDICCIÓN BIOINFORMÁTICA DE mRNA DIANA DE LOS MIRNAS Y VÍAS PRINCIPALES DE SEÑALIZACIÓN DE LOS MIRNAS-29A, -143, -145, -199A, -199B* Y -214. ....  | 27   |
| 1.11 ANTECEDENTES DIRECTOS .....   | 27   |
| 2. JUSTIFICACIÓN .....   | 30   |
| 3. HIPÓTESIS.....  | 31   |
| 4. OBJETIVOS .....   | 32   |
| 4.1 OBJETIVO GENERAL.....  | 32   |
| 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....   | 32   |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS .....  | 33   |
| 5.1 MANEJO DE ANIMALES .....   | 33   |
| 5.2 CULTIVO PRIMARIO DE GLÍA DE MÜLLER (MG) .....  | 33   |
| 5.3 TRATAMIENTO CON GLUTAMATO EN CULTIVO DE MG .....   | 33   |
| 5.4 TRATAMIENTO CON FGF2 Y EGF EN CULTIVO DE MG.....   | 34   |

|  |    |
|--|----|
| 5.5 MODELO DE DAÑO RETINIANO MEDIANTE LA INYECCIÓN INTRAVÍTREA DE NMDA <i>IN VIVO</i> .....  | 34 |
| 5.6 EXTRACCIÓN DE RETINAS DE ANIMALES CON MODELO DE DAÑO POR NMDA .....  | 35 |
| 5.7 SEPARACIÓN CELULAR ACTIVADA POR IMANES (MACS) .....  | 36 |
| 5.8 EXTRACCIÓN DE RNA CON TRIZOL.....  | 38 |
| 5.9 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA TRAS REVERSO TRANSCRIPCIÓN (RT-PCR) .....  | 39 |
| 5.10 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (QPCR) .....   | 39 |
| 5.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....   | 40 |
| 5.12 ANÁLISIS DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN LAS QUE ESTÁN INVOLUCRADOS LOS MIARNAS.....   | 40 |
| 6. RESULTADOS.....   | 42 |
| 6. 1 RESULTADOS OBTENIDOS EN EL MODELO DE CULTIVO PRIMARIO DE GLÍA DE MÜLLER (MG). .....   | 42 |
| 6.1.1 <i>Evaluación de la expresión del microRNA-145 en dos modelos de desdiferenciación de la MG en cultivo.</i> .....  | 42 |
| 6.1.2 <i>La expresión del microRNA-145 en los cultivos primarios de MG cambia dependiendo del modelo de desdiferenciación.</i> .....   | 43 |
| 6.1.3 <i>El miR-145 se encuentra sobreexpresado en la MG in vitro y no in vivo.</i> .....  | 44 |
| 6.2 RESULTADOS OBTENIDOS IN SILICO.....  | 45 |
| 6.2.1 <i>Predicción in silico de las vías de señalización reguladas por los seis miARNAs enriquecidos en la glía de Müller.</i> .....  | 45 |
| 6.2.2 <i>La secuencia de los miARNAs-29a, -143, -145, -199a-5p, -199b*, -214 está conservada tanto en ratones como en humanos.</i> .....   | 46 |
| 6.3 RESULTADOS OBTENIDOS EN EL MODELO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i> .....  | 48 |
| 6.3.1 <i>La expresión de los miARNAs-29a, 143, 145, 199a-5p, 199b*, 214 no cambia significativamente en la retina completa en un modelo de daño excitotóxico por inyección intravítrea de NMDA a tiempos cortos.</i> ..... | 48 |
| 6.3.2 <i>La expresión de los miARNAs-29a, 143, 145, 199a-5p, 199b*, 214 no cambia significativamente en la fracción de MG en un modelo de daño excitotóxico por inyección intravítrea de NMDA a tiempos cortos.</i> .....  | 49 |
| 7. DISCUSIÓN .....   | 51 |
| 7.1 NUEVAS APORTACIONES AL PROCESO DE DESDIFERENCIACIÓN DE LA GLÍA DE MÜLLER DE MAMÍFERO EN CULTIVO.....   | 51 |
| 7.1.1 <i>La respuesta de la glía de Müller depende del estímulo de desdiferenciación.</i> ..   | 51 |
| 7.1.2 <i>El miRNA-145 y la desdiferenciación de la glía de Müller en cultivo</i> .....   | 52 |
| 7.1.3 <i>Cambios en la expresión del miR-145 en condiciones in vivo e in vitro.</i> .....  | 53 |
| 7.2 NUEVAS APORTACIONES SOBRE EL PAPEL DE LOS MIARNAS EN EL MODELO DE DAÑO RETINIANO <i>IN VIVO</i> POR INYECCIÓN DE NMDA.....   | 54 |

|   |    |
|---|----|
| 7.2.1 Predicción in silico de vías de señalización reguladas por los miR-29a, 143, 145, 199a, 199b*, 214 y sus probables implicaciones fisiológicas. .... | 54 |
| 7.2.2 Posibles interpretaciones sobre mantenimiento de la firma epigenética de los seis miRNAs en el modelo de daño in vivo. ....                         | 55 |
| 7.2.2.1 La heterogeneidad en la población celular de MG. ....   | 56 |
| 7.2.2.2 La memoria epigenética está involucrada en el mantenimiento del perfil de expresión característico de la MG. ....                                 | 58 |
| 7.2.2.3 La plasticidad celular necesaria para la regeneración disminuye con la edad. ....   | 59 |
| 7.2.2.4 Los seis miRNAs enriquecidos en la MG no están involucrados en procesos de diferenciación. ....   | 60 |
| 7.2.3 ¿Regeneración o gliosis reactiva? .....   | 61 |
| 8. CONCLUSIONES .....   | 64 |
| 9. PERSPECTIVAS .....   | 66 |
| 10. REFERENCIAS .....   | 68 |
| 11. APÉNDICE .....  | 74 |
| 11.1 El gen endógeno de referencia RNU6B se mantiene constante durante todas las observaciones en las condiciones estudiadas. ....                        | 74 |
| 12. ANEXOS .....  | 75 |

## Lista de figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Anatomía del ojo..   | 14 |
| Figura 2. Arquitectura e interacción celular dentro de la retina en mamíferos.....   | 16 |
| <i>Figura 3. Respuesta de la MG ante el daño.</i> .....  | 18 |
| <i>Figura 4. Efectos de la activación de los receptores a EGF, FGF e insulina</i> .....  | 20 |
| <i>Figura 5. Vía de señalización activada por la unión del NMDA a su receptor ionotrópico.</i><br>.....  | 22 |
| <i>Figura 6. Efecto de la unión de los miRNAs a su mRNA diana.</i> .....   | 24 |
| <i>Figura 7. Regulación de expresión génica mediada por miRNAs.</i> .....  | 25 |
| Figura 8. Muerte celular identificada mediante TUNEL en un modelo de daño <i>in vivo</i> con NMDA .....  | 28 |
| Figura 9. Inmunofluorescencia sobre la expresión de nestina tras daño <i>in vivo</i> con NMDA<br>.....   | 29 |
| Figura 10. Preparación del cultivo primario de MG .....  | 34 |
| Figura 11. Cinética de expresión de los seis miRNAs enriquecidos en la MG en un modelo de daño retiniano <i>in vivo</i> en retinas completas.....  | 35 |
| Figura 12. Inyección intravítrea y extracción de la retina. ....   | 36 |
| Figura 13. Método de separación celular asistida por imanes (MACS).....  | 38 |
| Figura 14. Predicción de mRNAs diana utilizando DIANA TOOLS .....  | 41 |
| Figura 15. Cultivo primario de MG con tratamiento de glutamato 100 $\mu$ M por 96 h y con EGF/FGF2 (20 ng/mL cada uno) por 96 h .....  | 42 |
| Figura 16. Expresión relativa a RNU6B de miR-145 en los cultivos primarios de MG tratados 96 h con glutamato (100 $\mu$ M) y EGF/FGF2 (20 ng/mL cada uno).....   | 43 |
| <i>Figura 17. Expresión relativa a RNU6B de miR-145 en los cultivos primarios de MG tratados a con glutamato (100 <math>\mu</math>M) y EGF/FGF2 (20 ng/mL cada uno) a 0, 12, 24 y 24 h.</i> 44               |    |
| Figura 18. Expresión relativa a RNU6B de miR-145 medido por qPCR de los cultivos primarios de MG ( <i>in vitro</i> ) y de la MG extraída mediante MACS a partir de retinas completas ( <i>in vivo</i> )..... | 45 |
| Figura 19. Expresión relativa a RNU6B de los miRNAs-29a, 143, 145, 199a, 199b*, 214 en la retina completa a 1, 6 y 12 h del daño con la inyección intravítrea de NMDA.....                                   | 48 |

Figura 20. Expresión relativa a RNU6B de los miRNAs-29a, 143, 145, 199a, 199b\*, 214 en la MG extraída de la retina completa mediante MACS a 1, 6 y 12 h después del daño con la inyección intravítrea de NMDA.....49

Figura 21. La expresión del gen de referencia RNU6B se mantiene constante en las diferentes condiciones evaluadas. ....74

## Lista de tablas

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la PCR en tiempo real.....   | 39 |
| Tabla 2. Predicción de función biológica de los miRNAs mediante el análisis in silico<br>utilizando DIANA TOOLS (mirPath v.3) ..... | 46 |
| Tabla 3. Conservación y homología entre las regiones semilla de los miRNAs de diferentes<br>especies. ....                          | 47 |

## Lista de abreviaturas

|  |  |   |
|--|--|---|
| ARVO: Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología  | fluorescencia es mayor al umbral mínimo.           | GFP: proteína verde fluorescente                  |
| Ascl1: factor de transcripción 1 achaete-scute de la familia bHLH  | DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol                  | GLAST: transportador de glutamato-aspartato       |
| BrdU: 5-bromo-2'-deoxiuridina  | DKK3: homólogo de dickkopf 3                       | GS: glutamina sintasa                             |
| cDNA: ácido desoxirribunucleico complementario   | E: día de estado embrionario                       | hESC: célula troncal embrional humana             |
| Chx10: homólogo con homeodominio ceh-10  | ECM: matriz extracelular                           | i. p. : intraperitoneal                           |
| Clu: clusterina  | EGF: factor de crecimiento epidérmico              | INL: capa nuclear interna                         |
| CRALBP: proteína acopladora de retinaldehído celular   | EGFR: receptor del factor de crecimiento epidermal | iPSC: célula troncal pluripotente inducida        |
| CRISPR/Cas9: agrupación de repeticiones cortas palindrómicas regularmente interespaciadas asociadas a la caspasa 9 | ESC: célula troncal embrionaria                    | KEGG: Enciclopedia Kyoto de Genes y Genomas       |
| Crx: homeocaja cono-bastón   | FBS: suero fetal bovino                            | Klf4: factor tipo Kruppel 4                       |
| Ct: ciclo en la qPCR en el que la cantidad de  | FGF2: factor de crecimiento de fibroblastos 2      | Lhx1: LIM homeocaja 1                             |
|  | GABA: ácido gamma-aminobutírico                    | Lin28: proteína de linaje 28                      |
|  | GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa     | MACS: separación celular activada por imanes      |
|  | GCL: capa de células ganglionares                  | MG: glía de Müller                                |
|  | GFAP: proteína ácida fibrilar glial                | MHC II: complejo principal de histocompatibilidad |
|  |  | miRNA: microRNA                                   |
|  |  | MMP: metaloproteinasas de la matriz               |

|  |  |  |
|--|--|--|
| mRNA: ácido ribonucleico mensajero                             | PN: día postnatal  | TUNEL: transferasa que etiqueta el corte dUTP terminal mediada por (TdT) |
| NMDA: N-metil-D-aspartato                                      | qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real | UTR: región no traducida   |
| Oct4: factor de transcripción de unión a octámeros 4           | Rax: homeocaja de retina y pliegue neural anterior       | Vsx2: homeocaja del sistema visual 2                                     |
| Pax6: factor de transcripción de la proteína de caja pareada 6 | RNA: ácido ribonucleico                                  | YFP: proteína amarillo fluorescente                                      |
| PCNA: antígeno nuclear de células en proliferación             | RPE: epitelio pigmentado retiniano                       |  |
| PCR: reacción en cadena de la polimerasa                       | RT-PCR: PCR de retrotranscripción                        |  |
|  | Sox2: región determinante de sexo caja-Y 2               |  |

## Resumen

La retina es un tejido del sistema nervioso central sensible a la luz, conformado de neuronas y células gliales. Estas últimas tienen la capacidad de regenerar las células retinianas perdidas en modelos de daño en peces teleósteos, anfibios y en algunos modelos con cultivos celulares de glía de Müller (MG). Para entender los procesos moleculares que subyacen al daño retiniano en mamíferos *in vivo*, se estudiaron los cambios de expresión de un grupo de seis miRNAs en la retina completa y en la MG de ratones C57BL/6J adultos después de un daño excitotóxico con la administración intravítrea de N-metil-D-aspartato (NMDA) y en dos modelos de desdiferenciación en cultivo celulares primario de MG de ratones C57BL/6J de ocho días postnatales (PN8).

Previamente, en el laboratorio se identificaron seis miRNAs (miR-29a, 143, 145, 199a-5p, 199b\*, 214) enriquecidos en la MG. Con algoritmos como TargetScan, TarBase y microT-CDS se predijeron los mRNAs diana y se relacionaron utilizando DIANA TOOLS con las posibles vías de señalización en las que están involucrados. En el modelo de daño *in vivo* ninguno de los seis miRNAs cambió su perfil de expresión estadísticamente significativo, sugiriendo el mantenimiento del fenotipo y funcionamiento glial, recalcando la limitada capacidad regenerativa en mamíferos adultos. En los modelos de desdiferenciación en cultivos primarios de MG de ratones (PN8) estimulados con glutamato y con los factores de crecimiento epidérmico y de fibroblastos (EGF/FGF2), se modificó la expresión del miR-145, sugiriendo un cambio de fenotipo tras la inducción de la desdiferenciación. Las alteraciones morfológicas y de expresión génica asociadas al proceso de desdiferenciación fueron dependientes del estímulo inductor.

Proponemos realizar estudios más sensibles a la heterogeneidad celular dentro de la población de MG para identificar los cambios sutiles, además de ampliar el número de miRNAs estudiados. Será importante comparar los perfiles de expresión de miRNAs entre ratones jóvenes y adultos, pues la capacidad regenerativa disminuye conforme a la edad. Sugerimos utilizar técnicas como CRISPR que promuevan o inhiban la expresión específica de ciertos genes, en especial de miRNAs, con diferentes patrones de expresión para poner a prueba su papel en procesos de regeneración. Finalmente, es necesario identificar y diseñar protocolos para determinar marcadores específicos que diferencien entre el proceso de gliosis reactiva hacia a la formación de cicatrices y aquel que lleva hacia la regeneración.

## Abstract

The retina is part of the central nervous system that senses light and is conformed of neurons and glial cells. Some glial cells have the ability to regenerate all the retinal cells lost after injury in animal models like teleost fish, amphibians and in cell culture models of Müller glia (MG). In order to understand the molecular processes underlying retinal injury in mammals, we studied the miRNA expression pattern in the retina and specifically in the MG in adult C57BL/6J mice after intravitreal injection of N-methyl-D-aspartate (NMDA) and in two different models of dedifferentiation in MG primary culture of C57BL/6J mice with 8 days postnatal (PN8).

Previous work in our laboratory identified a set of six miRNAs (miR-29a, 143, 145, 199a-5p, 199b\*, 214) enriched in MG. Using mRNA target prediction algorithms (TargetScan, TarBase and microT-CDS) we evaluated their target genes and associated signaling pathways.

We identified changes in the expression pattern of miR-145 when MG primary cell cultures were induced either with glutamate or with epidermal and fibroblast growth factors, suggesting a change of phenotype. Morphological and gene (miR-145) expression pattern changes associated with the process of dedifferentiation were stimulus-dependent.

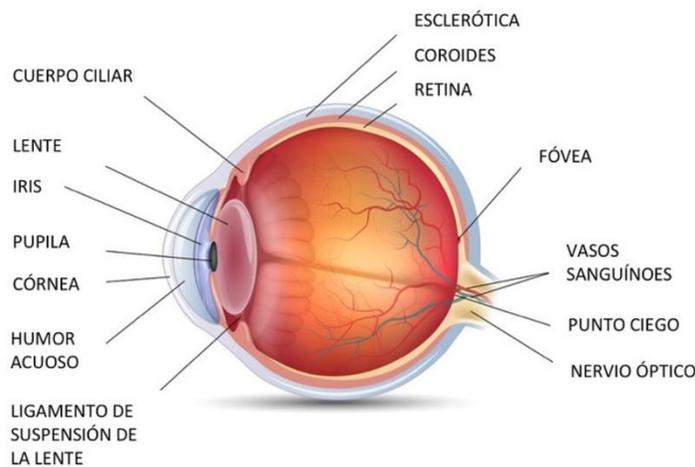
In the *in vivo* injury model, none of the six miRNAs changed their expression pattern significantly. We speculated that these results may underlie the limited mammalian ability of regeneration in adults, and suggest heterogeneity among the MG cell population as only a small percentage of the cells are able to proceed successfully through the dedifferentiation process.

We propose the use of more sensible techniques to identify subtle gene expression changes in MG, and increase the number of studied miRNAs. It is also important to compare miRNA expression patterns between young and adult mice because it is well known that the regenerative ability declines with age. The use of techniques like CRISPR that enable the specific enhancement or inhibition of gene expression could help us to decipher their role during regeneration. We favor further investigation to identify markers that enable to distinguish between the process of reactive gliosis that leads to scar formation and the process that may lead to regeneration.

## 1. Introducción

### 1.1 La retina.

La retina es un órgano sensorial perteneciente al sistema nervioso central en la parte posterior del ojo y encargado de sensar colores, luces y sombras, que serán procesados en el cerebro para crear imágenes. La retina está conformada por seis tipos neuronales: fotorreceptores (conos y bastones), células ganglionares, bipolares, amacrinas, horizontales; y tres tipos gliales: astrocitos, microglía y glía de Müller (MG; Figura 1; Vecino et al., 2016).



*Figura 1. Representación esquemática de la anatomía del ojo donde se observa la retina en la parte posterior.*

La retina es un tejido privilegiado para el estudio de la regeneración, ya que es de fácil acceso y permite una buena manipulación experimental. El poder modificar las condiciones de la retina y semejar sus patologías nos permite un mejor acercamiento hacia develar los mecanismos moleculares involucrados en los problemas retinianos en mamíferos adultos, así como los posibles blancos terapéuticos para generar propuestas de terapias regenerativas.

### 1.2 La glía de Müller como parte esencial de la glía retiniana.

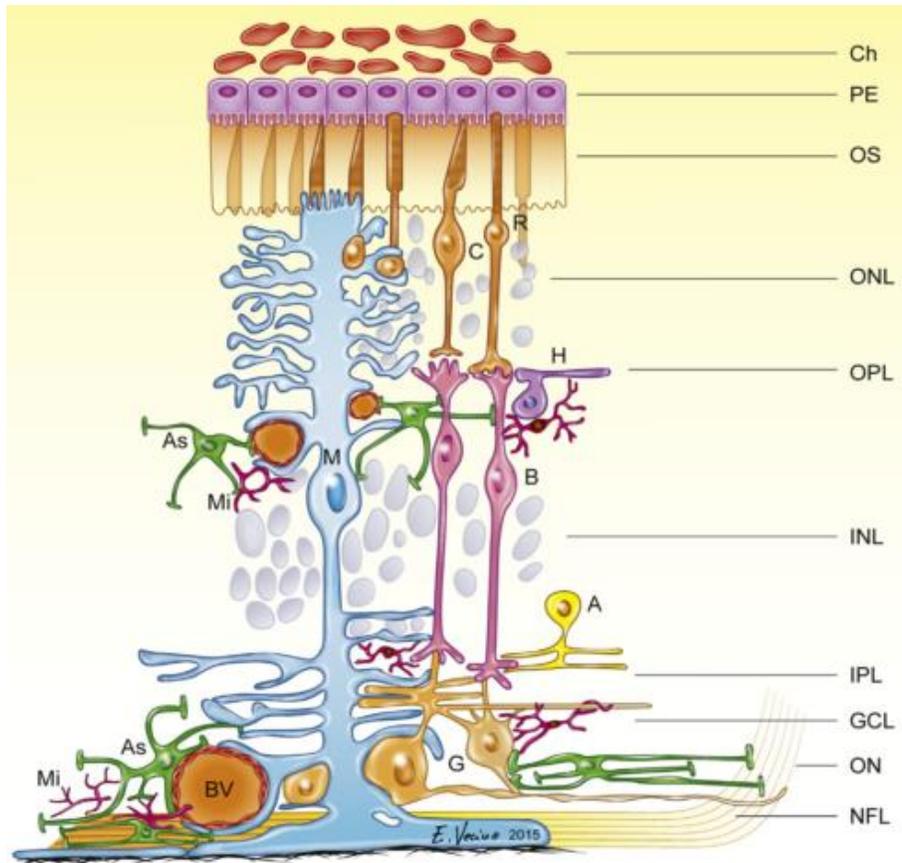
La MG es el tipo glial más abundante (90%) en la retina (Vecino et al., 2016). Está presente a lo largo de toda la retina con prolongaciones que se extienden de manera columnar, desde la capa de células ganglionares hasta la capa de fotorreceptores, conservando sus somas en la lámina nuclear interna (INL; Figura 2). Es el único tipo glial retiniano que se deriva de

progenitores del neuroepitelio de embriones, en comparación con las otras células gliales que provienen de fuentes extrar-retinales durante el desarrollo (Fischer & Bongini, 2010). La MG está presente en todos los vertebrados y tiene la función de proveer de estructura, soporte sináptico, homeostático, nutrimental y metabólico a las demás células neuronales retinianas. Mediante el contacto e interacción que tiene con las neuronas a su alrededor forma una unidad funcional, por lo que cada MG se encarga únicamente de las necesidades de las células circundantes regulando el ambiente extracelular cuando hay una intensa actividad neuronal. La MG recubre a las neuronas y esta íntima relación entre células mantiene el funcionamiento neuronal al proveerles energía y precursores de neurotransmisores (Vecino et al., 2016). La MG puede sensar cambios que ocurren en las capas internas como externas de la retina y, modular la actividad neuronal regulando la concentración extracelular de sustancias neuro activas y de potasio. La MG también tiene mecanosensores desde la parte interna hasta la parte externa de la retina, con una sección enriquecida de canales iónicos sensibles a cambios mecánicos en los extremos del límite interno de la retina. Las propiedades mecánicas de la retina dependen principalmente de componentes extracelulares como el colágeno, la elastina y los proteoglicanos. Estos componentes de la matriz extracelular son mediadores clave de la activación glial, pues tienen la capacidad de iniciar efectos tanto regenerativos como degenerativos (Vecino et al., 2016). Ya que, la MG tiene contacto directo con los vasos sanguíneos, funciona como barrera y sistema de comunicación entre el sistema vascular y las neuronas permitiendo el intercambio de metabolitos y le permite regular la respuesta inmune controlando el paso de células y factores del sistema circulatorio hacia la parte interna de la retina.

Entre los marcadores selectivos de la MG está la enzima glutamina sintasa (GS), la proteína acopladora de retinaldehído celular (CRALBP) y el transportador de glutamato-aspartato (GLAST), entre otros. Tanto GLAST como GS juegan un papel importante en la recaptura y reciclaje de glutamato, ya que GLAST internaliza al glutamato liberado por las neuronas y GS lo convierte en glutamina, la cual es precursor de glutamato para las neuronas (Vecino et al., 2016).

Muchos estudios también proponen a las proteínas de filamentos intermedios como la vimentina y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) como marcadores de la MG; sin

embargo, estas son menos específicas ya que también se expresan en astrocitos. Estas proteínas juegan un papel importante en la elasticidad y la rigidez de la retina, influenciando la biomecánica celular de la retina. Adicionalmente, en la MG las proteínas de filamentos intermedios le confieren las propiedades necesarias para guiar la luz hacia los fotorreceptores, reduciendo la difracción y dispersión de la luz dentro de la retina (Vecino et al., 2016).



*Figura 2. Representación esquemática de la arquitectura e interacción celular dentro de la retina en mamíferos. Vasos sanguíneos (BV), células amacrinas (A), células bipolares (B), conos (C), bastones (R), células ganglionares (G), células horizontales (H), células de Müller (M), astrocitos (AS), microglía (Mi). Capas retinianas desde la más interna a la más externa: nervio óptico (ON), capa de fibras nerviosas (NFL), capa de células ganglionares (GCL), capa plexiforme interna (IPL), capa nuclear interna (INL), capa plexiforme externa (OPL), capa nuclear externa (ONL), capa de células fotorreceptoras (OS), epitelio pigmentado (PE), coroides (Ch) (Thews et al., 1983; Vecino et al., 2016).*

Existe evidencia sobre la heterogeneidad de la MG, por ejemplo, sólo un 30% expresa el antígeno del complejo principal de histocompatibilidad clase 2 (MHC II) involucrado en la respuesta inmune retiniana; así como no toda la MG expresa marcadores de mantenimiento

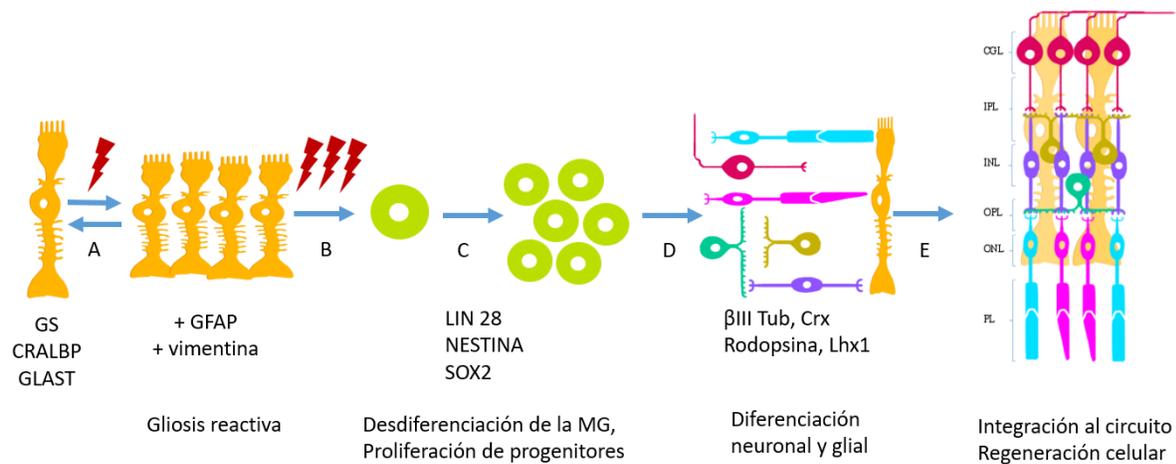
basal como beta-actina, beta-2-microglobulina, la proteína de unión a la caja TATA, entre otras. Esta heterogeneidad se relaciona con la diversidad funcional, su variable interacción con neuronas y su diferente potencial regenerativo (Roesch et al., 2008).

La MG se ha estudiado más en roedores debido a su capacidad de desdiferenciarse y proliferar (Karl et al., 2008; Wilken & Reh, 2016). La capacidad de desdiferenciación se define como la capacidad celular de reentrar al ciclo celular y generar tipos celulares diferenciados. En aves esta capacidad permite generar nuevas células (Fischer et al., 2002; Wilken & Reh, 2016) y en peces teleosteos regenerar de manera funcional la retina (Fischer & Bongini, 2010; Karl & Reh, 2012; Wan & Goldman, 2016).

### 1.3 Mecanismos de regeneración retiniana dependientes de la glía de Müller.

La MG es un grupo heterogéneo de células gliales que responden de dos maneras dependiendo de la intensidad del daño. Si el daño es pequeño, la mayor parte de la MG inicia una respuesta neuroprotectora, liberando factores neurotróficos y antioxidantes para promover la supervivencia de las neuronas a su alrededor (Bringmann et al., 2009). La MG se vuelve hipertrófica y cambia su función de manera transitoria, ya que puede recuperar su estado original, sin alterar la integridad del tejido, si el estímulo desaparece (Figura 3A). Cuando el daño persiste o es de mayor intensidad, la MG se mantiene hipertrófica y crea cicatrices gliales, en un proceso denominado "gliosis reactiva" que conlleva a la pérdida de la visión. La gliosis reactiva incluye hipertrofia celular, aumento en la expresión de proteínas de filamentos intermedios como GFAP y vimentina, aumento en la proliferación de la MG, inflamación, remodelación del tejido mediante el aumento de la expresión de metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs), así como remodelación de la vascularización (Figura 3B; Belecky-Adams et al., 2013; Vecino et al., 2016). Lo anterior promueve que la integridad de la barrera hematorretiniana se pierda y que componentes séricos se filtren hacia el espacio perivascular promoviendo la reentrada al ciclo celular de la MG (Vecino et al., 2016). Se ha identificado que una pequeña fracción de la MG reacciona ante el daño desdiferenciándose hacia un fenotipo más primitivo como si involucionara (Figura 3C; Cai et al., 2007). El proceso de desdiferenciación involucra un cambio en el perfil de expresión génica y la adquisición de un patrón similar al de las células progenitoras, lo que le permite proliferar y diferenciarse hacia varios tipos

neuronales o regresar al fenotipo glial inicial (Figura 3D). Estos cambios se ven reflejados a nivel de expresión de genes y proteínas, así como cambios funcionales y morfológicas, reduciendo su tamaño, su número de organelos y aumentando la porción carioplasmática en comparación con las que ya están comprometidas hacia un linaje celular específico (Cai et al., 2007). En el caso de que estas células se reintegren al circuito de la retina se habla de una regeneración funcional del tejido como ocurre en la regeneración inducida por daño en peces teleósteos (Figura 3E; Fischer & Bongini, 2010; Hitchcock et al., 2004; Wan & Goldman, 2016).



*Figura 3. Esquema representativo sobre la respuesta de la MG ante el daño. (A) La gliosis reactiva es un proceso reversible cuando el daño es pequeño y transitorio. La MG expresa marcadores específicos de su fenotipo como GS, CRALBP y GLAST. Cuando inicia un proceso de gliosis la expresión de GFAP y vimentina aumenta. (B) Cuando el daño persiste o es mayor una fracción de la MG puede desdiferenciarse y expresar marcadores de progenitores como Lin28, nestina y Sox2. (C) Los progenitores derivados de la MG proliferan. (D) Las células progenitoras de MG pueden diferenciarse hacia neuronas, expresando marcadores característicos como β-Tubulina III (βIII Tub), Crx, rodopsina y Lhx; o regresar a su fenotipo glial. (E) El proceso de regeneración funcional se logra cuando las nuevas células son capaces de integrarse al circuito y participan en la transmisión de información sensorial.*

#### 1.4 Modelos experimentales de daño y regeneración retiniana dependiente de la glía de Müller *in vitro* e *in vivo*.

Los estudios realizados en el pez cebra son aquellos que han logrado una regeneración funcional a partir de MG después de realizar daño en la retina (Wan & Goldman, 2016). Los los modelos realizados con pollos sólo llegan hasta la expresión de células con

marcadores de neuronas, tras la administración de insulina y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2) (Wilken & Reh, 2016). Y en los modelos en mamíferos roedores se ha logrado llegar hasta los primeros pasos de la regeneración mediante la expresión de células con marcadores de genes asociados a progenitores neurales (Reyes-Aguirre et al., 2013; Wilken & Reh, 2016) y la proliferación subsecuente (Karl et al., 2008). Estos resultados reflejan la limitada capacidad de los mamíferos de regenerar tejidos en general y específicamente tejidos del sistema nervioso central. Para estudiar y entender mejor estos procesos con sus limitaciones se han propuesto el uso de factores de crecimiento y de neurotransmisores excitadores e inhibidores para promover la regeneración tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*.

1.5 El factor de crecimiento epitelial (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y la insulina como factores de crecimiento inductores de la reprogramación celular hacia un estado pluripotente.

Una de las aproximaciones experimentales para promover la desdiferenciación en la MG consiste en utilizar el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2), el factor de crecimiento epitelial (EGF) y la insulina. Estas moléculas se unen a sus receptores que pertenecen a la familia de receptores tirosina cinasa. Los receptores a estos factores convergen en muchos puntos río abajo de sus vías de transducción de señales, dentro de las cuales se activan cascadas de proteínas cinasas y liberación de calcio. Estos factores pueden promover diferentes procesos fisiológicos como la sobrevivencia, la diferenciación celular, la expresión de genes mediante la activación de factores de transcripción y la reorganización del citoesqueleto (Figura 4). También se ha observado que tienen efecto sobre procesos de regeneración. En modelos de embriones de aves se ha identificado que al agregar FGF2 se estimula la transdiferenciación de células del epitelio pigmentado retiniano (RPE) hacia todos los tipos celulares siempre y cuando la estimulación se realice antes del día embrionario 4.5 embrionario, ya que esta capacidad disminuye mientras avanza el desarrollo (Fischer & Bongini, 2010). En el modelo de pollo, tras administrar insulina junto con FGF2 se logró que la MG se desdiferenciara, proliferara y se diferenciara nuevamente, pues la mayoría de las células recién formadas expresaron factores de transcripción propios de progenitores retinales (Pax6 y Chx10), algunas regresaron al fenotipo de glía y otras pocas expresaron marcadores de neuronas. Tanto la insulina como el FGF están

involucrados en procesos de proliferación, promoción de diferenciación y supervivencia (Fischer et al., 2002). En embriones de roedores, también se ha identificado que el estímulo con FGF2 promueve la transdiferenciación de la MG y el epitelio pigmentado retiniano (RPE) hacia células que expresan marcadores neuronales. En ratas con diez días postnatales, el estímulo con EGF induce la proliferación de la MG, usualmente quiescente, iniciando así el proceso de regeneración (Fischer & Bongini, 2010). En roedores, se reporta una ventana de tiempo para la regeneración muy limitada al estadio embrionario (E12-15), donde el RPE puede llegar a expresar marcadores de progenitores neurales tras ser estimulado con FGF2 (Fischer & Bongini, 2010). Por desgracia, la prevalencia de enfermedades relacionadas con la pérdida de la visión debido a patologías en la retina en humanos en la edad adulta.

Como primer acercamiento al estudio de la respuesta al daño en mamíferos adultos, el grupo de investigadores de Karl y colaboradores administró N-metil-D-aspartato (NMDA) de manera intravítrea en ratones adultos. El daño activó a la MG, aumentando la expresión de receptores a factores de crecimiento como el receptor a EGF (EGFR), incrementando su sensibilidad a estos estímulos tras el daño, por lo que la porción de la MG que proliferó aumentó 34 veces al dar un segundo estímulo ahora con EGF (Karl et al., 2008).

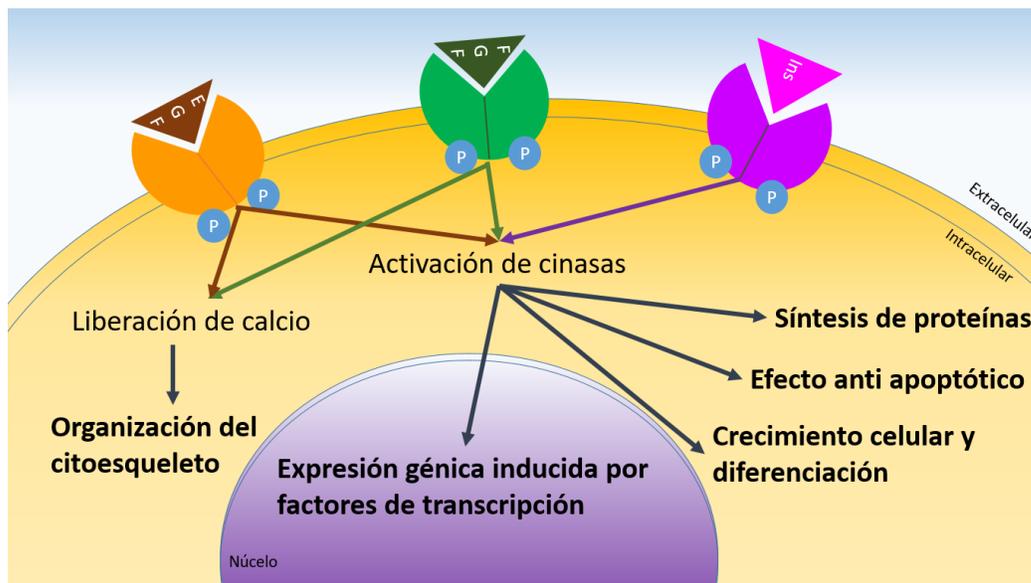


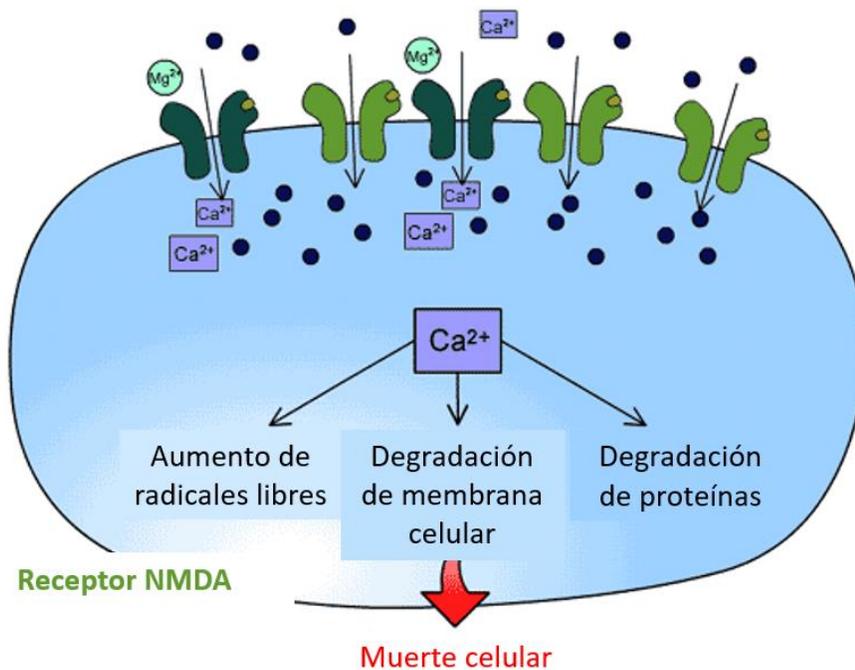
Figura 4. Esquema representativo sobre los efectos de la activación de los receptores a EGF, FGF e insulina (Ins). La activación de diversas cinasas promueven la síntesis de proteínas, la supervivencia, el crecimiento celular y la diferenciación, así como la

*expresión génica. La activación de los receptores a EGF y FGF también promueven la liberación de calcio hacia el espacio intracelular regulando la organización del citoesqueleto.*

1.6 El glutamato y el NMDA como factores neuroactivos inductores de la reprogramación celular hacia un estado pluripotente.

En el modelo de excitotoxicidad mediada por glutamato se activan tanto receptores ionotrópicos como metabotrópicos. Los primeros, son canales para cationes que permiten el flujo de calcio del espacio extracelular hacia el interior de la célula, aumentando la concentración intracelular en un microambiente y activando diferentes cascadas de señalización. La entrada de calcio hacia las neuronas promueve procesos de apoptosis mediante la degradación de lípidos y membranas celulares, la activación de caspasas y la producción de radicales libres (Figura 5; Kaul et al., 2001). La sobreestimulación con N-metil-D-aspartato (NMDA), un fármaco que activa un tipo de los receptores ionotrópicos de glutamato, causa muerte neuronal, por ejemplo, de las células ganglionares, las amacrinas y las horizontales (Karl & Reh, 2012; Karl et al., 2008). La cantidad de células que mueren por excitotoxicidad depende de su sensibilidad al estímulo, que está relacionada con la cantidad de NMDA-R funcionales. Por ejemplo, las neuronas, las células ganglionares y los astrocitos son las células más sensibles ante este tipo de estímulos (Shen et al., 2006). Por otra parte, se ha sugerido que la fracción glial de la retina, incluyendo a la MG, es capaz de soportar un aumento en la concentración de glutamato y remover el exceso del espacio extracelular, como parte de su función regulatoria sobre la cantidad extracelular de neurotransmisores (Bringmann et al., 2009; Vecino et al., 2016). La MG utiliza transportadores de glutamato para convertirlo a glutamina y reciclarlo hacia las neuronas o para incorporarlo a su ciclo de Krebs, acoplado la neurotransmisión con su propia regulación metabólica (Bui et al., 2009). En cultivos primarios de MG extraídos de retinas de ratas Long-Evans (PN6-12), con una pureza >95% y con muy escasa contaminación de neuronas y astrocitos (Ramírez et al., 2012), nuestro grupo de investigación describió que el tratamiento de glutamato (100-200  $\mu$ M) inicia el proceso de desdiferenciación. En esos experimentos se identificó un aumento de un 80% en la expresión de nestina (proteína de filamentos intermedios usada como marcador de células troncales neurales), Lin28 (represor de la expresión de let-7 necesario para la diferenciación

de células troncales embrionarias), Sox2 (factor de transcripción implicado en el mantenimiento del estado pluripotente de células troncales embrionarias), y Chx10 (factor de transcripción que participa en el desarrollo de células de la capa nuclear interna de la retina), además, de que no presentaban marcadores de fotorreceptores maduros (Crx) o para células horizontales maduras (Lhx1) (Reyes-Aguirre et al., 2013). Estas observaciones sugirieron la inducción de la MG hacia un fenotipo más primitivo. Siguiendo el proceso de desdiferenciación y para mimetizar el proceso de regeneración los cultivos primarios de MG, se sometieron a protocolos de diferenciación hacia fotorreceptores, mediante la administración de ácido gamma-aminobutírico (GABA), taurina y ácido retinóico (Quintero et al., 2016; Ramírez et al., 2012; Ramírez & Lamas, 2009). Desafortunadamente, las células desdiferenciadas no pudieron ser diferenciadas hacia neuronas maduras (Reyes-Aguirre et al., 2013). El conjunto de estos resultados apoya la hipótesis de que probablemente exista una memoria epigenética que impide que estas células pierdan por completo su fenotipo glial y adquieran un fenotipo neuronal.



*Figura 5. Esquema representativo de la vía de señalización activada por la unión del NMDA a su receptor ionotrópico. Cuando el canal se abre, entran corrientes de calcio aumentando la concentración intracelular en un microambiente de la célula, provocando un aumento en los radicales libres, la degradación de lípidos y membranas, y la degradación de proteínas. Si la señalización es excesiva puede inducir muerte celular por excitotoxicidad.*

### 1.7 La memoria epigenética limita la regeneración completa.

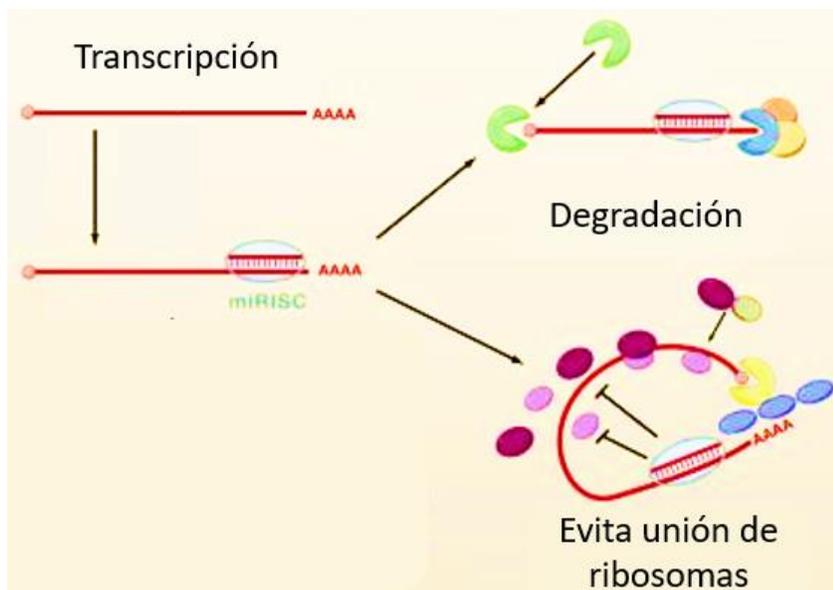
Por memoria epigenética en el contexto de este trabajo se refiere a los mecanismos que controlan el fenotipo celular que se mantienen aún después de la desdiferenciación. La memoria epigenética se ha identificado en las células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs) diferenciadas, ya que muestran una limitada capacidad de diferenciación hacia otros linajes distintos del que fue derivada. Se propone que los modelos experimentales de desdiferenciación cambian el perfil de expresión de las células mas no el perfil de metilación de ADN, dejando genes ligados al linaje activos (Kim et al., 2010). Lo anterior es apoyado por modelos *in vivo* donde sí se logra una regeneración tisular funcional después de haber cortado un miembro, como es el caso del ajolote, pues las células encargadas de dicho proceso adquieren un fenotipo progenitor y logran diferenciarse solamente dentro del mismo linaje celular (Kragl et al., 2009).

El estudio a fondo sobre los procesos que regulan esta memoria epigenética brinda un panorama más claro sobre las moléculas clave para lograr una reprogramación completa en organismos donde este proceso es aún muy limitado. Una de las moléculas clave que podrían estar influenciando la memoria epigenética son los microRNAs.

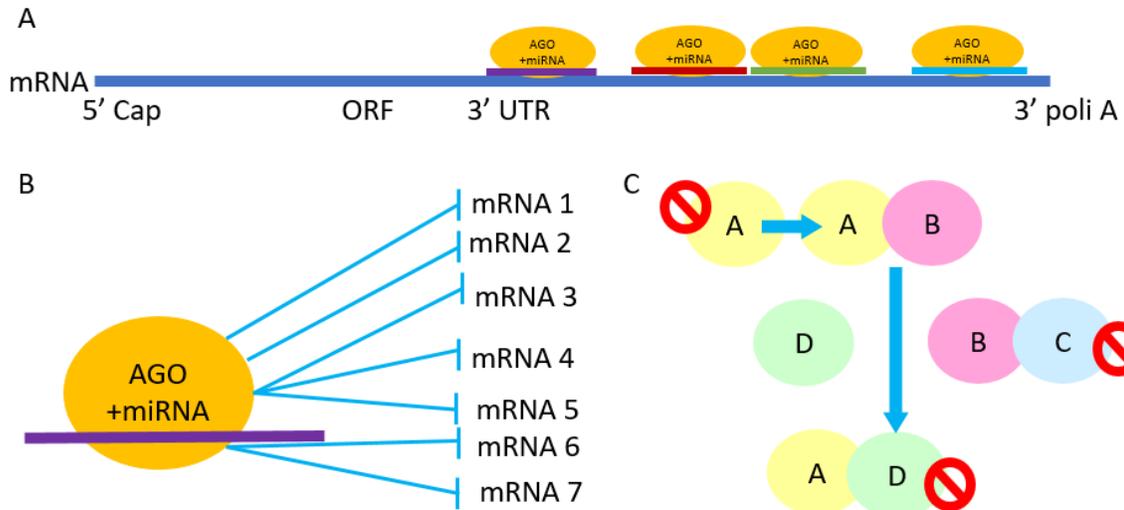
### 1.8 Los microRNAs: RNAs no codificantes y pequeños que regulan la expresión génica.

Los microRNAs (miRNAs), RNA de cadena sencilla de aproximadamente 22-25 nucleótidos, moléculas altamente conservadas entre especies y capaces de regular la expresión de los RNA mensajeros (mRNA) mediante su hibridación complementaria en la región no traducida del extremo 3' (3' UTR) del mRNA. La hibridación canónica de los miRNAs se realiza principalmente con los nucleótidos dos al ocho, correspondiente a la región semilla, y se complementa con los demás nucleótidos centrales y 3' terminales. Dependiendo del grado de complementariedad entre el miRNA y su mRNA diana la regulación genética se da mediante la degradación del mensajero o por impedimento de la unión de los ribosomas al mensajero (Figura 6). Cuando la región semilla es conservada entre varios miRNAs se dice que pertenecen a la misma familia y probablemente tengan mRNAs diana en común. La regulación por miRNAs puede ser redundante, ya que varios miRNAs pueden tener el mismo mRNA blanco y un solo miRNA puede tener varios mRNA blanco. Varios miRNAs pueden tener un efecto fisiológico en común pues regulan

la misma vía de señalización a través de diferentes mRNA blanco (Figura 7). Los miRNAs se encuentran codificados tanto en regiones cercanas a sus mRNAs diana como en regiones más lejanas en los cromosomas y su expresión puede ser por agrupación, si se encuentran codificados en tándem, o de manera separada. Se ha reportado que la regulación de la traducción a través de los miRNAs afecta vías de traducción de señales celulares y por ende procesos de proliferación, diferenciación, homeostasis y el mantenimiento del estado progenitor de las células embrionarias (Bartel, 2004; Inui et al., 2010). El grupo de Valle y colaboradores, al comparar la expresión de miRNAs en diferentes secciones del sistema nervioso central, encontraron que de los 78 miRNAs expresados en la retina 21 son únicos de este tejido (Xu et al., 2007).



*Figura 6. Efecto de la unión de los miRNAs a su mRNA diana. La complementariedad de la hibridación entre el miRNA y su la región 3'UTR de su mRNA diana determina si se elimina la cola de poliA, el casquete en 5' y se degrada o si se impide su traducción mediante impedimento estérico que evita la unión a los ribosomas.*



*Figura 7. Regulación de expresión génica mediada por miRNAs. (A) Los mRNA pueden ser blanco y estar regulados por varios miRNAs que se unen generalmente a la región 3'UTR. (B) Un sólo miRNA puede regular a varios genes diferentes. (C) El efecto fisiológico que tienen los miRNAs contempla las vías de señalización en los que sus mRNA blancos están involucrados. Varios miRNAs pueden llegar a tener el mismo efecto biológico ya que regulan diferentes genes pertenecientes a una misma vía de señalización.*

1.9 Los microRNAs están involucrados en procesos de reparación tisular y de regeneración.

Se ha propuesto que la capacidad regenerativa disminuye mientras avanza en edad el mamífero y que los procesos de regeneración siguen vías de señalización similares a las que ocurren durante el desarrollo, por lo que se pueden comparar diferentes etapas del proceso regenerativo con las del desarrollo, y de esta manera identificar cambios en los perfiles de expresión de los miRNAs. En el ratón, se identificó que al día embrionario 16 (E16), a diferencia de los E19, los ratones regeneraban la piel dañada sin formar cicatrices. Lo que permitió identificar que en estadios iniciales de embriogénesis la expresión de miRNAs es reducida, principalmente por factores que se unen al RNA como Lin28a y Lin28b impidiendo su maduración. Por lo que, se propone que durante el desarrollo tisular fetal existe un silenciamiento transitorio de miRNAs que permiten la expresión de genes asociados con este proceso. De igual manera, cuando ocurre un daño, la reducción de la expresión de miRNAs permite que genes involucrados en la reparación y regeneración del tejido se expresen (Sen & Ghatak, 2015).

En nuestro laboratorio, se exploran si hay un perfil de expresión de miRNAs específico para cada tipo celular y si este patrón cambia cuando se modifica el fenotipo celular. Quintero y colaboradores identificaron un grupo de seis miRNAs (miR-29a, 143, 145, 199a-5p, 199b\*, 214) que se encuentran sobreexpresados en la MG con respecto a otros tipos celulares retinianos (Quintero et al., 2016). Otros laboratorios confirmaron estos resultados posteriormente, denominando al grupo de miRNAs enriquecidos en la fracción de MG como *mgliomiRs* (Wohl & Reh, 2016). Se sugiere que estos miRNAs están involucrados en la especificación y el mantenimiento del fenotipo particular dentro de la retina. Al analizar más a detalle el papel del grupo de seis miRNAs identificados en la MG, se identificó que el miR-214 se encuentra sobreexpresado en los progenitores retinianos inhibiendo la generación de células bipolares durante el desarrollo de la retina en *Xenopus* (Decembrini et al., 2009). Y que el miR-145 se ha propuesto como inhibidor el estado pluripotente y la capacidad de autorenovarse de estas células ya que ejerce una regulación negativa sobre genes asociados a pluripotencia como el factor de transcripción de unión a octámeros 4 (Oct4), el factor tipo Kruppel 4 (Klf4) y el factor de transcripción región Y determinante de sexo caja 2 (Sox2); e induce la diferenciación hacia linajes provenientes principalmente de las capas del mesodermo y ectodermo en un modelo de células troncales embrionales de humano (hESCs) (Morgado et al., 2016; Xu et al., 2009). También se ha identificado que los miR-145 y 199a actúan como moléculas clave en tumores gliales, en la inhibición de la migración, en la proliferación y en astrogliosis (Wohl & Reh, 2016).

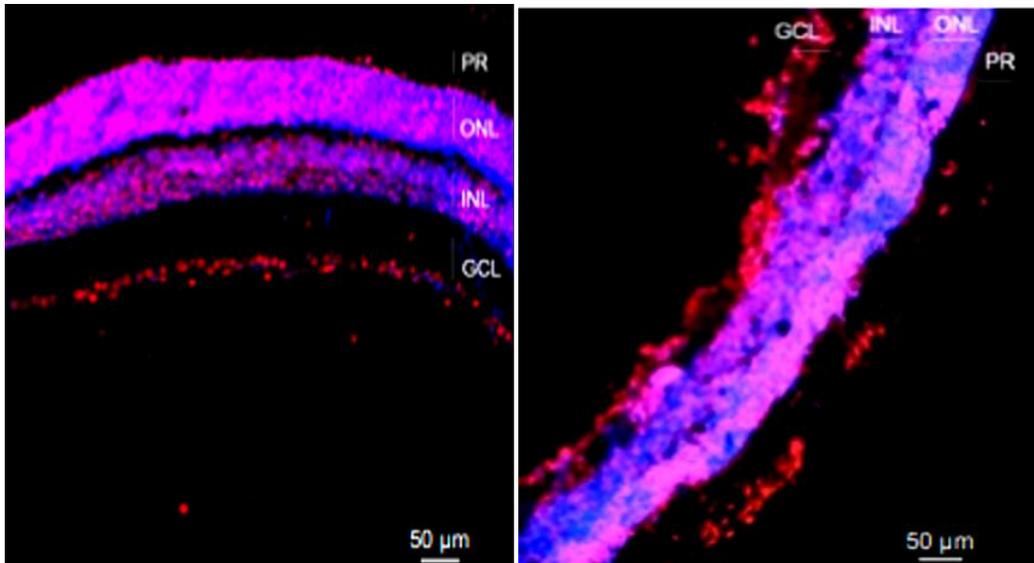
La familia miR-29a-c se ha identificado como clave en procesos de diferenciación, regeneración tisular y el estado de senescencia al regular la expresión de múltiples proteínas de matriz extracelular (ECM). A diferencia del embrión, la expresión de los miR-29 en el adulto impiden la expresión de genes de la ECM, dando como resultado una reparación del tejido con cicatriz. Además, se ha identificado que los miR-29 inducen el inicio de la senescencia en células progenitoras de músculo, promoviendo la atrofia muscular y la sarcopenia. La diferenciación de osteoblastos también es regulada por miR-29 mediante proteínas de la ECM, factores anti-osteogénicos y antagonistas de la vía de señalización de Wnt (Sen & Ghatak, 2015).

#### 1.10 Predicción bioinformática de mRNA diana de los miRNAs y vías principales de señalización de los miRNAs-29a, 143, 145, 199a, 199b\* y 214.

Los miRNAs pueden estar orquestando diferentes vías de señalización mediante la regulación de diferentes mRNA, lo que determinará las vías de señalización que están activas. Existen diferentes algoritmos de predicción *in silico*, como TargetScan, TarBase y microT-CDS, que relacionan los miRNAs con sus mRNA diana (Agarwal et al., 2015; Betel et al., 2008; Riffo-Campos et al., 2016). Por otro lado, el programa miRPath es capaz de relacionar los niveles de uno o más miRNAs con la o las vías más probablemente afectadas al integrar la base de datos de la Enciclopedia Kyoto de Genes y Genomas (KEGG) o la de ontología de genes (Vlachos et al., 2015). Estas herramientas son muy útiles para dar una primera impresión sobre la función molecular de los miRNAs a través de las vías de señalización donde están involucrados. Sin embargo, las predicciones tienen distintos criterios de inclusión y exclusión dependiendo del número de mRNA diana y de los nucleótidos que hibriden lo que incrementa las variables de los resultados predictivos. Para poder aseverar que esos miRNAs están regulando un proceso biológico en específico, es necesario que estas predicciones se comprueben experimentalmente.

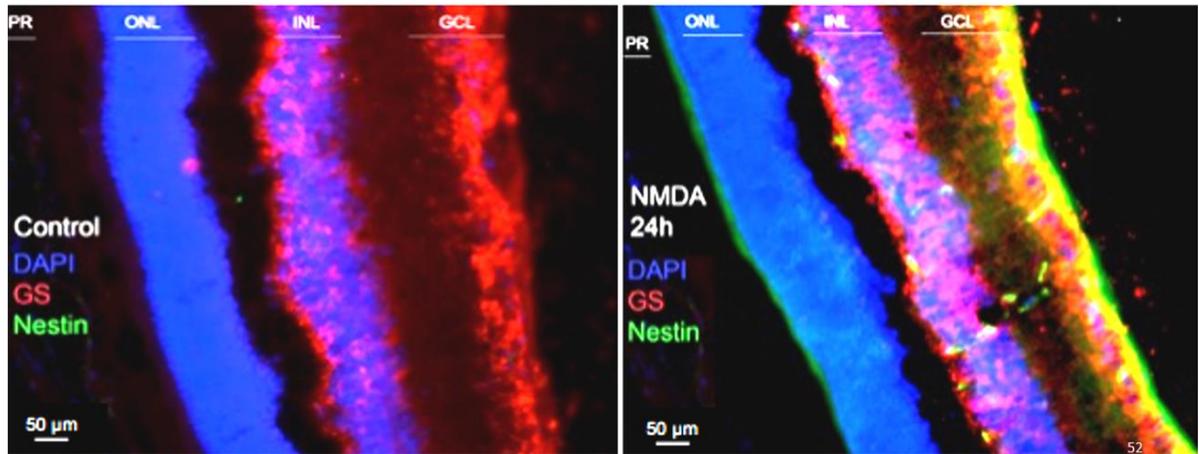
#### 1.11 Antecedentes directos

En el laboratorio se ha identificado que en modelos de daño por inyección intravítrea de NMDA (250 mM) en ratones adultos (2-3 meses) aumenta la muerte celular en la retina, especialmente en la capa de células ganglionares y la capa interna plexiforme como se muestra en la figura 2, donde se marcan los núcleos de rojo con la técnica de TUNEL en las células que están en procesos de apoptosis (Reyes-Aguirre & Lamas, 2016). Lo que concuerda con lo reportado por Karl y Reh, donde indican que el daño con NMDA promueve la muerte de las células ganglionares, amacrinas y horizontales, principalmente (Karl & Reh, 2012).



*Figura 8. Muerte celular identificada mediante TUNEL (control positivo con DNasas a la izquierda y grupo tratado a la derecha) tras inyección intravítrea con NMDA en ratones adultos. La capa de células ganglionares (GCL) desaparece a 24 h después de la administración con NMDA y la marca roja del TUNEL se observa a lo largo de la capa nuclear interna (INL) y externa (ONL). También se marca la capa de fotorreceptores (PR). Los núcleos están marcados con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).*

Para profundizar en la caracterización del modelo de daño, se realizó una inmunofluorescencia para nestina como marcador de progenitores neuronales y para GS como marcador de MG tras 24 h de la administración intravítrea de NMDA (250 mM). Se observa que existe expresión de nestina en el grupo tratado con NMDA y no en el grupo control, sugiriendo la adquisición de un fenotipo similar al de progenitores en la capa nuclear interna en el modelo de daño (Figura 3; Reyes-Aguirre & Lamas, 2016).



*Figura 9. Inmunofluorescencia con GS (rojo) como marcador para MG y nestina (verde) como marcador de progenitores neuronales y los núcleos de azul con DAPI de ratones adultos (2-3 meses). En el control no se observa marca de nestina pero sí la marca característica de GS con prolongaciones a lo largo de la capa nuclear interna (INL) y hasta la capa de células ganglionares (GCL). Al cabo de 24 h de la inyección intravítrea con NMDA se observa marca de nestina en algunas regiones de la INL y a lo largo de la GCL. PR corresponde a la capa de fotorreceptores.*

## 2. Justificación

En modelos animales de peces teleósteos, la regeneración retiniana es un proceso que ocurre de manera natural en respuesta al daño, ya que este inicia procesos de regeneración mediante la activación de diferentes células, principalmente la glía de Müller. Existen modelos de cultivos celulares de roedores donde se logra desdiferenciar a las células e inducir una diferenciación dirigida. Sin embargo, hay muy pocos estudios que analicen estos procesos en modelos de mamíferos *in vivo*, donde la capacidad regenerativa es extremadamente limitada.

Para poder inducir la desdiferenciación en las células es necesario cambiar su perfil de expresión génica y promover la expresión de genes asociados a un estado progenitor. La regulación de la expresión génica está influenciada en parte por los miRNAs y su papel específico en la respuesta de la glía de Müller (MG) ante el daño en un modelo de ratones adultos aún no se conoce bien, por lo que el presente proyecto pretende develar los procesos moleculares que involucran a los miRNAs en un modelo de daño y de desdiferenciación en la retina en ratones adultos, con el fin de obtener un panorama más claro sobre el limitado proceso de regeneración retiniana en mamíferos adultos.

### 3. Hipótesis

Si los miRNAs miR-29a, 143, 145, 199a-5p, 199b\*, 214 se sobreexpresan en la glía de Müller, mantienen su fenotipo glial y evitan la expresión de genes asociados a progenitores neurales, entonces su expresión deberá disminuir en respuesta al daño y durante el proceso de desdiferenciación *in vivo* e *in vitro*.

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo general

Evaluar los cambios de expresión de los miR-29a, 143, 145, 199a-5p, 199b\*, 214 en la retina completa y específicamente en las células de Müller en respuesta al daño y en el proceso de desdiferenciación.

### 4.2 Objetivos particulares

1. Evaluar los cambios en la expresión del miR-145 en dos modelos de desdiferenciación de las células de Müller en cultivo.
2. Analizar *in silico* las posibles vías de señalización que podrían estar reguladas por los miR-29a, 143, 145, 199a-5p, 199b\*, 214.
3. Analizar un curso temporal de la expresión de los miR-29a, 143, 145, 199a-5p, 199b\*, 214 en la retina completa en un modelo de daño retiniano por excitotoxicidad con NMDA *in vivo*.
4. Analizar un curso temporal de la expresión de los miR-29a, 143, 145, 199a-5p, 199b\*, 214 en la glía de Müller en un modelo de daño retiniano por excitotoxicidad con NMDA *in vivo*.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1 Manejo de animales

Todos los animales de este proyecto fueron tratados según los lineamientos del Comité Interno para el Cuidado y el Uso de Animales de Laboratorio del CINVESTAV (CICUAL-CINVESTAV, número de protocolo 0259-17), de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y de la declaración para el uso de animales en investigación oftálmica de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (ARVO). Los animales tuvieron acceso *ad libidum* a comida y agua y se mantuvieron bajo el ciclo de luz:oscuridad de 12 h a 25°C ±3.

### 5.2 Cultivo primario de glía de Müller (MG)

Se enuclearon los ojos de ratones C57BL/6J (Jax Mice, Jackson Laboratoy, Cat. No. 000664), negros, con ocho días postnatales (PN8) y se colocaron en medio Dulbecco's Eagle modificado reducido en suero (Opti-MEM I, GIBCO) con suero fetal bovino (FBS, GIBCO) 4%, antibiótico penicilina-estreptomicina 1:1000 (GIBCO), durante toda la noche en oscuridad. Al día siguiente se transfirieron los ojos a medio DMEM (GIBCO) con tripsina 0.1% y colagenasa 70 U/mL (Sigma) y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. La reacción se detubo agregando medio DMEM/FBS 4%/antibiótico penicilina-estreptomicina 1:1000. Las retinas se extrajeron, disociaron y homogenizaron mecánicamente por pipeteo y se sembraron en Flask de 75 cm<sup>2</sup> (Corning) con medio DMEM/FBS 4%/antibiótico penicilina-estreptomicina 1:1000. Se sembraron aproximadamente 2-3 retinas homogenizadas por Flask y se mantuvieron a 37°C con CO<sub>2</sub> 5% en incubadora estéril. Al día siguiente, se cambió el medio por medio fresco y se dejó crecer hasta alcanzar una confluencia del 80% (Figura 10).

### 5.3 Tratamiento con glutamato en cultivo de MG

Se sembraron alrededor de 200 000 células de Müller en placas de 6 pozos (Corning) provenientes del cultivo primario confluyente con 0.5-1 mL de medio DMEM/FBS 4%/antibiótico penicilina-estreptomicina 1:1000/glutamato 100 µM por pozo y se incubaron a 37°C con CO<sub>2</sub> 5% en incubadora estéril con el estímulo por 12, 24, 48 y 96 h (Figura 10).

#### 5.4 Tratamiento con FGF2 y EGF en cultivo de MG

Se sembraron 200 000 células de Müller provenientes del cultivo primario confluyente (80%) en placas de 6 pozos (Corning) con 2 mL de medio Opti-MEM (GIBCO), 0.44% glucosa (Sigma), 0.01% albúmina sérica bovina (BSA), 10% N2, filtrado y enriquecido con FGF2 (PeproTech Mexico) 20 ng/mL y EGF (PeproTech Mexico) 20 ng/mL y se incubaron a 37°C con CO<sub>2</sub> 5% en incubadora estéril por 12, 24, 48 y 96 h (Figura 10).

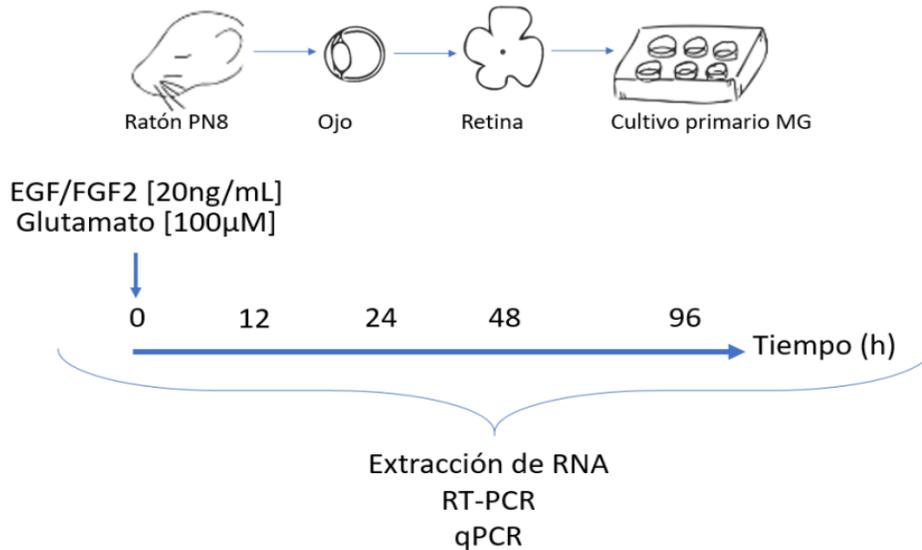
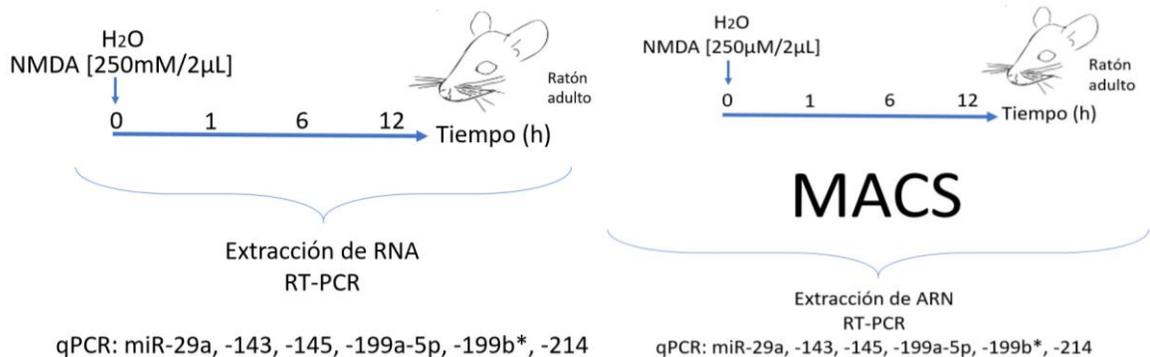


Figura 10. Preparación del cultivo primario de MG a partir de ojos extraídos de ratones C57BL/6J con ocho días de nacidos. Cuando el cultivo es confluyente al 80% inducir los modelos de desdiferenciación utilizando glutamato (100 µM) o los factores de crecimiento EGF/FGF2 (20 ng/mL cada uno). Extraer de RNA total para el posterior análisis por qPCR a 12, 24, 48 y 96 h tras el estímulo.

#### 5.5 Modelo de daño retiniano mediante la inyección intravítrea de NMDA *in vivo*

Se anestesiaron los ratones C57BL/6J adultos (2-3 meses) con pentobarbital (0.1 mg/10 g de peso) vía intraperitoneal (i. p.). Se administró una gota de tropicamida/fenilefrina para dilatar la pupila y otra gota de tetracaína para anestesiarse el ojo. Se fijó la cabeza de los ratones a un *Headholder* bajo un microscopio estereoscópico y con la punta de una aguja de 30 g se realizó la primera incisión en parte superior derecha de la *ora serrata*. Después se administró NMDA (Sigma) 250 mM/2 µL de agua inyectable con ayuda de una jeringa Hamilton dentro del humor vítreo a través de la incisión. Finalmente, se agregó una gota de ácido poliacrílico en gel para ayudar a cerrar la herida y se regresaron los ratones a sus cajas con alimento y agua *ad libitum* para su recuperación.

Las retinas después se extrajeron para realizar el análisis de expresión génica. En el primer modelo, se extrajeron las retinas completas a 0, 1, 6 y 12 horas de la inyección de NMDA (Figura 11 izquierda). En el segundo modelo, se extrajeron las retinas a los mismos tiempos y se separaron las células de MG mediante MACS (Figura 11 derecha). Al final de ambos modelos, se extrajo el RNA total para el análisis de la expresión de los miR-29a, 143, 145, 199a, 199b\* y 214 mediante qPCR.

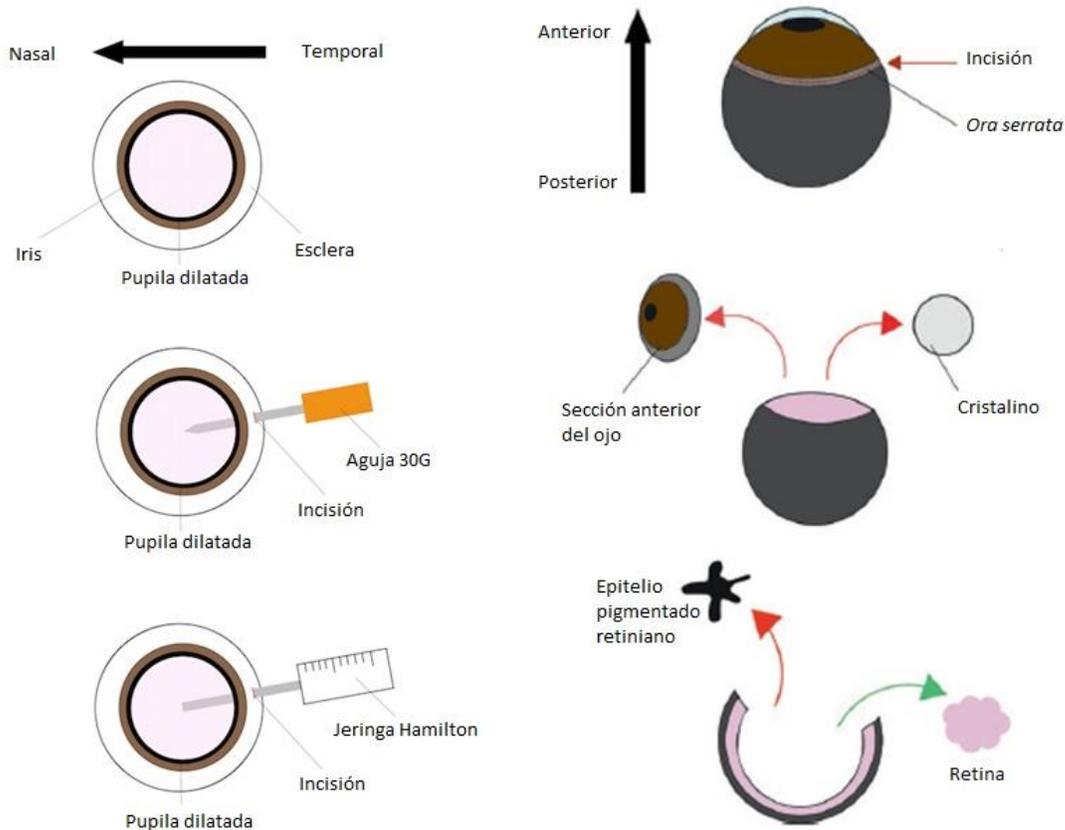


*Figura 11. Cinética de expresión de los seis miRNAs enriquecidos en la MG en un modelo de daño retiniano in vivo en retinas completas de ratones C57BL/6J adultos (2-3 meses), extrayendo la retina completa a diferentes tiempos (0, 1, 6, 12 h) tras la inyección intravítrea de NMDA (250 mM/2µl) o agua inyectable como control del vehículo (izquierda). Cinética de expresión de los seis miRNAs enriquecidos en la MG en un modelo de daño retiniano in vivo en la fracción positiva a GLAST como marca de MG extraídas de la retina de ratones C57BL/6J adultos (2-3 meses) a diferentes tiempos (0, 1, 6, 12 h) tras la inyección intravítrea de NMDA (250 mM/2 µl) o agua inyectable como control del vehículo (derecha)..*

### 5.6 Extracción de retinas de animales con modelo de daño por NMDA

Al haber transcurrido 1, 6 y 12 h después de realizar el daño con NMDA, se sacrificaron los ratones por sobredosis de pentobarbital sódico (i. p. 0.01 g, PiSA) o utilizando la cámara de CO<sub>2</sub> por 3-5 minutos. Se decapitaron y los ojos fueron enucleados utilizando tijeras curvas para después ser colocados en PBS frío. Se cortó la córnea con un bisturí, se abrió el ojo con pinzas y se extrajo la retina (Figura 12). La disección se realizó rápida y en hielo para disminuir la degradación del tejido. En caso del estudio de retinas completas, se colocó el tejido directamente en 500 µL de TRIzol (Sigma) y se congeló a -80°C hasta procesar las muestras. En caso de los estudios con la separación por MACS después de la extracción, se colocaron las retinas en medio DMEM (GIBCO) sin suero, con tripsina 0.05% (PAA) y colagenasa 70 U/mL (Sigma) por 30 minutos a 37°C, se detuvo la reacción con medio

DMEM/FBS 4%/antibiótico penicilina-estreptomina 1:1000. Las retinas se disociaron y homogeneizaron por pipeteo y se prosiguió con el protocolo de separación celular activada por imanes (MACS, Miltenyi Biotec) siguiendo las indicaciones del fabricante.

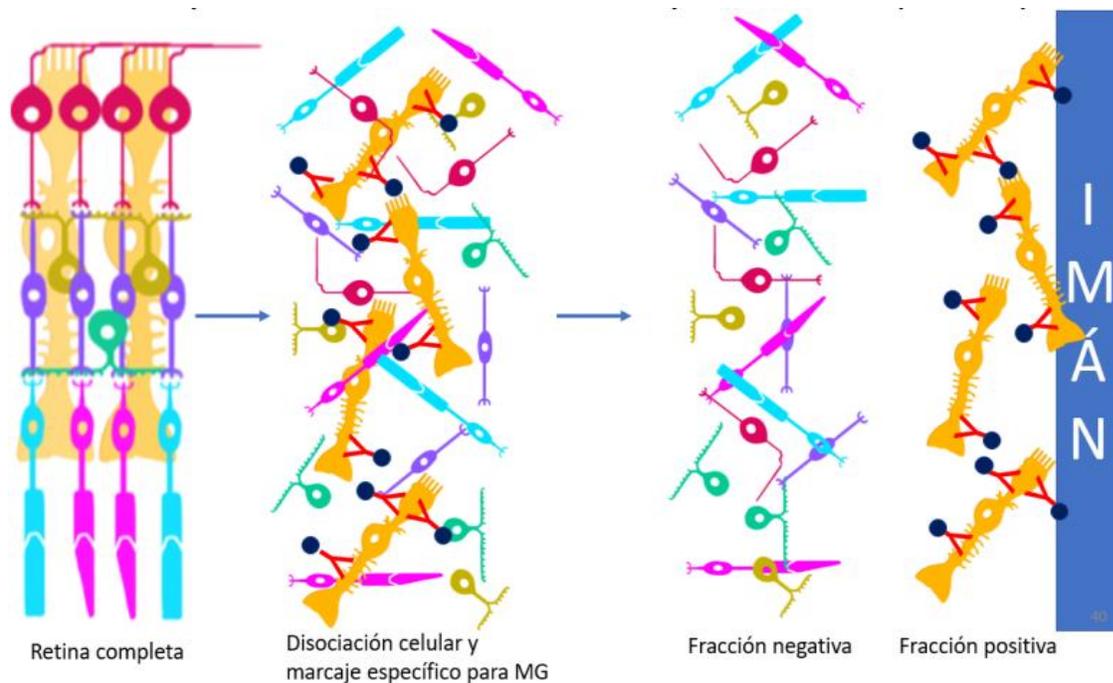


*Figura 12. Inyección intravítrea y extracción de la retina. Se realizó la incisión en un ojo con una aguja de 30 g en un ángulo de 45° sobre el eje nasal temporal y después se inyectó en el espacio del humor vítreo la solución a estudiar (vehículo como control o NMDA en el modelo de daño). Después de transcurrir el tiempo deseado (1, 6, 12 h), se enuclean los ojos, se retira la parte anterior del ojo junto con el cristalino y se prosigue a retirar la retina evitando la contaminación de la muestra con epitelio pigmentado, el cual será de color café oscuro en la cepa de ratones C57BL/6J.*

### 5.7 Separación celular activada por imanes (MACS)

La separación por MACS se realizó siguiendo el protocolo del fabricante del kit Anti-GLAST (ACSA-1) MicroBead kit (MACS Miltenyi Biotec). En resumen, se disociaron las retinas mediante digestión con tripsina 0.25% de 15-30 minutos a 37°C, parando la reacción con medio DMEM/FBS 4%/antibiótico penicilina-estreptomina 1:1000. Las retinas se disociaron de manera mecánica por pipeteo y se centrifugaron a 2000 rpm (300 x g) por 5

minutos. El pellet se resuspendió en 1 mL de buffer MACS (PBS 1x, EDTA 2 mM, BSA 0.5%, filtrado y pH=7.2) para contar las células (10µL de la suspensión celular + 10 µL de azul de tripano 0.5%) utilizando una cámara de Neubauer y calcular el número de células por mililitro utilizando la siguiente fórmula:  $\frac{\# \text{ células}}{\# \text{ pozos}} * \text{factor de dilución} (2) * 10\ 000 = \frac{\text{células}}{\text{mL}}$ . El mejor rendimiento se obtiene al trabajar con  $5*10^6$  células y el kit permite escalar las cantidades hacia arriba si se cuenta con mayor número de células. Las células se centrifugaron de nuevo a 2000 rpm por 10 minutos y se resuspendieron en 80 µL del buffer MACS. Se incubaron con 20 µL del anticuerpo primario Anti-GLAST-Biotin por 10 minutos a 2-8°C, se lavaron las células con 1-2 mL de buffer MACS y se repitió la centrifugación. Se agregaron 80 µL del buffer MACS y se incubaron con 20 µL del anticuerpo secundario acoplado a la perla magnética Anti-Biotin MicroBeads por 15 minutos a 2-8°C. Se lavaron las células con 1-2 mL de buffer MACS y se centrifugaron de nuevo a 2000rpm por 10 minutos. Posteriormente se resuspendieron en 500 µL de buffer MACS y se agregaron a la columna magnética LS Column (MACS Miltenyi Biotec) previamente activada con 3 mL de buffer MACS y colocada en el imán. En caso de identificar agregados celulares o restos que pudieran tapan la columna se colocó un filtro previo a esta. Se lavaron las células 3 veces con 3 mL de buffer MACS eluyendo aquellas que no fueron marcadas con el anticuerpo primario y se recolectaron como la fracción negativa (GLAST-). Después se separó la columna del imán, se agregaron 5 mL de buffer MACS e inmediatamente se presionó el émbolo para eluir la fracción celular marcada con los anticuerpos y se recolectó como la fracción positiva (GLAST+), correspondiente a la MG (Figura 13). Finalmente, se centrifugaron las fracciones a 2000 rpm por 5 minutos y se les agregó TRIZOL (Sigma) para la extracción de RNA total posterior. Las muestras se almacenaron a -80°C.



*Figura 13. Método de separación celular asistida por imanes (MACS) con la cual se separa específicamente a la MG de la retina completa. Primero se disocia la retina y se marca con un anticuerpo primario específico al transportador de glutamato aspartato (GLAST) en la membrana celular de la MG. Después se le acopla una perla magnética al anticuerpo primario y se separan las fracciones al introducir las en una columna sensible al campo magnético. Primero se eluye la fracción negativa correspondiente las células no marcadas de la retina y después se eluye la fracción positiva correspondiente a la MG cuando se retira la columna del imán, permitiendo el desprendimiento de las células marcadas.*

### 5.8 Extracción de RNA con TRIzol

Se extrajo el RNA total de los cultivos, retinas completas y fracciones Glast $\pm$  del MACS mediante la técnica de ácido fenol-guanidinio-tiocianato-cloroformo. Se agregó TRIzol (Sigma) 0.5 mL a los cultivos y a las fracciones del MACS y 1 mL a las retinas completas. Se homogeneizó el tejido por pipeteo y, en caso de ser necesario, se sonicaron las muestras para completar la disociación. Se agregaron 0.3 mL de cloroformo, se incubó por 15 segundos en hielo y se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos a 4°C. Se recolectó la fase acuosa y se agregó su mismo volumen de isopropanol (Sigma) frío para precipitar el RNA total. Se dejó precipitar a -80°C por 2 h mínimo. Se centrifugó a 14,000 rpm por 20 minutos a 4°C. Se lavó el pellet con etanol al 75% (Reactivos Química Meyer) dos veces. Se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se decantó y dejó secar hasta que se

evaporó el resto del etanol y se resuspendió en 25 µL de agua libre de RNAsas. Por último, se cuantificó la muestra por espectrometría utilizando NanoDrop y se verificó su integridad mediante un gel de agarosa (Sigma) 1.5% revelado con bromuro de etidio.

#### 5.9 Reacción en cadena de la polimerasa tras reverso transcripción (RT-PCR)

Se sintetizó 1 ug de DNA complementario (cDNA) de RNAm mediante un kit de Oligo dT y transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen) y 1 ug de cDNA de miRNA con el kit miScript II RT (QIAGEN) siguiendo las instrucciones de los respectivos fabricantes. Se utilizaron diferentes kits debido a que los miRNAs no tienen una cola de poliA en el extremo 3' y debe agregárseles antes de realizar la transcripción reversa.

#### 5.10 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Se amplificaron y cuantificaron de manera específica los miRNAs utilizando el kit QuantiTec SYBR Green PCR kit (QIAGEN) y los mRNA con el kit SYBR FAST qPCR kit (KAPA) en el equipo PikoReal 96 (Thermo Scientific). Los oligonucleótidos tienen las secuencias de la tabla 1. La expresión fue relativa a los genes de referencia RNU6B para los miRNAs y a gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) para los mRNA y se normalizaron los datos contra el control propio de cada grupo. Se comprobó que sólo hubiera un producto amplificado y se extrajo el valor Ct para realizar el análisis estadístico.

| Gen                     | Oligo                            | Tm °C | Compañía |
|-------------------------|----------------------------------|-------|----------|
| <b>Mm-miR-29a_1</b>     | miScript Primer Assay MS00001372 | 55    | QIAGEN   |
| <b>Mm_miR-143_1</b>     | miScript Primer Assay MS00001617 | 55    | QIAGEN   |
| <b>Mm_miR-145_1</b>     | miScript Primer Assay MS00001631 | 55    | QIAGEN   |
| <b>Mm_miR-199a-5p_1</b> | miScript Primer Assay MS00032529 | 55    | QIAGEN   |
| <b>Mm_miR-199b*_2</b>   | miScript Primer Assay MS00032536 | 55    | QIAGEN   |
| <b>Mm_miR-214_2</b>     | miScript Primer Assay MS00032571 | 55    | QIAGEN   |
| <b>Hs_RNU6-2_1</b>      | miScript Primer Assay MS00033740 | 55    | QIAGEN   |

*Tabla 1. Información sobre los oligonucleótidos utilizados para la PCR en tiempo real.*

Se realizó la diferencia entre los valores Ct del gen de interés y el gen de referencia y otra entre el grupo tratado y el grupo control. Este resultado, fue el exponente negativo con base 2 y se expresó como ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) siguiendo el método de doble delta Ct reportado por Livak y Schmittgen (Livak & Schmittgen, 2001). Este método sólo se aplica si las eficiencias de ambos genes fueron similares y se encuentren dentro de un rango de

eficiencia de 100%  $\pm$ 10. Para comprobar que el gen endógeno de referencia se mantenía con una expresión constante a lo largo de los tratamientos y en las diferentes condiciones se utilizó el método de  $2^{-\Delta C_t}$  y se realizó el análisis estadístico (Figura en apéndice). Para evitar variaciones que conlleven a resultados erróneos, se mantuvieron constantes las concentraciones de todas las muestras desde la extracción de la muestra, la RT-PCR y la qPCR (Huggett et al., 2005).

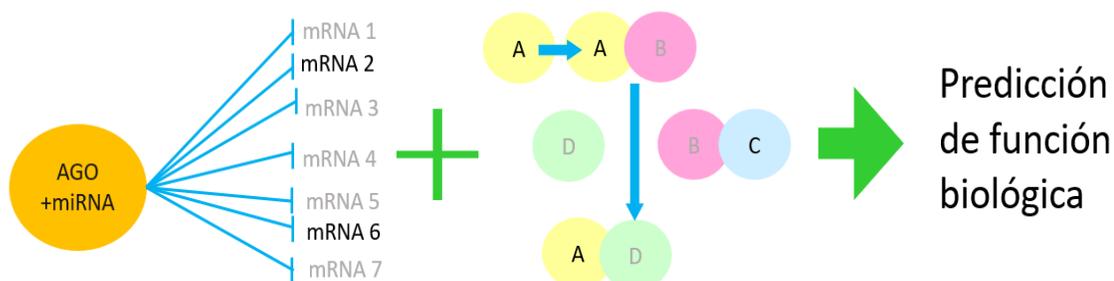
#### 5.11 Análisis estadístico

Se realizó la estadística no paramétrica con la prueba de Kruskal-Wallis y *post hoc* Tukey. En caso de que la prueba de Tukey sugiriera que la significancia se encontraba en el límite de sensibilidad de la prueba, se realizó una prueba adicional de U de Mann-Whitney y se compararon los grupos por pares. En el caso de que se compararan sólo dos grupos, se aplicó la prueba de T de Student. Para las pruebas en las que todos los grupos pasaban las pruebas de normalidad, se aplicó la prueba ANOVA de una vía con *post hoc* Holm-Sidak, comparando contra el control, y con *post hoc* Dunnett comparando los diferentes grupos entre sí. Las significancias se colocan acordes a los valores  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) y  $p < 0.001$  (\*\*\*)).

#### 5.12 Análisis de las vías de señalización en las que están involucrados los miRNAs.

Para estudiar la interacción de los miRNAs con sus posibles mRNA diana y las vías de señalización en las que están involucrados se utilizó el programa DIANA TOOLS (<http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr/>), escribiendo los miRNAs con el siguiente formato mmu-miR-29a-5p. En este proyecto, se utilizó el mirPath v.0 con la información de la base de datos de los miRNAs miRBase versión 21. Para predecir las vías de señalización reguladas por los miRNAs se utilizó la pestaña de análisis de KEGG. Se seleccionó la especie animal y el tipo de algoritmo (TargetScan, TarBase o microT-CDS) con el que se quierían predecir los mRNA diana. Los programas tienen diferentes criterios de inclusión, por lo que también se ajustaron estos criterios a el valor- $P \leq 0.05$  para todos los algoritmos, el umbral  $\text{MicroT} \leq 0.8$  para microT-CDS y los valores de  $\text{Context} + \leq -0.4$  y  $\text{Conservation} \leq 0.1$  en TargetScan. Con el fin de conocer la función biológica de los miRNAs, los mRNA predichos se correlacionaron con las vías de señalización en KEGG (Figura 14). Para estudiar las diferentes interacciones se seleccionó la opción "genes union" para ver todos

los genes diana que estaban predichos por los algoritmos; "genes intersection" para ver los genes que eran blancos redundantes de los miRNAs; "pathway union" para ver todas las vías de señalizaciones en las que estaban involucrados los miRNAs y "pathway intersection" para ver las intersecciones entre las vías de señalización que estaban reguladas por los miRNAs.



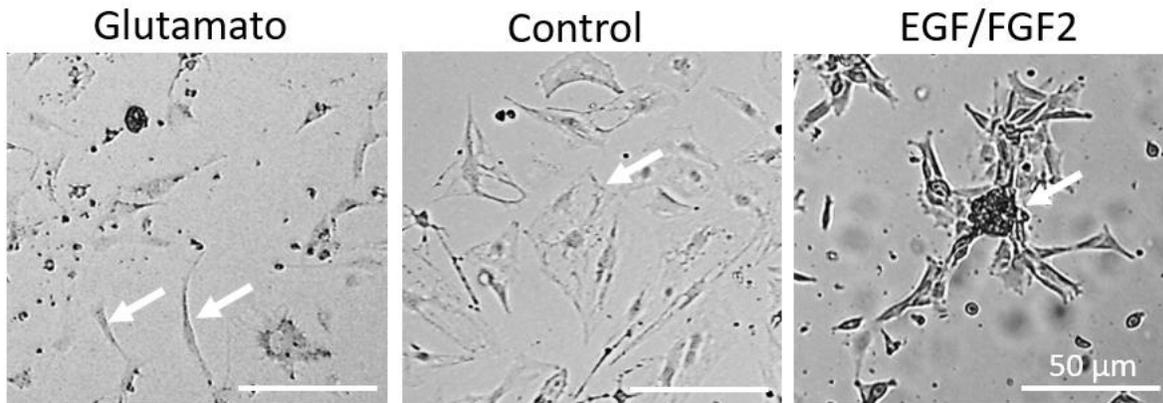
*Figura 14. Predicción de mRNAs diana utilizando DIANA TOOLS, el cual combina algoritmos con diferentes criterios de inclusión como TarBase, TargetScan y microT-CDS para predecir los mRNAs que más probablemente sean diana de los miRNAs a estudiar y después se correlacionan estos mRNA blanco con las vías de señalización en KEGG, prediciendo las posibles funciones biológicas de los miRNAs.*

## 6. Resultados

### 6. 1 Resultados obtenidos en el modelo de cultivo primario de glía de Müller (MG).

#### 6.1.1 Evaluación de la expresión del microRNA-145 en dos modelos de desdiferenciación de la MG en cultivo.

Para la caracterización de la expresión del miR-145 durante el proceso de desdiferenciación, se utilizaron dos modelos de inducción previamente descritos en cultivos de primarios de MG de ratones con ocho días postnatales. En el primer modelo se agregó glutamato (100  $\mu$ M), mientras que en el segundo se agregaron el factor de crecimiento epitelial (EGF) junto con el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2) a 20 ng/mL cada uno. Normalmente, las células de Müller se adhieren a la placa y presentan una morfología característica de forma estrellada con numerosas prolongaciones citoplasmáticas. El tratamiento de 96 h con glutamato (100  $\mu$ M) y con EGF/FGF2 (20 ng/mL cada uno) indujeron cambios morfológicos. En los cultivos tratados con glutamato se obtuvieron células con morfología alargada, mientras que con los factores de crecimiento EGF/FGF2 se observaron agregados celulares similares a las neuroesferas que aparecen en cultivos de células troncales neuronales, las cuales pueden despegarse y cultivarse en flotación (Figura 15).



*Figura 15. Fotografía representativa del cultivo primario de MG control (centro), con tratamiento de glutamato 100  $\mu$ M por 96 h (izquierda) y con tratamiento con factores de crecimiento EGF/FGF2 (20 ng/mL cada uno) por 96 h (derecha) utilizando microscopía de campo claro donde se observaron cambios morfológicos. Las flechas indican la morfología característica obtenida con cada tratamiento, así como la morfología característica estrellada y con prolongaciones en el grupo control. Aumento 20x, barra 50  $\mu$ M (n=4).*

6.1.2 La expresión del microRNA-145 en los cultivos primarios de MG cambia dependiendo del modelo de dediferenciación.

Se evaluó la expresión del miR-145 al cabo de 96 h en cultivos control y después de inducirlos a la dediferenciación con glutamato (100  $\mu$ M) y con EGF/FGF2 (20 ng/mL cada uno). Se observó que el tratamiento con glutamato no produce cambios estadísticamente significativos en la expresión del miR-145, mientras que el tratamiento con EGF/FGF2 reduce la expresión de este miRNA hasta aproximadamente un 50% con respecto al cultivo control (Figura 16).

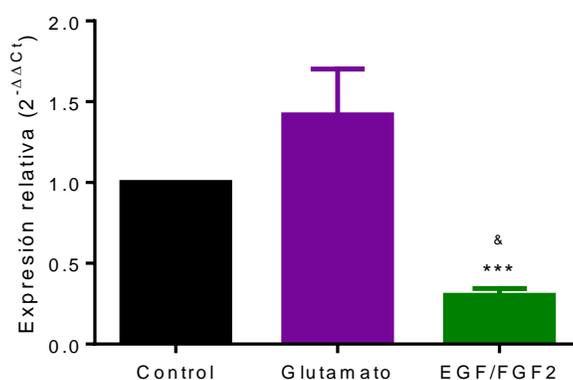


Figura 16. Expresión relativa a RNU6B de miR-145 en los cultivos primarios de MG tratados 96 h con glutamato (100  $\mu$ M) y EGF/FGF2 (20 ng/mL cada uno) normalizados con el control utilizando qPCR. El grupo con EGF/FGF2 muestra una disminución significativa en la expresión del miR-145 con respecto al grupo control y al grupo tratado con glutamato. Prueba estadística de Kruskal-Wallis con post hoc Holm-Sidak al comparar contra el control y método de Dunn al comparar los tratamientos entre sí. ( $P < 0.001$  \*\*\* contra control,  $P < 0.05$  & entre tratamientos,  $n = 6$ )

El resultado anterior reforzó la importancia de estudiar la cinética de expresión del miR-145 a tiempos cortos (12, 24, 48 y 96 h). En estas condiciones, el tratamiento con glutamato no afecta de forma significativa la expresión de miR-145 en ninguno de los tiempos evaluados. Sin embargo, en presencia de EGF/FGF2 se observa una reducción significativa de la expresión de miR-145, aproximadamente de la mitad del nivel basal, a partir de las 24 h del tratamiento (Figura 17).

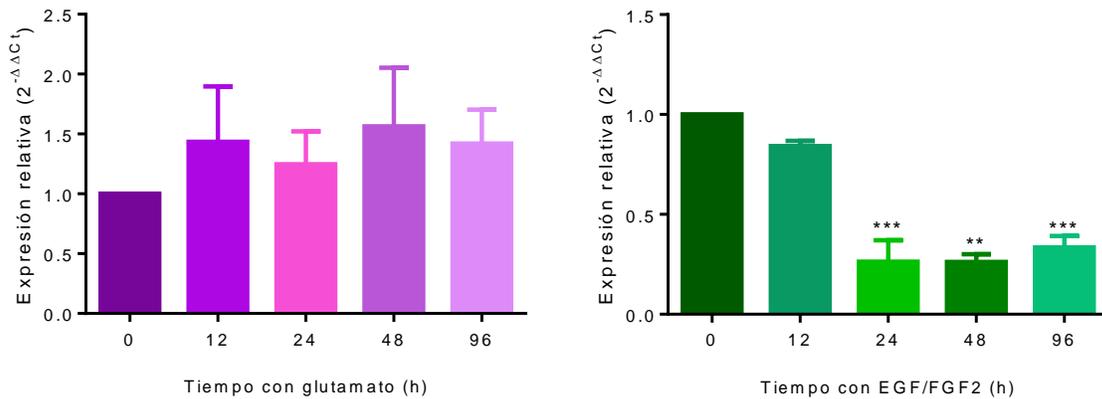


Figura 17. Expresión relativa a RNU6B de miR-145 en los cultivos primarios de MG tratados a diferentes intervalos de tiempo con glutamato (100 μM, izquierda) y EGF/FGF2 (20 ng/mL cada uno, derecha) normalizados con el control utilizando qPCR. Prueba estadística ANOVA de una vía con post hoc Holm-Sidak al comparar contra el control y método de Dunn al comparar los tratamientos entre sí. ( $P < 0.001$ \*\*\*,  $P < 0.05$ \*\* contra control,  $n = 3$ )

### 6.1.3 El miR-145 se encuentra sobreexpresado en la MG *in vitro* y no *in vivo*.

Con el fin de hacer la extrapolación hacia un modelo de daño y regeneración *in vivo* realizamos la comparación de los niveles de expresión del miR-145 utilizando qPCR entre los cultivos primarios de MG y la MG obtenida directamente de la retina completa aislada mediante MACS. El resultado de estos experimentos confirmó que existe una sobreexpresión del miR-145 en la MG en condiciones de cultivo (Figura 18). Esto corrobora que en nuestras condiciones se identifica un fenómeno similar a lo reportado por Wohl y Reh, donde describen un aumento en la expresión de ciertos miRNAs cuando se realizan cultivos de MG en comparación a condiciones *in vivo* (Wohl & Reh, 2016).

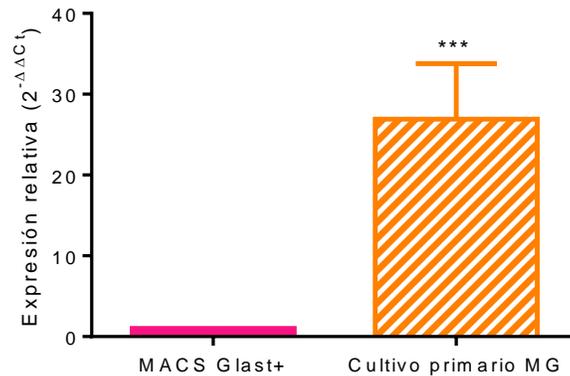


Figura 18. Expresión relativa a RNU6B de miR-145 medido por qPCR de los cultivos primarios de MG (in vitro) y de la MG específicamente seleccionada por su expresión de Glast mediante MACS a partir de retinas completas (in vivo). Prueba estadística t Test,  $P < 0.001$ \*\*\*,  $n = 6$ .

## 6.2 Resultados obtenidos *in silico*.

### 6.2.1 Predicción *in silico* de las vías de señalización reguladas por los seis miRNAs enriquecidos en la glía de Müller.

Se realizó la predicción *in silico* de las vías de señalización en las que podían estar involucrados los seis miRNAs (miRNAs-29a, 143, 145, 199a, 199b\*, 214) enriquecidos en la MG (Quintero et al., 2016), utilizando la herramienta mirPath v.3. Este programa utiliza algoritmos de predicción de mRNAs diana de los miRNAs de interés con vías de señalización en las que estos genes están involucrados según la base de datos KEGG. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2. Los algoritmos de predicción de mRNAs diana tienen diferentes criterios de inclusión y exclusión lo que se ve reflejado en las diferentes predicciones. Sin embargo, existen coincidencias entre los algoritmos, por ejemplo en las vías de señalización involucradas en la interacción con el receptor a matriz extracelular, la vía de Hippo y la de proteoglicanos en cáncer (Tabla 2). Estas predicciones pueden ayudar a identificar vías o genes que podrían estar relacionados con los miRNAs deseados, con la necesidad de comprobar estas interacciones experimentalmente.

| Vías de señalización   | Targetscan | TarBase | microT-CDS |
|--|------------|---------|------------|
| Vía de señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) | ●          | ●       |            |
| Guía de axones   | ●          |         |            |
| <b>Proteoglicanos en cáncer</b>  | ●          |         | ●          |
| <b>Interacciones con el receptor de la matriz extracelular (ECM)</b>             | ●          |         | ●          |
| <b>Vía de señalización de Hippo</b>  |            | ●       | ●          |
| Vía de señalización de Wnt   |            |         | ●          |
| Moléculas de adhesión celular (CAMs)   |            |         | ●          |
| Biosíntesis del O-glicano tipo mucin   |            |         | ●          |
| Degradación de lisina  |            | ●       |            |
| Enfermedad de Huntington   |            | ●       |            |
| Metabolismo de xenobióticos por citocromo P450                                   |            | ●       |            |
| Biosíntesis de esteroides  |            | ●       |            |

Tabla 2. Predicción de función biológica de los miRNAs mediante el análisis in silico utilizando el programa DIANA TOOLS (mirPath v.3), que con ayuda de tres algoritmos diferentes (TargetScan, TarBase y microT-CDS) predice los mRNAs diana reguladas por los miRNAs-29a, 143, 145, 199a-5p, 199b\*, 214 los cuales después se relacionan con las vías de señalización reportadas en la Enciclopedia Kyoto de Genes y Genomas (KEGG). Se muestran las vías que tienen valor  $P < 0.05$  y en negritas aquellas vías en las que dos algoritmos coinciden.

6.2.2 La secuencia de los miRNAs-29a, 143, 145, 199a-5p, 199b\*, 214 está conservada tanto en ratones como en humanos.

La conservación entre las secuencias génicas entre diferentes especies generalmente se asocia con una conservación funcional y, por ende, una gran importancia evolutiva. Al analizar el grado de conservación de las secuencias semillas de los seis miRNAs

enriquecidos en la MG, utilizando la base de datos TargetScan Mouse versión 7.1, se encontró que los seis miRNAs estudiados en el ratón conservan la misma secuencia semilla entre varias especies, incluyendo el humano (Tabla 3).

| <b>Familia de microRNA en ratón</b> | <b>Región semilla del 2<sup>do</sup>-8<sup>vo</sup> nucleótido</b> | <b>Familia de microRNA conservados en otras especies</b>   |
|-------------------------------------|--|--|
| miR-29a-5p                          | CUGAUUU  | mmu-miR-29a-5p, hsa-miR-29a-5p, rno-miR-29a-5p   |
| miR-143-5p<br>miR-1930-3p           | GUGCAGU  | mmu-miR-143-5p, mmu-miR-1930-3p, hsa-miR-143-5p, rno-miR-143-5p  |
| miR-145-5p                          | UCCAGUU  | mmu-miR-145-5p, mmu-miR-145b, bta-miR-145, cfa-miR-145, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-5195-3p, mdo-miR-145-5p, mml-miR-145-5p, ptr-miR-145, rno-miR-145-5p, xtr-miR-145  |
| miR-199-5p                          | CCAGUGU  | mmu-miR-199a-5p, mmu-miR-199b-5p, bta-miR-199a-5p, bta-miR-199b, gga-miR-199-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-199b-5p, mdo-miR-199b-1-5p, mml-miR-199a, mml-miR-199a-5p, ptr-miR-199a-5p, rno-miR-199a-5p, xtr-miR-199a-5p, xtr-miR-199b |
| miR-199-3p                          | CAGUAGU  | mmu-miR-199a-3p, mmu-miR-199b-3p, bta-miR-199a-3p, cfa-miR-199, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-199b-3p, hsa-miR-3129-5p, mdo-miR-199b-3p, mml-miR-199a-3p, ptr-miR-199a-3p, -miR-199b, ptr-miR-3129, rno-miR-199a-3p                       |
| miR-214-5p                          | GCCUGUC  | mmu-miR-214-5p, hsa-miR-214-5p, rno-miR-214-5p, mml-miR-214-5p   |

*Tabla 3. Conservación y homologías entre las regiones semilla de los miRNAs entre diferentes especies, incluyendo a bta: Bos taurus, cfa: Canis familiaris, gga: Gallus gallus, hsa: Homo sapiens, mdo: Monodelphis domestica, mml: Macaca mulatta, mmu: Mus musculus, ptr: Pan troglodytes, rno: Rattus norvegicus y xtr: Xenopus tropicalis. (Whitehead Institute for Biomedical Research, 2018)*

### 6.3 Resultados obtenidos en el modelo experimental *in vivo*.

6.3.1 La expresión de los miRNAs-29a, 143, 145, 199a-5p, 199b\*, 214 no cambia significativamente en la retina completa en un modelo de daño excitotóxico por inyección intravítrea de NMDA a tiempos cortos.

Se realizaron estudios de cambio de expresión de los seis miRNAs mediante qPCR en la retina completa tras la administración intravítrea del agente de daño por excitotoxicidad NMDA (Figura 19). Como control del experimento se realizó una inyección intravítrea del vehículo, que en este caso fue agua inyectable. Todos los tiempos se compararon contra ojos intactos. Los resultados muestran que el tratamiento con NMDA no induce cambios estadísticamente significativos en la expresión de ninguno de los miRNAs analizados.

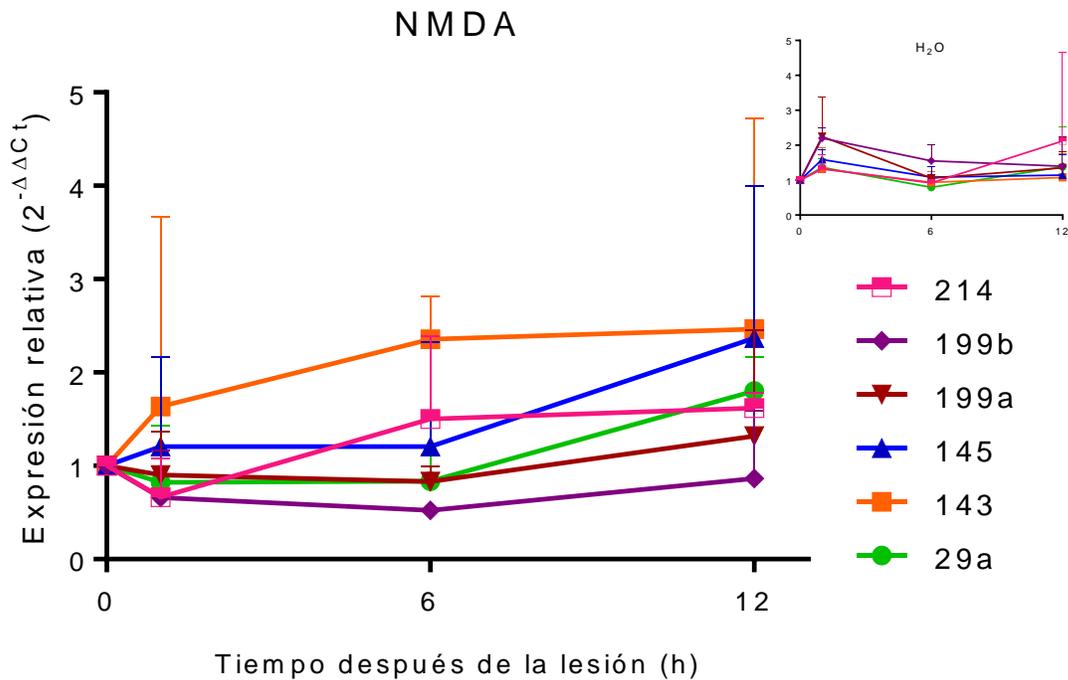


Figura 19. Expresión relativa a RNU6B de los miRNAs-29a, 143, 145, 199a, 199b\*, 214 medido por qPCR y normalizados contra el control intacto de la retina completa a 1, 6 y 12 h del daño con la inyección intravítrea de NMDA. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. Inset qPCR de expresión relativa a RNU6B de los seis miRNAs en la retina completa a los mismos tiempos tras la administración de agua inyectable como grupo control (n=3).

Sin embargo, es importante recordar que la retina está conformada por seis diferentes tipos de neuronas más tres diferentes tipos gliales. Por lo que, las diferencias sutiles de expresión de los miRNAs enriquecidos en la MG se puede perder entre los diferentes patrones de expresión de los demás tipos celulares. Por lo tanto, se realizó el estudio de los cambios de expresión de estos seis miRNAs específicamente en la fracción de la MG mediante la separación celular activada por imanes (MACS) (Figura 20).

6.3.2 La expresión de los miRNAs-29a, 143, 145, 199a-5p, 199b\*, 214 no cambia significativamente en la fracción de MG en un modelo de daño excitotóxico por inyección intravítrea de NMDA a tiempos cortos.

Se realizó el estudio por qPCR de los cambios de expresión de los seis miRNAs específicamente en la fracción de la MG mediante la separación celular activada por imanes (MACS) al cabo de 1, 6 y 12 h tras la administración de NMDA (Figura 20).

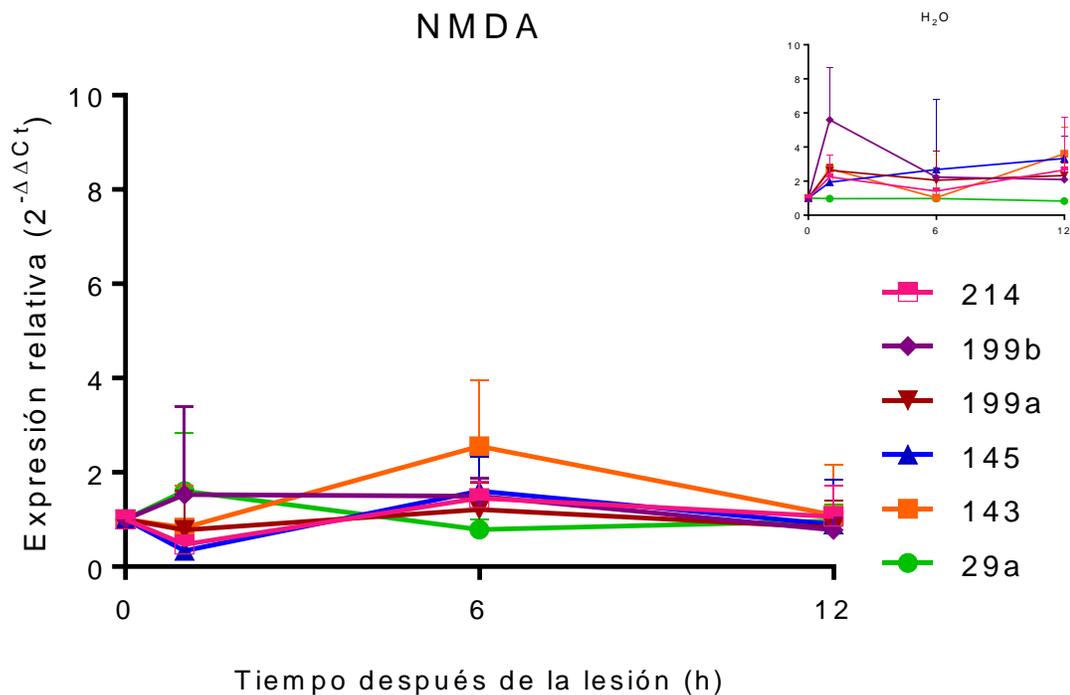


Figura 20. Expresión relativa a RNU6B de los miRNAs-29a, 143, 145, 199a, 199b\*, 214 medido por qPCR y normalizados contra el control intacto de la MG extraída de la retina completa mediante MACS a 1, 6 y 12 h después del daño con la inyección intravítrea de NMDA. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. Inset qPCR de

*expresión relativa a RNU6B de los seis miRNAs en la la MG extraída de la retina completa mediante MACS a los mismos tiempos tras la administración de agua inyectable como grupo control.*

Se observa que durante el curso temporal los cambios de expresión de los seis miRNAs específicamente en la fracción de la MG a diferentes tiempos después del daño con la inyección intravítrea con NMDA no muestran diferencias estadísticamente significativas.

## 7. Discusión

### 7.1 Nuevas aportaciones al proceso de desdiferenciación de la glía de Müller de mamífero en cultivo.

#### 7.1.1 La respuesta de la glía de Müller depende del estímulo de desdiferenciación.

Se realizó la comparación de procesos celulares y moleculares que le ocurren a la MG aislada de ratones (PN8) en cultivo tras aplicarle dos protocolos distintos de desdiferenciación; el primero consiste en estimular por 96 h a la MG con glutamato (100  $\mu$ M) y, el segundo, con EGF/FGF2 (20 ng/mL cada uno). Observamos que los cultivos de MG responden de manera diferente dependiendo del estímulo que se aplique para inducir la desdiferenciación.

En primer lugar, identificamos cambios morfológicos. Con el tratamiento de glutamato la MG cambió su morfología característica con el citoplasma extendido y el núcleo al centro hacia una morfología alargada y no se observaron la formación de agregados celulares con esta estimulación. Este cambio de morfología es consistente con lo reportado previamente en trabajos del laboratorio (Reyes-Aguirre et al., 2013). Por otro lado, con la aplicación de EGF/FGF2 se obtuvieron agregados celulares similares a las neuroesferas, característico de la adquisición de un fenotipo similar al de progenitores. El contraste entre estas observaciones sugieren que la desdiferenciación de la MG se puede promover a través de diferentes mecanismos y señales moleculares. Por un lado, el glutamato activa tanto los receptores ionotrópicos como metabotrópicos aumentando la concentración de calcio intracelular, promoviendo la fosforilación de CREB, activando distintos factores de transcripción que promueven, entre otros procesos, la proliferación celular y sobrevivencia. Por el otro lado, los factores de crecimiento EGF/FGF2 activan vías de señalización que promueven la proliferación, la entrada al ciclo celular y controlan vías de apoptosis mediante la activación de las MAP cinasas y la vía de AKT-PI3K-mTOR (Hamon et al., 2016; Milenkovic et al., 2003).

Es interesante resaltar que la activación del receptor a EGF (EFGR) es mayor a lo largo del desarrollo mientras que disminuye cuando las células se desdiferencian (Wee & Wang, 2017). Esto sugiere que el estímulo con EFG mimetiza procesos que ocurren durante el

desarrollo, mientras que el estímulo con glutamato pudiera semejar más un modelo de desdiferenciación inducido por daño excitotóxico activando vías de señalización de respuesta al daño.

#### 7.1.2 El miRNA-145 y la desdiferenciación de la glía de Müller en cultivo

Nuestros resultados demuestran que el estímulo con los factores de crecimiento EGF/FGF2 en los cultivos primarios de MG es capaz de activar cascadas de señalización que disminuyen la expresión del miR-145. Este miRNA es uno de los seis miRNAs identificados previamente como parte de la firma epigenética característica de la MG en cultivo (Quintero et al., 2016). La disminución en su expresión podría estar relacionada con la adquisición del fenotipo similar al de progenitores reflejado en la formación neuroesferas. Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente por otros grupos de investigadores donde el nivel de expresión del miR-145 está relacionado con el estado de diferenciación de las células, pues el aumento en la expresión del miRNA inhibe por diferentes vías la expresión de genes asociados a estados progenitores como Oct4, Klf4 y Sox2 (Morgado et al., 2016; N. Xu et al., 2009). La disminución en la expresión del miR-145 desde las 24 h hasta las 96 h de tratamiento sugiere que es un cambio que se sostiene por unos días una vez iniciado el proceso. Algo similar sucede con la expresión de ciertos genes asociados a progenitores en el modelo de regeneración retiniana por MG en pez teleosteo, donde la expresión aumenta desde las 15 h y se mantiene hasta por siete días después del daño (Ramachandran et al., 2010).

Por otra parte, la administración de glutamato no induce cambios significativos en la expresión del miR-145 a 96 h de estar con el estímulo, sugiriendo que el glutamato no influye en la expresión de este miRNA y el estado diferenciado de la MG se mantiene. Esto apoya a lo observado en trabajos previos del laboratorio, donde se reportó que el glutamato induce la expresión de nestina sin alterar la expresión de glutamina sintasa (GS) y la proteína acopladora de retinaldehído celular (CRALBP) en cultivos de MG, sugiriendo que este estímulo de daño no es suficiente para que la MG abandone su fenotipo glial aún cuando se promueva la expresión de nestina, un gen asociado a un estado más primitivo (Reyes-Aguirre et al., 2013).

El conjunto de experimentos anteriores pone en evidencia que el proceso de desdiferenciación de la MG es un evento complejo, que puede involucrar varias vías de señalización induciendo diferentes respuestas celulares y moleculares dependiendo del estímulo que se induzca.

### 7.1.3 Cambios en la expresión del miR-145 en condiciones *in vivo* e *in vitro*.

Al trabajar con cultivos primarios de MG se puede analizar la reacción a estímulos específicos sin la intervención de señales de otros tipos celulares. Además, es un modelo accesible que facilita la manipulación experimental a partir de pocos animales. En contraste, el estudio *in vivo* de modelos de regeneración en mamíferos provee información sobre la reacción de la MG dentro de su nicho, con la influencia de las reacciones de los demás tipos celulares adyacentes.

El cambio de condiciones de *in vivo* a *in vitro* provoca diferentes patrones de expresión de los miRNAs. Un estudio realizado en diferentes líneas celulares demuestra que las interacciones célula-célula dependientes de la densidad celular influyen en la biogénesis de los miRNAs (Hwang et al., 2009). Tal es la importancia que tiene el contexto en el que crecen los cultivos de MG que el grupo de Wohl y colaboradores diseñó un modelo de cocultivos, donde existe una monocapa de MG quiescente que sirve como base para cultivar más células de MG sobre ellas y analizarlas posteriormente (Wohl et al., 2017). Estas evidencias recalcan la importancia que tienen las interacciones de la MG con el medio extracelular y con las células circundantes como estímulo clave para la expresión de miRNAs y genes específicos.

Cuando la MG se encuentra inmersa y extendida por toda la retina, mantiene un íntimo contacto con todos los tipos neuronales creando unidades con relación funcional simbiótica, pues se encarga de la homeostasis, la regulación de concentración extracelular de neurotransmisores, la estructura y del soporte nutricional (Bringmann et al., 2009; Vecino et al., 2016). Por lo que, si se quiere entender el mecanismo que rige la respuesta de la MG ante el daño y su capacidad de regenerar cuando se encuentra bajo la influencia de las células adyacentes es imprescindible estudiarla dentro de este medio interconectado. Esta consideración se reforzó cuando comparamos la expresión del miR-145 de la MG del cultivo primario de dos semanas o hasta que estuviera un confluente al 80% con aquellas

aisladas directamente de la retina mediante un protocolo de separación celular asistida por imanes llamada MACS. En la MG del cultivo el miR-145 se encuentra significativamente más expresado que en la MG extraída de la retina completa, recalcando la importancia de considerar la interconexión entre la MG y las neuronas circundantes en los modelos de daño e inducción de la regeneración. Este resultado se confirmó a la par por otro grupo de investigadores (Wohl & Reh, 2016), donde se reportó que la expresión de varios miRNAs depende de las condiciones experimentales en las que se encuentren las células. Wohl y Reh observaron que existe una fracción de miRNAs que se sobreexpresan en cultivo en comparación con condiciones *in vivo* y otra fracción con el comportamiento contrario. Dentro de la primera fracción se encuentra el miR-145, pues está casi ausente *in vivo* mientras que en cultivo de MG se encuentra sobreexpresado. Otros miRNAs como el miR-21, 143 y 199a-3p/5p también se encuentran poco expresados o ausentes en condiciones *in vivo* pero dramáticamente expresados en cultivo (Wohl & Reh, 2016). Estos resultados concuerdan con el perfil de expresión identificado en la MG por Quintero y colaboradores (Quintero et al., 2016). Probablemente las conexiones o interacciones que tenga la MG con otras células y el medio extracelular rigen el patrón de expresión del miR-145. El papel que tiene el miR-145 con proteínas de unión celular ha sido comprobado por el grupo de Zhuang y colaboradores, donde identifican la unión del miR-145 a la región 3'UTR de paxilina, una proteína de andamiaje que facilita la respuesta celular a cambios en el medio extracelular (Turner, 2000), relacionando los cambios de expresión de los miRNAs con el control e integridad de las estructuras de unión celular (Zhuang et al., 2016).

7.2 Nuevas aportaciones sobre el papel de los miRNAs en el modelo de daño retiniano *in vivo* por inyección de NMDA.

7.2.1 Predicción *in silico* de vías de señalización reguladas por los miR-29a, 143, 145, 199a, 199b\*, 214 y sus probables implicaciones fisiológicas.

Como aproximación a la evaluación del papel de los miRNAs en un modelo de daño retiniano *in vivo*, se realizó el estudio de los miR-29a, 143, 145, 199a, 199b\*, 214 cuya expresión se encuentra enriquecida en la MG (Quintero et al., 2016; Wohl & Reh, 2016). Los seis miRNAs están altamente conservados evolutivamente entre varias especies, en particular, entre *Homo sapiens* y *Mus musculus*. Este grado de conservación en la secuencia

de la región semilla (2do-8vo nucleótido) de los miRNAs podría estar relacionado con la conservación en la función biológica de estas moléculas entre especies. Por supuesto, esta aseveración debe demostrarse mediante numerosos estudios experimentales adicionales a esta tesis. Sin embargo, el estudio *in silico* de estas moléculas identificó los genes diana que probablemente tienen estos seis miRNAs mediante algoritmos, así como las probables vías de señalización en las que predictivamente se encuentran involucrados proporcionando un indicio sobre su función biológica. Este estudio reveló su importancia en la regulación de vías de señalización relacionadas con la interacción con el medio circundante y la matriz extracelular; tales como la vía de señalización de proteoglicanos en cáncer, la vía de interacción con el receptor de matriz extracelular y la vía de Hippo. Estas dos últimas, se relacionan con procesos de proliferación de tejidos y de regeneración. La vía de Hippo, además, está involucrada en el control del tamaño de los órganos, en la regeneración tisular y la autorrenovación de las células troncales (Zhao et al., 2011); procesos que, en parte, están regidos por señales de contacto célula-célula.

#### 7.2.2 Posibles interpretaciones sobre mantenimiento de la firma epigenética de los seis miRNAs en el modelo de daño *in vivo*.

Cuando se analizaron los niveles de expresión de los seis miRNAs (miR-29a, 143, 145, 199a, 199b\*, 214) enriquecidos en la MG en el modelo de daño excitotóxico por administración intravítrea de NMDA, no se observaron cambios estadísticamente significativos en la retina completa ni en la fracción específica de MG extraída por MACS. Con base en estos resultados, se identificó que el estímulo con NMDA no afecta la expresión de estos seis miRNAs, por lo que las vías de señalización que regulan estos miRNAs no se ven afectadas por este tipo de daño. Es importante mencionar que el NMDA es un agonista de los receptores ionotrópicos a glutamato y que no tiene efecto en los demás receptores ionotrópicos y metabotrópicos de este neurotransmisor. No se puede descartar que el estímulo con glutamato tenga algún efecto sobre la expresión de estos seis miRNAs, pues cabe la posibilidad de que la activación de los demás receptores ionotrópicos (AMPA y kainato) y los receptores metabotrópicos tengan efecto sobre la expresión de estos seis miRNAs. Al menos, sabemos que al aplicar glutamato en cultivos primarios de MG la expresión del miR-145 se mantiene, lo que nos sugiere que al menos la

expresión de ese miRNA no está relacionado con ninguna de las vías de señalización activadas por glutamato.

Sin embargo, es necesario mencionar el papel de otros factores que influyen en la interpretación de estos resultados como la heterogeneidad en la población celular de MG, la memoria epigenética, la edad de los animales y la posibilidad de que no sea este grupo de seis miRNAs los que cambien su expresión en el modelo *in vivo* de daño excitotóxico con NMDA.

#### 7.2.2.1 La heterogeneidad en la población celular de MG.

En la retina existen varias subdivisiones de cada tipo celular, por ejemplo, el ratón cuenta con tres tipos de fotorreceptores, alrededor de 12 tipos de células bipolares, aproximadamente 40 tipos de células amacrinas y como 30 diferentes tipos de células ganglionares. La clasificación se realiza por su morfología, la similitud entre patrones de expresión génica, la distribución generalmente del tipo mosaico dentro de la retina y la uniformidad de sus propiedades fisiológicas, entre otros (Sanes & Masland, 2015). Por lo que, es de esperarse que dentro del grupo celular correspondiente a la MG también exista esta diversidad de subpoblaciones, dentro de las cuales, cambios sutiles en la expresión génica serían enmascarados dentro de la heterogénea población. En estudios *in vivo* de regeneración en ratones adultos menos del 1% de la MG fue estimulado a proliferar y sólo un 4% expresó marcadores neuronales como indicador de su posterior diferenciación hacia neuronas (Karl et al., 2008). Esta baja capacidad de la MG de desdiferenciarse se podría entender por la importancia de mantener el fenotipo glial que brinda soporte, mantiene la homeostasis y brinda estructura a la retina.

La heterogeneidad se ha descrito tanto en la expresión de genes como en la capacidad de responder con procesos regenerativos frente al daño. Durante el estudio del transcriptoma de la MG se identificaron genes que se expresan constantemente en este tipo celular como la glutamina sintasa (GS), la clusterina (Clu), el homólogo de dickkopf 3 (Dkk3), entre otros, sugiriendo que estos genes codifican proteínas involucradas en las funciones específicas de la MG (Roesch et al., 2008). En modelos de inducción de la regeneración tras un estímulo de daño por NMDA también se ha identificado que la mayoría de la MG mantiene la expresión de genes gliales y sólo un pequeño número de ellas incorpora BrdU y

logra diferenciarse hacia fenotipos similares a células amacrinas con estímulos adicionales de factores de crecimiento (EGF o FGF) e insulina. (Karl et al., 2008). Por otra parte, un estudio de transcriptoma de cinco células de MG, utilizando PCR de célula única (single-cell PCR) y microarreglos, identificaron ligeras variaciones de expresión dentro de este tipo celular, incluyendo genes de mantenimiento como beta-actina en citoplasma (Roesch et al., 2008). Aunado a esto, también se encontraron diferentes grados de expresión en el factor de transcripción Chx10, el cual normalmente se expresa en células progenitoras neurales, sugiriendo que existen similitudes entre el transcriptoma de las células progenitoras de la retina con una pequeña subpoblación de la MG (Roesch et al., 2008). Estos datos contribuyen a la hipótesis de que la MG tiene la capacidad de adquirir un fenotipo de progenitor en caso de ser estimulado por daño o con ciertos factores de crecimiento. La heterogeneidad también se ve reflejada en su capacidad de reentrar al ciclo celular después de ser estimulada, donde influye tanto la expresión de genes como su distribución a lo largo de la retina (Bernardos et al., 2007; Fausett & Goldman, 2006; Fischer & Reh, 2000; Hitchcock et al., 2004; Ooto et al., 2004; Raymond et al., 2006; Roesch et al., 2012; Takeda et al., 2008; Thomas et al., 2016). La heterogeneidad de la población celular de la MG hace que su estudio genético y funcional sea aún más desafiante, ya que el identificar aquella subpoblación de MG que puede reactivarse y desdiferenciarse ante un estímulo de daño es el reto al que nos enfrentamos ahora, pues la separación de la MG mediante MACS que se realizó en esta tesis involucró tanto a la subpoblación que reaccionó ante el daño como aquellas que permanecieron sin cambios.

El realizar PCRs de célula única (single cell PCR) podría implementarse como herramienta más sensible para estudiar y entender los cambios en la expresión génica de aquellas células de MG que responden al daño con procesos regenerativos dentro de esta población tan heterogénea. Y al identificar genes específicos de estas células se podría reconocer su distribución a lo largo de la retina e identificar los nichos que permiten este tipo de respuesta.

### 7.2.2.2 La memoria epigenética está involucrada en el mantenimiento del perfil de expresión característico de la MG.

En estudios que caracterizan el transcriptoma de las células de MG se identificaron grupos de genes que se encuentran sobreexpresados. Al asociar estos genes con posibles vías de señalización se observó que contribuían a la síntesis de proteínas, morfología celular, señalización célula-célula, organización y distribución celular, así como a función y metabolismo de la propia célula (Roesch et al., 2008; Wohl & Reh, 2016). Estos resultados, junto con los experimentos previos del laboratorio sobre la existencia de un grupo de miRNAs enriquecidos en la MG (Quintero et al., 2016; Wohl & Reh, 2016), apoyan la hipótesis de que existe una firma molecular conformada por ciertos genes que le permite a la MG cumplir con sus funciones tanto estructurales como de soporte a las neuronas aledañas así como mantener su fenotipo glial dentro de la retina. En nuestros experimentos, la expresión de los miRNAs enriquecidos en la MG permanecieron sin alterarse aún después de la inducción a la desdiferenciación mediante el daño con NMDA. Por lo que, se sugiere que el mantenimiento en el perfil de expresión de estos seis miRNAs está relacionado con el mantenimiento del fenotipo glial aún después del daño. Este comportamiento se ha reportado en otros modelos de inducción de desdiferenciación en cultivos celulares primarios de MG, donde aún después de agregar el estímulo con glutamato se mantuvo la memoria celular del fenotipo glial, reflejada en la expresión constante de GS y CRALBP (Reyes-Aguirre et al., 2013). Otro de los genes que mantiene su expresión en la MG es el homólogo 3 dickkopf (Dkk3), involucrado en la diferenciación celular y en la regulación negativa de Wnt (Roesch et al., 2008). Aunque este resultado prueba que la hipótesis propuesta en esta tesis es parcialmente falsa, esta observación refuerza el concepto de "memoria epigenética" que se ha utilizado, entre otros, para explicar la baja eficiencia (aprox. 0.01%) en los protocolos de reprogramación celular de células pluripotentes inducidas (Maherali et al., 2008). Esta memoria también se ve reflejada a lo largo del desarrollo normal de la retina, pues tras un análisis de transcriptomas entre células progenitoras neurales tardías y las células de MG se identificó que la transición de un fenotipo a otro no involucra un cambio total del programa de expresión génica, sino sólo un grupo específico de genes. Células progenitoras que se volverán MG mantienen parte del programa de expresión génica de progenitores, como

aquellos involucrados en la división celular y sobreexpresan algunos genes especializados para realizar las funciones propias de MG, como GS y GFAP (Roesch et al., 2008). De manera similar, cuando se induce a las células troncales embrionarias (ESC) hacia un linaje específico como células troncales de epiblastos cambia solamente un tercio de su perfil de expresión de miRNAs (Sen & Ghatak, 2015).

Herramientas de edición genómica de agrupaciones de repeticiones palindrómicas cortas regularmente interespaciadas asociadas a la caspasa 9 (CRISPR/Cas9) podrían ser utilizadas para alterar esta memoria epigenética cambiando la expresión de genes y miRNAs asociados a un fenotipo de progenitor para facilitar la regeneración de la retina mediada por la MG, pues se sabe que el cambio en la firma epigenética puede dotar a las células de funciones fisiológicas distintas.

#### 7.2.2.3 La plasticidad celular necesaria para la regeneración disminuye con la edad.

Existen evidencias que con la edad la capacidad regenerativa de la MG disminuye (Löffler et al., 2015). Únicamente en el modelo del pez teleosteo no parece existir restricción en la ventana de tiempo que limita la capacidad regenerativa, como si ésta ocurriera de manera ilimitada. En comparación, las aves, los anfibios y los mamíferos tienen esta capacidad limitada a ciertos intervalos de tiempo (Fischer & Bongini, 2010). Löffer y colaboradores reportan que en cultivos organotípicos de retinas la capacidad neurogénica de la MG está íntimamente relacionada con la edad de los ratones, ya que mientras más desarrollada está la retina, menor es su capacidad de entrar de nuevo al ciclo celular y proliferar (Löffler et al., 2015). La variabilidad entre las capacidades neurogénicas a diferentes edades puede deberse a los distintos perfiles de expresión génica. Por ejemplo, la expresión diferencial de marcadores de progenitores en proliferación (*Ascl1*, *Lhx2*, *Pax6*, *Rax* y *Vsx2*) dependientes de la edad sugiere que están involucrados en el potencial de la MG joven de ser inducida a reprogramarse hacia un estado parecido al de células troncales con poder neurogénico (Löffler et al., 2015). La experiencia de nuestro laboratorio nos demuestra que las células de cultivos de MG obtenidos de ratones jóvenes son más plásticas y permiten una mayor obtención de células progenitoras derivadas de MG con protocolos de desdiferenciación, en comparación con aquellas extraídas de retinas de ratones adultos. Esto pudiera deberse a la menor tasa de proliferación en la MG de ratones adultos, así como el deficiente aumento en

la expresión de *Ascl1* y *Vsx2*, factores reguladores del tamaño y de la neurogénesis durante el desarrollo retiniano embrional, como lo reportado en cultivos de explantes retinianos (Löffler et al., 2015). En los experimentos de esta tesis se utilizaron ratones adultos (2-3 meses de edad) los cuales probablemente cuentan con una muy limitada capacidad de desdiferenciarse, permaneciendo en un estado de gliosis reactiva sin la capacidad de pasar hacia un proceso regenerativo.

La plasticidad dependiente de la edad se ha asociado con los diferentes niveles de expresión de miRNAs a lo largo del desarrollo. Por ejemplo, Sen y Ghatak compararon el perfil de expresión global de miRNAs maduros a diferentes estados del desarrollo embrionario e identificaron que en la piel de embriones de 16 días (E16) la expresión global de miRNAs se encontraba reprimida y la piel contaba con un potencial regenerativo mayor pues regeneraba sin formar cicatrices. En comparación, al día E19 la regeneración estaba más limitada pues formaba cicatrices y la expresión global de miRNAs estaba aumentada (Sen & Ghatak, 2015). Estos cambios en el perfil de expresión de los miRNAs sugieren su papel en la regulación de genes a lo largo del desarrollo así como en la capacidad regenerativa.

Las retinopatías como el glaucoma, el desprendimiento de la retina, la formación de membranas epiretinales, entre otras, se presentan a edades avanzadas, por lo que sería interesante poder modificar los niveles de expresión de ciertos genes en adultos para inducir la desdiferenciación y promover procesos de regeneración similares a los de estadios embrionarios para lograr que la retina se regenere sin la formación de cicatrices. Para lograrlo, proponemos realizar una comparación entre los resultados obtenidos en esta tesis con los que se obtendrían a partir del estudio de la expresión de los miR-29a, 143, 145, 199a, 199b\*, 214 en un modelo de daño en ratones jóvenes, para identificar los cambios de expresión responsables de la plasticidad celular, identificar aquella población de MG que responde con proliferación y desdiferenciación ante el daño e identificar si la capacidad regenerativa es mayor en ese modelo de daño.

7.2.2.4 Los seis miRNAs enriquecidos en la MG no están involucrados en procesos de diferenciación.

Los resultados de la predicción *in silico* indican que los miRNAs estudiados están involucrados principalmente en vías de señalización relacionados con las interacciones

célula-célula y con el medio extracelular. Aunque estas interacciones podrían estar asociadas con la sobrevivencia, proliferación y diferenciación celular, en el modelo de daño con NMDA no se identificaron cambios en la expresión de los seis miRNAs. Por otra parte, al estimular los cultivos primarios de MG con los factores de crecimiento EGF/FGF2 se identificó una disminución en la expresión del miR-145. Se sabe que el factor de crecimiento EGF puede alterar la constelación de moléculas involucradas en la estructura celular interna (Turner, 2000). Este estímulo, sin descartar el papel del FGF2, podría estar alterando las vías de señalización involucradas en la expresión de al menos uno (miR-145) de los seis miRNAs, promoviendo un cambio en la estructura de la célula y sus interacciones con el medio más que en procesos de diferenciación. Será importante identificar aquellos miRNAs que cambian su perfil de expresión en el modelo *in vivo* de daño excitotóxico con NMDA o glutamato, para ver si están relacionados con procesos de desdiferenciación de la MG, con procesos del mantenimiento del fenotipo glial o si se relacionan más con vías de señalización de respuesta al estrés como el proceso de gliosis reactiva.

### 7.2.3 ¿Regeneración o gliosis reactiva?

El objetivo de estos estudios es generar conocimiento que permita avanzar hacia una respuesta regenerativa y no permanecer en el proceso de gliosis reactiva en mamíferos. En este proyecto asociamos de manera predictiva la expresión de los miR-29a, 143, 145, 199a, 199b\*, 214 con la función estructural de la MG en situaciones normales aunado a su capacidad de proliferar y regenerar en situaciones de daño retiniano. En los sistemas de mamíferos la matriz extracelular es crítica para la regeneración tisular. La matriz extracelular (ECM) determina el comportamiento de la célula manipulando su forma, proliferación, migración, diferenciación y sobrevivencia. Como los cambios en la interacción con la ECM están involucrados tanto en procesos de gliosis reactiva como en procesos de desdiferenciación de la MG (Belecky-Adams et al., 2013) es necesario identificar cuál de los dos procesos es predominante. Se sabe que en procesos regenerativos en peces teleósteos la MG responde primero con señales características de gliosis reactiva para después actuar como célula progenitora en el proceso de regeneración (Thomas et al., 2016), por lo que se sugiere que son procesos íntimamente relacionados y que la

regeneración depende de una gliosis reactiva inicial transitoria. Entonces es importante identificar marcadores con los que se puedan diferenciar ambos procesos, adicionalmente a los seis miRNAs estudiados en esta tesis. Por ejemplo, como se ha demostrado en modelos de daño en peces teleósteos, donde la inducción de *Ascl1* activa la vía de señalización de Wnt, promoviendo la proliferación de las células progenitoras derivadas de la MG, iniciando así el proceso de regeneración (Gallina et al., 2014), o marcando la fase del ciclo celular con el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) para detectar si las células de MG entraron al ciclo celular y están proliferando después de haber montado una respuesta de gliosis reactiva o si se mantienen quiescentes e hipertróficas (Thomas et al., 2016). En procesos de regeneración de piel se ha identificado que existen diferencias entre la ECM de la piel fetal con respecto a la piel de adulto, ya que la primera puede regenerar sin la formación de cicatrices. La piel fetal tiene poca abundancia de miRNAs, permitiendo la expresión de genes involucrados en su desarrollo. Uno de estos miRNAs corresponde a la familia conservada de los miR-29a-c. Esta familia de miRNAs es un ejemplo de que una familia puede regular múltiples proteínas de la ECM. En adultos, la expresión elevada del los miR-29 causan supresión de genes de ECM resultando en la reparación del tejido con cicatriz, regulando a su vez procesos de diferenciación tisular en osteoblastos y senescencia en células progenitoras de músculo (Sen & Ghatak, 2015). Sin embargo, el mantenimiento en la expresión de los miR-29a, 143, 145, 199a, 199b\*, 214 observado en nuestros experimentos sugiere que no ocurrieron cambios con respecto a la interacción con la matriz extracelular al menos en intervalos de tiempo cortos después del daño intravítreo con NMDA en ratones adultos, contrario a lo que se esperaba, pues el pico de muerte celular neuronal con inyecciones intravítreas de NMDA, propuesto como estímulo inicial hacia la proliferación de MG, se ha reportado a las 24 h después de la administración (Karl & Reh, 2012).

Es importante mencionar que la regeneración puede seguir patrones similares a los que ocurren durante la neurogénesis en el desarrollo embrionario, con ciertas diferencias. Por ejemplo, el estímulo inicial que induce la generación de nuevas neuronas. A diferencia de la retinogénesis, en los modelos de daño la neurogénesis se inicia por pérdida celular. Pues al perder células la modificación en los contactos célula-célula le informan a la MG sobre la

necesidad de crecer y de proliferar iniciando el programa de regeneración para reestablecer el circuito dentro de la retina (Karl & Reh, 2012).

## 8. Conclusiones

Los cambios morfológicos y de expresión de la MG en cultivo celular dependen del tipo de estímulo que se aplique para promover la dediferenciación.

La estimulación con glutamato no altera la expresión del miR-145, lo que indica que las vías de señalización tanto por activación de receptores ionotrópicos como metabotrópicos a glutamato no interfieren con la vía de señalización que regula la expresión de este miRNA pero sí generan un cambio morfológico en las células de MG.

La estimulación con NMDA en el modelo de daño *in vivo* tampoco se altera la expresión de los miR-29a, 143, 145, 199a, 199b\*, 214 enriquecidos en la MG en el modelo de retina completa ni en la fracción de MG purificada utilizando MACS, por lo que probablemente la vía ionotrópica mediada por los receptores a NMDA no interfieran directamente con la expresión de estos seis miRNAs. Sin embargo, la activación con NMDA puede promover la liberación de glutamato tanto en la MG como en otros tipos celulares, por lo que no se descarta la posibilidad de que la estimulación de otro tipo de receptores a glutamato tengan efecto sobre la expresión de estos miRNAs.

La formación de neuroesferas y la disminución en la expresión del miR-145 en los cultivos primarios de MG tras la estimulación con EGF/FGF2 sugieren que las vías de señalización de estos factores están relacionadas con la adquisición de un fenotipo similar al de progenitores. Ahora hace falta comprobar si estos miRNAs regulaban la expresión de genes asociados a progenitores.

El miR-145 se encuentra sobreexpresado en condiciones de cultivo, sugiriendo el papel importante que tiene el contexto de las interacciones célula-célula y célula-medio extracelular con la expresión de ciertos genes.

Los miR-29a, 143, 145, 199a, 199b\*, 214 se relacionaron predictivamente con vías de señalización involucradas en proliferación e interacción celular con el medio extracelular, aportando una idea de su posible función fisiológica y abriendo el panorama a realizar estudios experimentales que lo verifiquen.

Este trabajo confirmó que la MG mantiene su fenotipo glial aún después del daño excitotóxico con NMDA en un modelo de daño *in vivo* a nivel de la expresión de los

miRNAs identificados previamente como su firma epigenética. Es necesario estudiar un perfil más amplio de miRNAs para identificar aquellos que son alterados por el daño excitotóxico por glutamato e identificar las vías de señalización en las que están involucrados, pues se sugiere que es necesario que la MG pierda por completo su identidad glial para adquirir un fenotipo de progenitor neural.

## 9. Perspectivas

- Comparar el patrón de expresión de miRNAs de la MG del ratón adulto que tiene la capacidad de regeneración muy limitada con el del pez cebra que cuenta con la capacidad de regeneración en condiciones similares al daño con NMDA.
- Identificar el patrón de miRNAs que son alterados por el daño excitotóxico por glutamato, discernir entre las vías de señalización del neurotransmisor involucradas en los cambios de expresión de los miRNAs e identificar los procesos biológicos en los que están involucrados.
- Identificar los cambios claves de expresión de miRNAs y proteínas entre un proceso de gliosis reactiva que lleva a la formación de cicatrices con aquella que inicia los procesos de regeneración en mamíferos.
- Identificar el o los miRNAs mínimos indispensables para que la MG pierda su fenotipo glial y adquiera un fenotipo pluripotente o de progenitor neural.
- Evaluar experimentalmente la regulación directa de los miRNAs que cambian su expresión ante el estímulo de daño con NMDA *in vivo* con sus genes diana predictivos mediante ensayos de luciferasa e identificar las vías de señalización en las que se encuentran involucrados.
- Inducir la desdiferenciación de la MG mediante la sobreexpresión o la inhibición de miRNAs específicos utilizando la técnica de CRISPR *in vivo*.
- Utilizar como herramienta control los miRNAs que se encuentran sobreexpresados en los cultivos de MG para poner a prueba y estandarizar métodos como CRISPR/Cas9, antagomiRs o morfolidos, que supuestamente reducen la expresión de genes específicos.
- Identificar aquellos miRNAs que tienen un perfil de expresión diferente en modelos de daño en ratones jóvenes con el de ratones adultos para identificar moléculas clave sobre la plasticidad celular y así promover la regeneración mediante el uso de herramientas como CRISPR/Cas9 en ratones adultos.
- Identificar miRNAs clave que promuevan la entrada al ciclo celular, la proliferación, la desdiferenciación, la diferenciación y la integración de estas nuevas células al circuito de la retina para promover la regeneración en retinas patológicas en modelos animales mamíferos.

- Identificar si estos miRNAs sirven como biomarcadores de daño en sangre o en el humo vítreo.
- Extrapolar estos hallazgos hacia la aplicación en la clínica para identificar a tiempo las retinopatías y promover la regeneración retiniana en humanos.

## 10. Referencias

- Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J. W., & Bartel, D. P. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife*, *4*(e05005), 1–38. doi:10.7554/eLife.05005
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, *116*(2), 281–297. doi:10.1016/S0092-8674(04)00045-5
- Belecky-Adams, T. L., Chernoff, E. C., Wilson, J. M., & Dharmarajan, S. (2013). Reactive Muller Glia as Potential Retinal Progenitors. In *Neural Stem Cells - New Perspectives* (pp. 73–117). doi:10.5772/55150
- 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. *The Journal of Neuroscience*, *27*(26), 7028–7040. doi:10.1523/JNEUROSCI.1624-07.2007
- Betel, D., Wilson, M., Gabow, A., Marks, D. S., & Sander, C. (2008). The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Research*, *36*(Database issue), 149–153. doi:10.1093/nar/gkm995
- Bringmann, A., Iandiev, I., Pannicke, T., Wurm, A., Hollborn, M., Wiedemann, P., ... Reichenbach, A. (2009). Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: Neuroprotective and detrimental effects. *Progress in Retinal and Eye Research*, *28*(6), 423–451. doi:10.1016/j.preteyeres.2009.07.001
- Bringmann, A., Pannicke, T., Biedermann, B., Francke, M., Iandiev, I., Grosche, J., ... Reichenbach, A. (2009). Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochemistry International*, *54*(3-4), 143–160. doi:10.1016/j.neuint.2008.10.014
- Bui, B. V., Hu, R. G., Acosta, M. L., Donaldson, P., Vingrys, A. J., & Kalloniatis, M. (2009). Glutamate metabolic pathways and retinal function. *Journal of Neurochemistry*, *111*(2), 589–599. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06354.x
- Cai, S., Fu, X., & Sheng, Z. (2007). Dedifferentiation: A New Approach in Stem Cell Research. *BioScience*, *57*(8), 655. doi:10.1641/B570805
- Decembrini, S., Bressan, D., Vignali, R., Pitto, L., Mariotti, S., Rainaldi, G., ... Cremisi, F. (2009). MicroRNAs couple cell fate and developmental timing in retina. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(50), 21179–21184. doi:10.1073/pnas.0909167106
- Fausett, B. V., & Goldman, D. (2006). A Role for  $\gamma$ -Tubulin-Expressing Muller Glia in Regeneration of the Injured Zebrafish Retina. *Journal of Neuroscience*, 26(23), 6303–6313. doi:10.1523/JNEUROSCI.0332-06.2006
- Fischer, A. J., & Bongini, R. (2010). Turning Müller glia into neural progenitors in the retina. *Molecular Neurobiology*, 42(3), 199–209. doi:10.1007/s12035-010-8152-2
- Fischer, A. J., McGuire, C. R., Dierks, B. D., & Reh, T. a. (2002). Insulin and fibroblast growth factor 2 activate a neurogenic program in Müller glia of the chicken retina. *The Journal of Neuroscience*, 22(21), 9387–9398. doi:22/21/9387 [pii]
- Fischer, A. J., & Reh, T. A. (2000). Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Developmental Biology*, 220(2), 197–210. doi:10.1006/dbio.2000.9640
- Gallina, D., Todd, L., & Fischer, A. J. (2014). A comparative analysis of Müller glia-mediated regeneration in the vertebrate retina. *Experimental Eye Research*, 123, 121–130. doi:10.1016/j.exer.2013.06.019
- Hamon, A., Roger, J. E., Yang, X. J., & Perron, M. (2016). Müller glial cell-dependent regeneration of the neural retina: An overview across vertebrate model systems. *Developmental Dynamics*, 245(7), 727–738. doi:10.1002/dvdy.24375
- Hitchcock, P., Ochocinska, M., Sieh, A., & Otteson, D. (2004). Persistent and injury-induced neurogenesis in the vertebrate retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 23(2), 183–194. doi:10.1016/j.preteyeres.2004.01.001
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., & Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, 6(4), 279–284. doi:10.1038/sj.gene.6364190
- Hwang, H.-W., Wentzel, E. A., & Mendell, J. T. (2009). Cell-cell contact globally activates microRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(17), 7016–7021. doi:10.1073/pnas.0811523106
- Inui, M., Martello, G., & Piccolo, S. (2010). MicroRNA control of signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(4), 252–263. doi:10.1038/nrm2868
- Karl, M. O., Hayes, S., Nelson, B. R., Tan, K., Buckingham, B., & Reh, T. A. (2008).

- Stimulation of neural regeneration in the mouse retina. *PNAS*, *105*(49), 19508–19513.  
doi:10.1073
- Karl, M. O., & Reh, T. A. (2012). Studying the Generation of Regenerated Retinal Neuron from Müller Glia in the Mouse Eye. In S.-Z. Wang (Ed.), *Retinal Development* (Vol. 884, pp. 213–227). Totowa, NJ: Humana Press. doi:10.1007/978-1-61779-848-1
- Kaul, M., Garden, G. A., & Lipton, S. A. (2001). Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia. *Nature*, *410*(6831), 988–994.  
doi:10.1038/35073667
- Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., ... Daley, G. Q. (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*, *467*(7313), 285–290.  
doi:10.1038/nature09342
- Kragl, M., Knapp, D., Nacu, E., Khattak, S., Maden, M., Epperlein, H. H., & Tanaka, E. M. (2009). Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature*, *460*(7251), 60–65. doi:10.1038/nature08152
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, *25*(4), 402–408.  
doi:10.1006/meth.2001.1262
- Löffler, K., Schäfer, P., Völkner, M., Holdt, T., & Karl, M. O. (2015). Age-dependent Müller glia neurogenic competence in the mouse retina. *Glia*, n/a–n/a.  
doi:10.1002/glia.22846
- Maherali, N., Ahfeldt, T., Rigamonti, A., Urikal, J., Cowan, C., & Hochedlinger, K. (2008). A high efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, *3*(3), 340–345. doi:10.1016/j.stem.2008.08.003
- Milenkovic, I., Weick, M., Wiedemann, P., Reichenbach, A., & Bringmann, A. (2003). P2Y receptor-mediated stimulation of Müller glial cell DNA synthesis: Dependence on EGF and PDGF receptor transactivation. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *44*(3), 1211–1220. doi:10.1167/iovs.02-0260
- Morgado, A. L., Rodrigues, C. M. P., & Solá, S. (2016). MicroRNA-145 Regulates Neural Stem Cell Differentiation Through the Sox2-Lin28/let-7 Signaling Pathway. *Stem Cells*, *34*(5), 1386–1395. doi:10.1002/stem.2309
- Ooto, S., Akagi, T., Kageyama, R., Akita, J., Mandai, M., Honda, Y., & Takahashi, M.

- (2004). Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(37), 13654–13659. doi:10.1073/pnas.0402129101
- Quintero, H., Gómez-Montalvo, A. I., & Lamas, M. (2016). MicroRNA changes through Müller glia dedifferentiation and early/late rod photoreceptor differentiation. *Neuroscience*, *316*, 109–121. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.12.025
- Ramachandran, R., Fausett, B. V., & Goldman, D. (2010). *Ascl1a* regulates Muller glia dedifferentiation and retinal regeneration through a Lin-28-dependent, let-7 microRNA signalling pathway. *Nat Cell Biol*, *12*(11), 1101–1107. doi:10.1038/ncb2115
- Ramírez, M., Hernández-Montoya, J., Sánchez-Serrano, S. L., Ordaz, B., Ferraro, S., Quintero, H., ... Lamas, M. (2012). GABA-mediated introduction of early neuronal markers expression in postnatal rat progenitor cells in culture. *Neuroscience*, *224*, 210–222. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.08.044
- Ramírez, M., & Lamas, M. (2009). NMDA receptor mediates proliferation and CREB phosphorylation in postnatal Müller glia-derived retinal progenitors. *Molecular Vision*, *15*(November 2008), 713–21.
- Raymond, P. A., Barthel, L. K., Bernardos, R. L., & Perkowski, J. J. (2006). Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish. *BMC Developmental Biology*, *6*, 1–17. doi:10.1186/1471-213X-6-36
- Reyes-Aguirre, L. I., Ferraro, S., Quintero, H., Sánchez-Serrano, S. L., Gómez-Montalvo, A., & Lamas, M. (2013). Glutamate-induced epigenetic and morphological changes allow rat Müller cell dedifferentiation but not further acquisition of a photoreceptor phenotype. *Neuroscience*, *254*, 347–360. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.09.048
- Reyes-Aguirre, L. I., & Lamas, M. (2016). Oct4 methylation-mediated silencing as an epigenetic barrier preventing Müller Glia dedifferentiation in a murine model of retinal injury. *Frontiers in Neuroscience*, *10*(NOV), 1–13. doi:10.3389/fnins.2016.00523
- Riffo-Campos, Á. L., Riquelme, I., & Brebi-Mieville, P. (2016). Tools for sequence-based miRNA target prediction: What to choose? *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(12). doi:10.3390/ijms17121987

- Roesch, K., Jadhav, A. P., Trimarchi, J. M., Stadler, M. B., Roska, B., Sun, B. B., & Cepko, C. L. (2008). The transcriptome of retinal Müller glial cells. *Journal of Comparative Neurology*, 509(2), 225–238. doi:10.1002/cne.21730
- Roesch, K., Stadler, M. B., & Cepko, C. L. (2012). Gene expression changes within Müller glial cells in retinitis pigmentosa. *Molecular Vision*, 18(May), 1197–214. doi:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3365136/
- Sanes, J. R., & Masland, R. H. (2015). The Types of Retinal Ganglion Cells: Current Status and Implications for Neuronal Classification. *Annual Review of Neuroscience*, 38(1), 221–246. doi:10.1146/annurev-neuro-071714-034120
- Sen, C. K., & Ghatak, S. (2015). miRNA Control of Tissue Repair and Regeneration. *American Journal of Pathology*, 185(10), 2629–2640. doi:10.1016/j.ajpath.2015.04.001
- Shen, Y., Liu, X.-L., & Yang, X.-L. (2006). N-Methyl-D-Aspartate Receptors in the Retina. *Molecular Neurobiology*, 34, 163–179.
- Takeda, M., Takamiya, A., Jiao, J. W., Cho, K. S., Trevino, S. G., Matsuda, T., & Chen, D. F. (2008).  $\alpha$ -Amino adipate induces progenitor cell properties of müller glia in adult mice. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 49(3), 1142–1150. doi:10.1167/iovs.07-0434
- Thews, G., Mutschler, E., Vaupel, P., & Núñez Cachaza, A. (1983). *Anatomía, fisiología y patofisiología del hombre*. Reverté.
- Thomas, J. L., Ranski, A. H., Morgan, G. W., & Thummel, R. (2016). Reactive gliosis in the adult zebrafish retina. *Experimental Eye Research*, 143, 98–109. doi:10.1016/j.exer.2015.09.017
- Turner, C. E. (2000). Paxillin and focal adhesion signalling. *Nature Cell Biology*, 2(12), 231–236. doi:10.1038/35046659
- Vecino, E., Rodriguez, F. D., Ruzafa, N., Pereiro, X., & Sharma, S. C. (2016). Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 51, 1–40. doi:10.1016/j.preteyeres.2015.06.003
- Vlachos, I. S., Zagganas, K., Paraskevopoulou, M. D., Georgakilas, G., Karagkouni, D., Vergoulis, T., ... Hatzigeorgiou, A. G. (2015). DIANA-miRPath v3.0: Deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Research*, 43(W1),

W460–W466. doi:10.1093/nar/gkv403

- Wan, J., & Goldman, D. (2016). Retina regeneration in zebrafish. *Current Opinion in Genetics and Development*, 40(Figure 1), 41–47. doi:10.1016/j.gde.2016.05.009
- Wee, P., & Wang, Z. (2017). Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways. *Cancers*, 9(5), 1–45. doi:10.3390/cancers9050052
- Wilken, M. S., & Reh, T. A. (2016). Retinal regeneration in birds and mice. *Current Opinion in Genetics and Development*. doi:10.1016/j.gde.2016.05.028
- Wohl, S. G., Jorstad, N. L., Levine, E. M., & Reh, T. A. (2017). Müller glial microRNAs are required for the maintenance of glial homeostasis and retinal architecture. *Nature Communications*, 8(1), 1–15. doi:10.1038/s41467-017-01624-y
- Wohl, S. G., & Reh, T. A. (2016). The microRNA expression profile of mouse Müller glia in vivo and in vitro. *Scientific Reports*, 6(October), 1–13. doi:10.1038/srep35423
- Xu, N., Papagiannakopoulos, T., Pan, G., Thomson, J. A., & Kosik, K. S. (2009). MicroRNA-145 Regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and Represses Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells. *Cell*, 137(4), 647–658. doi:10.1016/j.cell.2009.02.038
- Xu, S., Witmer, P. D., Lumayag, S., Kovacs, B., & Valle, D. (2007). MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster. *Journal of Biological Chemistry*, 282(34), 25053–25066. doi:10.1074/jbc.M700501200
- Zhao, B., Tumaneng, K., & Guan, K.-L. (2011). The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nature Cell Biology*, 13(8), 877–883. doi:10.1038/ncb2303
- Zhuang, Y., Peng, H., Mastej, V., & Chen, W. (2016). MicroRNA Regulation of Endothelial Junction Proteins and Clinical Consequence. *Mediators of Inflammation*, 2016. doi:10.1155/2016/5078627

## 11. Apéndice

11.1 El gen endógeno de referencia RNU6B se mantiene constante durante todas las observaciones en las condiciones estudiadas.

Se realizó el estudio por qPCR de la expresión del gen de referencia RNU6B con el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para evaluar su validez como gen endógeno de referencia y se identificó que a lo largo de los diferentes tratamientos y en las distintas condiciones la expresión se mantuvo constante, sirviendo como control para realizar las evaluaciones de los cambios de expresión de los seis miRNAs por el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . En la siguiente figura se muestra una gráfica representativa de la expresión de RNU6B bajo diferentes condiciones comparando el control con el primer tiempo tras el estímulo como representante del curso temporal (Figura 21).

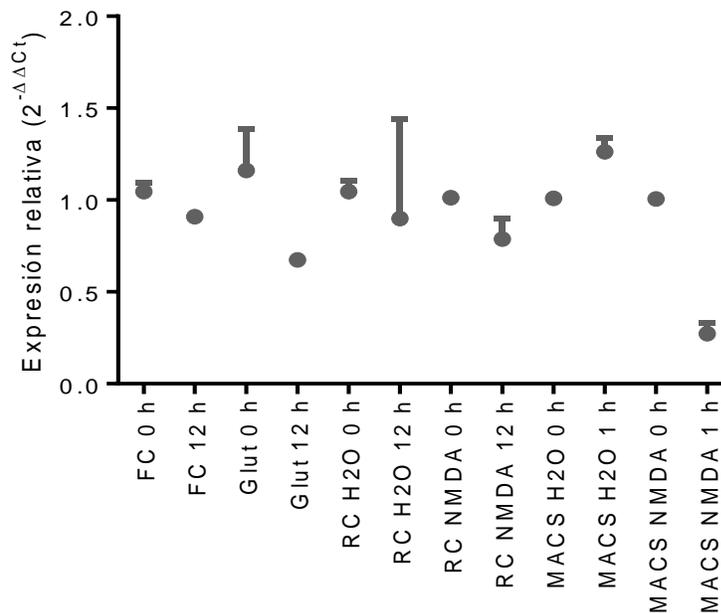


Figura 21. La expresión del gen de referencia RNU6B se mantiene constante en las diferentes condiciones evaluadas. Gráfica representativa del primer tiempo tras el tratamiento comparado con su propio control. Estadísticamente no hay diferencias significativas a lo largo de los cursos temporales ( $n=3$ ).

## 12. Anexos

Algunos resultados y métodos del proyecto fueron presentados en:

- Congreso anual de la Sociedad de Neurociencias. San Diego, CA, USA. 2016

"Epigenetic and miRNA-mediated silencing of Oct4 prevents Müller glia injury-induced dedifferentiation in mammals."

- Naoyuki Tanimoto (ed.), *Mouse Retinal Phenotyping: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, vol. 1753, [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7720-8\\_21](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7720-8_21), © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Capítulo 21. "In Vitro Assay for Mouse Müller Cell Phenotyping Through microRNA Profiling in the Damaged Retina." Luis I. Reyes-Aguirre, Heberto Quintero, Brenda Estrada-Leyva, Mónica Lamas.