



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

SEDE SUR

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

**Evaluación de la proliferación celular retiniana inducida por la
modificación en la metilación del DNA en un modelo murino de
daño *in vivo***

T E S I S

Que presenta

BIÓL. ROCÍO AZUCENA TREJO GROBA

**Para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS**

**En la especialidad de
NEUROFARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA EXPERIMENTAL**

**Directora de tesis
DRA. MÓNICA LAMAS GREGORI**

Ciudad de México

Noviembre, 2018

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio 13 del Departamento de Farmacobiología del 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 registro No. **614037** y al financiamiento con numero de proyecto **CB-2013-01 219847**.

*...A mi familia, que gracias a ellos,
hoy se puede disfrutar de las flores y los frutos.*

Agradecimientos

A la Dra. Mónica Lamas Gregori por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por la confianza y por todo el apoyo brindado a lo largo de la maestría.

A los Dres. Vinicio Granados Soto y Bladimir Roque Ramírez por todas las aportaciones para mejorar este proyecto y por la revisión tan enriquecedora del mismo.

Al Dr. A. Aranda-Fraustro y a la técnico Olga Pérez-Reyes del departamento de patología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez por todas las facilidades y ayuda para la realización de las tinciones histológicas en este proyecto.

A Cristina de los Santos y Brenda Estrada por tantas experiencias compartidas en el laboratorio. Más que compañeras de trabajo se han convertido en verdaderas amigas.

A todos aquellos que puedo llamar amigos, que han estado conmigo de alguna u otra manera, compartiendo vivencias y experiencias. Han sido gran apoyo, buena compañía y con quien he compartido grandes momentos.

A mi familia, a cada miembro de ella, que siempre han sido sustento y los pilares ejemplares que rigen mi vida, gracias a ustedes hoy soy lo que quiero ser. Les agradezco por cada enseñanza. Las palabras no alcanzan a expresar lo que el corazón siente, pero el amor que existe por ustedes es el más grande, puro en infinito, gracias por tanto.

A mis primos y mención especial para mi hermano que han sido cómplices de travesuras y grandes apoyos. Saben que pueden contar conmigo siempre. Hermanito, eres capaz de lograr todo lo que te propongas, utilízalo a tu favor y date cuenta de lo poderoso que eres.

A ti, mi compañero de vida, gracias por ser cómplice de innumerables aventuras, por tu apoyo y compañía, por enseñarme nuevos caminos, motivarme a ser mejor cada día, por confiar en mí y por enseñarme a “hacer consciencia para trascender”.

A todos mis seres de luz que ya no están en esta vida, pero sé que me acompañan a cada paso que doy.

A Dios y a la vida misma por permitirme vivirla.

Nada de lo que tenemos llega por casualidad, todo se ha pedido, se ha trabajado y construido. Somos el resultado de cada experiencia adquirida. Gracias maestría por formar un capítulo más de mi vida.

“Todo hombre puede ser, si se lo propone, escultor de su propio cerebro”

Santiago Ramón y Cajal

Índice general

Índice de figuras	i
Índice de tablas	iii
Abreviaturas	iv
Resumen	vi
Abstract.....	vii
1. Introducción	1
1.1 El globo ocular (Ojo).....	1
1.2 La retina	2
1.3 Patologías de la retina: El proceso de degeneración retiniana	4
1.4 Modelos de daño retiniano: Daño con N-metil-D-ácido aspártico (NMDA). 5	
1.5 El proceso de regeneración retiniano: el papel de la GM.....	6
1.5.1 Regeneración: generalidades.....	6
1.5.2 Regeneración y Troncalidad.....	7
1.5.3 Regeneración retiniana: la glía de Müller (GM)	8
1.6 Incapacidad de regeneración retiniana en mamíferos: relevancia de mecanismos epigenéticos.....	11
2. Justificación	15
3. Hipótesis	16
4. Objetivos	17
4.1 Objetivo general	17
4.2 Objetivos particulares.....	17
5. Métodos	18
5.1 Animales	18
5.2 Inyección intravítrea	18
5.3 Inyección intravítrea de SGI-1027	20
5.4 Enucleación.....	20
5.5 Preparación de PFA al 4%	20
5.6 Tinción Hematoxilina-eosina (H-E).....	20
5.7 Muerte celular, ensayo de TUNEL	21
5.8 Inmunofluorescencia	22

5.9	Inmunofluorescencia para BrdU y 5mC.....	22
5.10	Inmunofluorescencia para CRALBP y LIN28	23
5.11	Extracción de DNA con solventes orgánicos.....	24
5.12	Metilación global	25
6.	Resultados	26
6.1	Controles para la caracterización del modelo de daño con NMDA	26
6.1.1	Estructura y morfología de la retina	26
6.1.2	Evaluación de muerte celular por ensayo de TUNEL	27
6.1.3	Caracterización de la proliferación celular por la incorporación de BrdU	29
6.1.4	Caracterización por inmunohistoquímica de la expresión de CRALBP (marcador de GM)	29
6.1.5	Caracterización de la expresión de un gen asociado a pluripotencia (<i>Lin28</i>).....	30
6.2	Caracterización en el modelo de daño con NMDA en ratones P14-15	31
6.2.1	La inyección intravítrea de NMDA induce cambios en la estructura y morfología de la retina	31
6.2.2	La inyección intravítrea con NMDA induce muerte celular en la retina P14-P15.....	32
6.2.4	La inyección de NMDA 100 mM induce la proliferación celular (incorporación de BrdU) en la INL	33
6.2.3	La inyección intravítrea de NMDA 100 mM induce la expresión de <i>Lin28</i> en la GM	34
6.3	Efecto de la inhibición de la metilación por la administración de SGI-1027 10 µM sobre los procesos celulares y moleculares inducidos tras el daño retiniano con NMDA	35
6.3.1	Control experimental 1: Evaluación de la inhibición de la metilación del DNA por administración intravítrea de SGI-1027	35
6.3.2	Control experimental 2: La administración intravítrea de SGI-1027 induce muerte celular por apoptosis	38
6.3.3	La administración intravítrea de SGI-1027 induce la proliferación celular (incorporación de BrdU)	39
6.4	La inhibición de la metilación producida por la administración de SGI-1027 exagera el daño retiniano inducido por NMDA	40

6.4.1	Cambios estructurales y morfológicos	40
6.4.2	Inducción de muerte celular.....	42
6.4.3	Proliferación celular	44
6.4.4	Inducción de la expresión del gen de pluripotencia	46
6.5	Efectos a mediano plazo de la administración del inhibidor de la metilación en el modelo de daño retiniano inducido por NMDA	47
7.	Discusión	49
7.1	La inhibición de la metilación del DNA como propuesta terapéutica para la regeneración tisular.....	49
7.2	Efecto de la inhibición de la metilación en la retina en ausencia de daño excitotóxico	50
7.3	Efecto de la inhibición de la metilación en el modelo de daño excitotóxico	52
7.3.1	El protocolo de daño excitotóxico inducido por NMDA	52
7.3.2	Modificaciones estructurales y muerte celular	53
7.3.3	Proliferación (Incorporación de BrdU).....	53
7.3.4	Inducción de la expresión del gen de pluripotencia <i>Lin28</i>	54
7.4	La inhibición de la metilación del DNA exacerba el daño tisular en el modelo de daño excitotóxico.....	55
7.5	Regeneración retiniana en mamíferos: algunas puntualizaciones y nuevas perspectivas.....	57
8.	Conclusión	60
9.	Referencias	61

Índice de figuras

Figura 1. Corte transversal del globo ocular. Se observan algunas de sus estructuras y capas que lo conforman.....	2
Figura 2. Principales tipos celulares neurales que conforman la retina.....	3
Figura 3. Capas que conforman la retina.. ..	4
Figura 4. Esquema de los diferentes procesos por los que puede pasar una célula en regeneración.	7
Figura 5. Inocuidad de la administración intravítrea de los vehículos observada por H-E.	27
Figura 6. Inocuidad de la administración intravítrea de los vehículos observada por TUNEL.	28
Figura 7. Fotomicrografías de control positivo a BrdU en retinas de ratones P0.	30
Figura 9. Expresión por inmunofluorescencia del gen <i>Lin28</i> , controles positivo y negativo en ratones P2.	31
Figura 10. Daño causado por la administración intravítrea de NMDA.....	32
Figura 11. Análisis de muerte celular después del daño con NMDA 100 mM mediante técnica de TUNEL.....	33
Figura 12. Evaluación de la proliferación celular mediante el marcaje con BrdU después de la administración de NMDA 100 mM.....	34
Figura 13. Inmunofluorescencia a CRALBP y <i>Lin28</i> en las células de la retina de ratón P14-P15 a las 2 h y 24 h post-inyección intravítrea de NMDA 100 mM.	35
Figura 14. Bloqueo farmacológico de la metilación tras la inyección del inhibidor SGI-1027 10 μ M en la retina de ratón P14-15 a las 2 y 24 h post-inyección.....	36
Figura 15. Porcentaje de células positivas a 5mC después de la inyección del inhibidor SGI-1027 10 μ M en la retina de ratón P14-15.	37
Figura 16. Evaluación del efecto de la inhibición de la metilación global debida a la administración intravítrea de SGI-1027 10 μ M en ratones P14-P15 expresada en porcentaje (%).	38
Figura 17. Análisis de la muerte celular después de la administración intravítrea de SGI-1027 10 μ M en la retina de ratón P14-15 mediante técnica de TUNEL.....	39

Figura 18. Expresión por inmunofluorescencia de BrdU y CRALBP después de 2 h y 24 h de la administración intravítrea de SGI-1027 10 μ M en la retina de ratón P14-15.....	40
Figura 19. Estructura de la retina después del daño con NMDA y previa administración de SGI-1027 en ratones P14-15. Cortes sagitales de retina de 5 μ M con tinción H-E.....	41
Figura 20. Comparación de NMDA contra la combinación de SGI-1027 + NMDA a las 24 h post-inyección en retinas de ratones P14-15.....	42
Figura 21. Análisis de muerte celular por apoptosis con la técnica de TUNEL tras la inyección intravítrea de la combinación de SGI-1027 + NMDA. Estructura de la retina de ratones P14-15.....	43
Figura 22. Comparación de la muerte celular entre el tratamiento con NMDA contra la combinación SGI-1027 + NMDA a las 24 h post-inyección.	44
Figura 23. Análisis de la proliferación celular mediante marcaje positivo a la incorporación de BrdU tras la inyección intravítrea de la combinación de SGI-1027 + NMDA.....	45
Figura 24. Comparación de la proliferación celular por la incorporación de BrdU entre NMDA y SGI-1027 + NMDA a las 24 h post-inyección.....	46
Figura 25. Comparación de la expresión del gen asociado a pluripotencia <i>Lin28</i> y de CRALBP 24 h post-inyección de la combinación de SGI-1027 + NMDA contra NMDA.....	47
Figura 26. Evaluación histológica por H-E a los 6 días de la administración intravítrea de la combinación de SGI-1027 + NMDA en la retina de ratones P14-P15.....	48
Figura 27. Respuestas por las que puede atravesar la GM ante el daño retiniano. Se esquematizan dos respuestas principales en equilibrio: regeneración y degeneración.....	59

Índice de tablas

Tabla 1. Grupos experimentales, tratamientos y parámetros evaluados.

Tabla 2. Resumen de los resultados obtenidos de todos los tratamientos y parámetros evaluados.

Abreviaturas

ASCL1: Factor de transcripción bHLH de la familia achaete-scute

5mC: 5-metilcitosina

BrdU: Bromodesoxiuridina

CH₃: Grupo metilo

CRALBP: Proteína de unión a retinaldehído celular

DAPI: 4',6-diamino-2-fenidol

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

Dnmt: DNA metiltransferasa

GCL: Capa ganglionar

GFAP: Proteína fibrilar acídica de la glía

GLAST: Transportador de glutamato aspartato

GM: Glía de Müller

GS: Glutamina sintasa

H-E: Hematoxilina-Eosina

ILM: Membrana limitante interna

INL: Capa nuclear interna

IPL: Capa plexiforme interna

LIN28: Factor de transcripción de linaje 28

NMDA: N-metil-D-aspartato

OCT4: Factor de transcripción de unión a octámeros 4

ONL: Capa nuclear externa

OPL: Capa plexiforme externa

P: Post-natal

PFA: Parafolmaldehído

PRS/SRS: Capa de fotorreceptores

RNA: Ácido ribonucleico

RPE: Epitelio pigmentario

SAM: S-Adenosil- L- Metionina

SNC: Sistema Nervioso Central

TUNEL: Marcador de final de corte de dUTP de terminal deoxinucleotidil transferasa

Resumen

La regeneración retiniana en especies permisivas es un fenómeno que se ha descrito en la literatura en los últimos años. Esta respuesta se lleva a cabo por células de la glía de Müller, el tipo glial más abundante en la retina. Este tipo celular comparte origen embrionario con las neuronas retinianas y se ha descrito su capacidad para fungir como células troncales, principalmente en peces. Sin embargo, este proceso no se presenta en mamíferos. La glía de Müller de mamíferos responde al daño proliferando descontroladamente e hipertrofiándose, procesos que finalmente causan la formación de una cicatriz glial que deriva en la pérdida funcional. Para identificar los mecanismos por los cuales la glía de Müller responde diferencialmente en peces y mamíferos se comparó el patrón de expresión de genes específicos después del daño en ambas especies. Estos resultados permitieron especular que en ese proceso intervienen factores epigenéticos. En la presente tesis se evaluó el efecto de la inhibición de la metilación del DNA, con el fármaco SGI-1027, en un modelo de daño excitotóxico con NMDA en ratones jóvenes (P14-15). Se evaluaron cambios a nivel estructural, morfológico, muerte celular, incorporación de BrdU y la expresión de un gen de pluripotencia, *Lin28*. Los resultados obtenidos indican que la inhibición de la metilación en el DNA produce muerte celular retiniana a las 2 h post-inyección en GCL, IPL y OPL y a las 24 h en la ONL, así como la incorporación de BrdU en la INL desde las 2 h post-inyección. Esta inhibición exacerbó el daño retiniano; se pierde la estructura laminar de la retina casi por completo, la muerte celular se incrementa así como la incorporación de BrdU desde las 2 h post-inyección en la capa INL, además esta marca se vuelve difusa, la estructura ordenada de la retina ya no es visible, la marca de CRALBP (característica de la glía de Müller) se confina principalmente en la GCL e incluso en el espacio extra-retiniano y aparece una nueva capa de células que responden positivamente al marcaje de *Lin28*. En este sentido, los datos sugieren que se ha producido una proliferación deletérea para la retina y que finalmente se refleja en la pérdida de la localización característica de las células retinianas.

Abstract

The retinal regeneration in permissive species is a phenomenon that has been described in the literature in recent years. This response is carried out by cells of the Müller glia, the most abundant glial type in the retina. Müller cells share an embryonic origin with retinal neurons and it has been described that, in the zebra fish, these cells have the ability to function as stem cells. However, in mammals, Müller glia responds to damage with an uncontrolled proliferation and developing hypertrophy. Ultimately, these processes cause the formation of a glial scar that results in functional loss. In order to identify the mechanisms by which the Müller glia responds differentially in fish and mammals, our laboratory have previously compared the expression pattern of specific genes after damage. Those results allowed us to speculate that epigenetic factors are involved in the impairment of retinal regeneration in mammals. Therefore, in this study we evaluated the effect of the inhibition of DNA methylation, with the drug SGI-1027, in a NMDA-induced experimental model of excitotoxic damage in young mice (P14-15). Changes were evaluated at the structural, morphological, cell death and BrdU incorporation levels. We also evaluated the expression of a pluripotency gene, *Lin28*. DNA methylation inhibition induced retinal cell death at 2 h post-injection in the GCL, IPL and OPL and at 24 h in the ONL; as well as the incorporation of BrdU in the INL since 2 h post-injection. DNA methylation inhibition exacerbated the NMDA-induced retinal damage: the laminar structure of the retina was almost completely lost; cell death was increased as well as the incorporation of BrdU from 2 h post-injection in the INL layer. The ordered structure of the retina was no longer visible after DNA methylation inhibition and the CRALBP mark (characteristic of Müller glia) was confined mainly to the GCL and even to the extra-retinal space. A new layer of cells appeared that immunoreacted to an anti-LIN28 antibody. Our data suggests that DNA methylation inhibition induced a deleterious process of cellular proliferation that was reflected in retinal cell delocalization.

1. Introducción

1.1 El globo ocular (Ojo)

El ojo es el órgano sensorial encargado de la visión. Al realizar un corte lateral al ojo se pueden distinguir tres capas (Fig.1):

- **Túnica externa:** cuya función es proteger y dar forma al ojo gracias a su consistencia. En esta capa, se encuentran los elementos intraoculares. La túnica externa se localiza rodeando al globo ocular hasta la salida del nervio óptico y ancla a los músculos extrínsecos del ojo. En la parte anterior de esta capa se localiza la córnea que funciona como un lente debido a su forma curva. En la parte posterior, se localiza la esclera que está compuesta por fibras de colágena.
- **Túnica media:** en esta capa se localizan el iris, el esfínter del iris, el músculo dilatador, la coroides y el cuerpo ciliar. En contacto con el cuerpo ciliar se localiza el epitelio pigmentario; un tejido constituido por melanocitos engrosados que impiden el paso indiscriminado de luz y regulan la difusión, el transporte activo y la filtración hacia el ojo.
- **Túnica interna:** en esta última se localizan la retina, el humor vítreo, el cristalino y el humor acuoso que proporciona nutrición a los elementos internos del ojo y mantiene la tensión intraocular (Graue Wiechers, 2009).

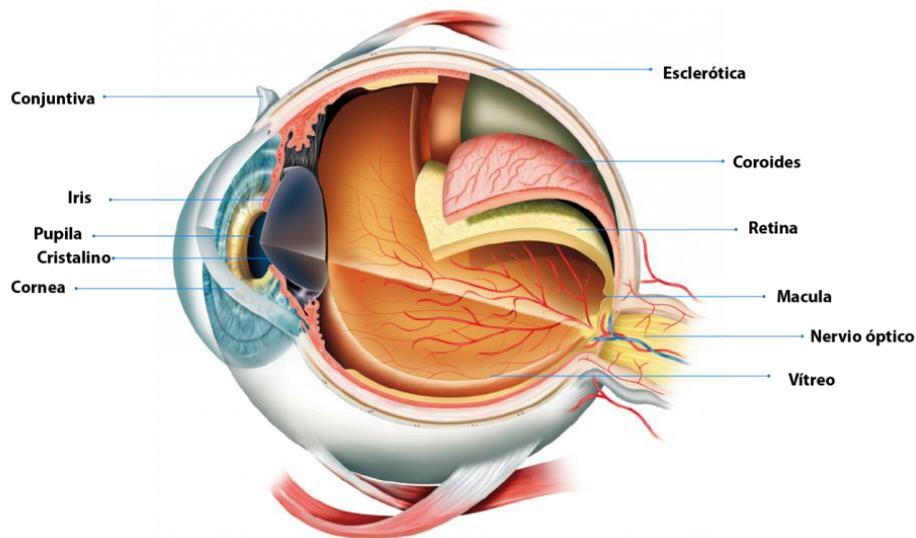


Figura 1. Corte transversal del globo ocular. Se observan algunas de sus estructuras y capas que lo conforman.

1.2 La retina

La retina es el tejido encargado de recoger, elaborar y transmitir señales visuales al cerebro. Abarca toda la porción interna y posterior del globo ocular y, por su origen embrionario, se considera parte del sistema nervioso central (SNC). Durante el desarrollo las células de la retina se derivan del tubo neural a partir de células progenitoras similares a aquellas que generan las neuronas y glía del cerebro (Livesey et al., 2001).

Histológicamente la retina de los vertebrados se constituye por 6 tipos de células neuronales. Los fotorreceptores (conos y bastones), células bipolares, horizontales, amacrinas y ganglionares (Fig. 2). Además, la retina contiene 3 tipos celulares gliales: atrociitos, microglía y glía de Müller (GM) (Blackshaw et al., 2004) y 1 tipo celular epitelial, el epitelio pigmentario, que es la capa más externa de la retina (Graue Wiechers, 2009).

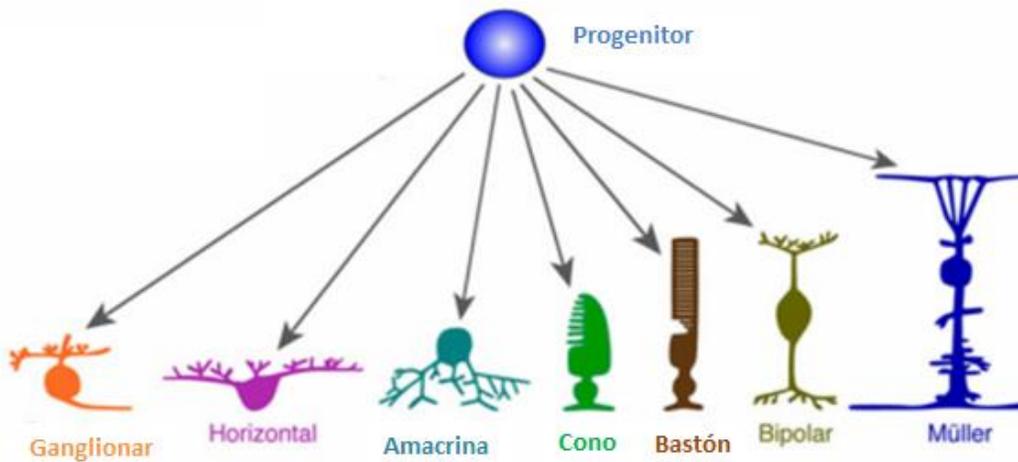


Figura 2. Principales tipos celulares neuronales que conforman la retina. Estos 6 tipos celulares se derivan de un mismo progenitor incluyendo a las células de la glía de Müller. Modificado de (Xiang, 2013).

Los diferentes tipos celulares de la retina se encuentran organizados en forma laminar (Fig. 3). La capa más externa está conformada por el epitelio pigmentario, que a su vez está en contacto con la capa de segmentos externos de los fotorreceptores. La capa nuclear externa (ONL, por sus siglas en inglés “outer nuclear layer”) contiene los cuerpos celulares de conos y bastones. En la capa plexiforme externa (OPL, por sus siglas en inglés “outer plexiform layer”) se localizan las uniones neuronales de los fotorreceptores con las células bipolares y horizontales. La capa nuclear interna (INL, por sus siglas en inglés “inner nuclear layer”) contiene los somas de las células bipolares, horizontales y amacrinas así como los de la GM, que se prolongan a lo largo de toda la retina. En la capa plexiforme interna (IPL, por sus siglas en inglés “inner plexiform layer”) se encuentran las uniones neuronales de las células de las capas internas con las células ganglionares y, finalmente, la capa ganglionar (GCL) aloja los cuerpos de las células ganglionares cuyos axones forman el nervio óptico (Swaroop et al., 2010).

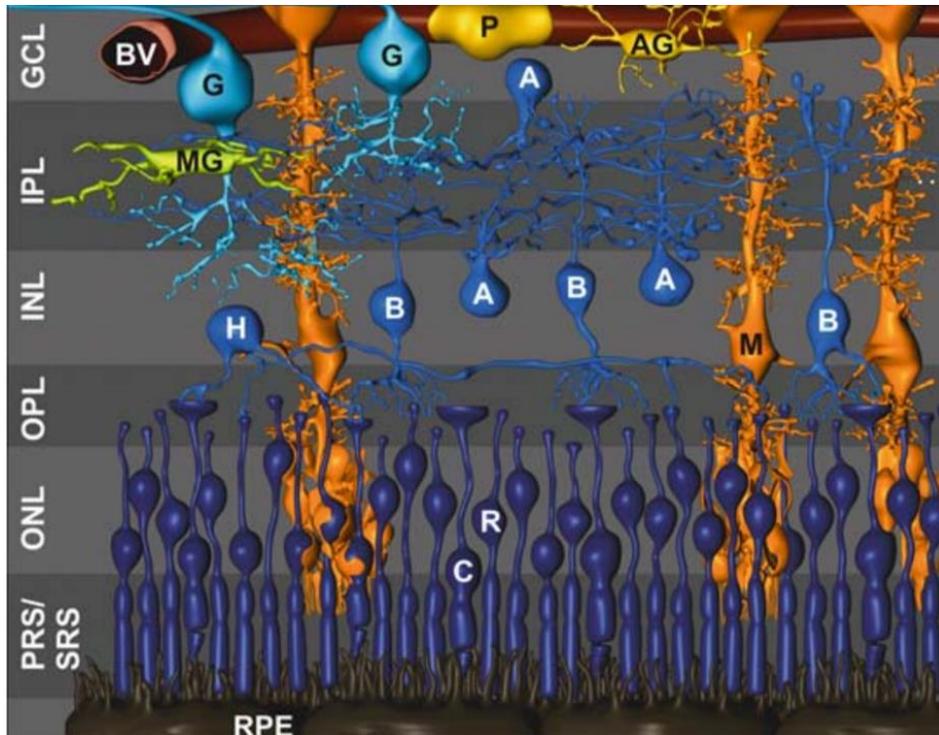


Figura 3. Capas que conforman la retina. Epitelio pigmentario retiniano (RPE), Capa de fotorreceptores (PRs/SRS), Capa nuclear externa (ONL), Capa plexiforme externa (OPL), Capa nuclear interna (INL), Capa plexiforme interna (IPL), Capa ganglionar (GCL), Vaso sanguíneo (BV), Célula ganglionar (G), Astroglía (AG), Microglía (MG), Célula amacrina (A), Célula bipolar (B), Célula horizontal (H), Conos y bastones (C,R), glía de Müller (M).

1.3 Patologías de la retina: El proceso de degeneración retiniana

Las distrofias de la retina son la mayor causa de ceguera e involucran problemas de salud, sociales y económicos que afectan a millones de personas alrededor del mundo. La OMS reporta que existen alrededor de 285 millones de personas con alguna discapacidad visual y 39 millones de ellas son ciegas. Estas limitantes visuales afectan, en el 28% de los casos, la capacidad de las personas a llevar una vida productiva, siendo las enfermedades de la retina la principal causa de discapacidad visual. En México, según datos del INEGI (2014) la ceguera es segunda causa de discapacidad en el país.

Las principales enfermedades que afectan a la retina son: retinitis pigmentosa, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma y retinopatía diabética. Si bien la etiología de las patologías difiere, éstas comparten ciertas

características como la pérdida irreversible de neuronas que conforman la retina y la indisponibilidad de tratamientos curativos o preventivos. En general, podemos generalizar a las retinopatías en dos modelos: el glaucoma, que afecta principalmente a las células ganglionares, y condiciones como la retinopatía diabética que afectan inicialmente a los fotorreceptores. En cualquier caso, el daño generado en una capa retiniana se extiende hacia las otras capas resultando, generalmente, en muerte de todos los tipos neuronales.

Frente a las retinopatías, las aproximaciones terapéuticas actuales incluyen terapias farmacológicas, celulares, genéticas, trasplantes, procedimientos quirúrgicos, etc. (Pébay, 2014). Adicionalmente, se realizan investigaciones que se enfocan en desarrollar terapias más efectivas y menos invasivas. Con este fin ha sido necesario contar con modelos de daño que mimeticen algunos signos y síntomas característicos en las patologías retinianas y que permitan comprender los procesos que subyacen a su desarrollo.

1.4 Modelos de daño retiniano: Daño con N-metil-D-ácido aspártico (NMDA)

En general, experimentalmente se utilizan dos modelos de daño retiniano: uno generado mediante la exposición a luz intensa que daña particularmente a los fotorreceptores, y otro modelo que se basa fundamentalmente en la producción de daño excitotóxico mediante la administración de glutamato, kainato o NMDA (Karl & Reh, 2012).

La inyección intravítrea con el análogo de glutamato NMDA causa una sobreestimulación de los receptores ionotrópicos a glutamato. En la retina, este proceso deriva en un daño por excitotoxicidad debido a la entrada del ion Ca^{2+} que activa fosfolipasas, endonucleasas y proteasas que dañan al citoesqueleto, la membrana y al DNA, causando finalmente apoptosis.

La respuesta que se obtiene tras la inyección intravítrea con NMDA es la pérdida de las células amacrinas, ganglionares y horizontales. En este proceso, la

intensidad de la respuesta depende de la concentración y de la edad del animal (Karl & Reh, 2012). En algunas especies como en el pez cebra y el pollo, el daño excitotóxico induce la reincorporación de las células de la GM al ciclo celular, su proliferación y su desdiferenciación y, finalmente, su diferenciación en nuevas neuronas (Karl et al., 2008).

Estas observaciones evidenciaron que la GM tiene la capacidad de regeneración de la retina en respuesta al daño (Lenkowski et al., 2005).

1.5 El proceso de regeneración retiniano: el papel de la GM

1.5.1 Regeneración: generalidades

La regeneración tisular es un proceso complejo que involucra diferentes mecanismos celulares incluyendo desdiferenciación, proliferación, y diferenciación *de novo* de células troncales o progenitoras.

De forma general, para que ocurra un proceso de regeneración tisular se requiere de la producción de nuevas células que sean capaces de reconstruir las estructuras perdidas.

La génesis de nuevas células puede ocurrir a través de diferentes procesos celulares. Entre estos se incluyen; proliferación y diferenciación de células troncales o progenitoras residentes en la zona de la lesión, la división de células ya diferenciadas o la desdiferenciación de células a un estado troncal y la transdiferenciación de células maduras a un precursor semejante a una célula troncal u a otro tipo celular (Fig. 4) (King & Newmark, 2012).

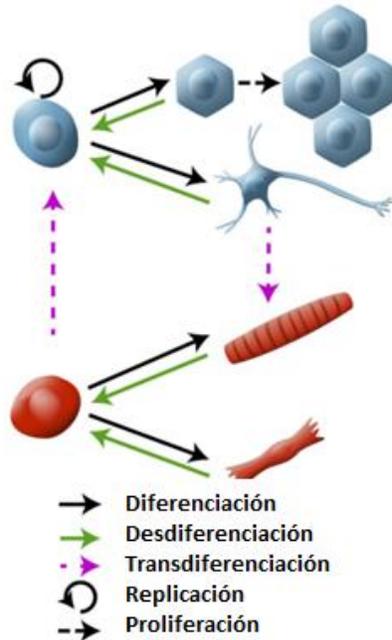


Figura 4. Esquema de los diferentes procesos por los que puede pasar una célula en regeneración. Diferenciación, desdiferenciación, transdiferenciación, replicación y proliferación.

1.5.2 Regeneración y Troncalidad

El concepto de troncalidad proviene del término “Stammzelle”. Se refiere a dos propiedades de las células troncales que son fundamentales para permitir los procesos de regeneración tisular: la capacidad de **auto renovación**, es decir de perpetuarse a sí mismas mediante divisiones, y la capacidad de **diferenciación** hacia células de linajes diferentes que se asocia con el concepto de “potencialidad”. La troncalidad depende del origen embrionario y de la especialización durante el desarrollo. Por consenso, las células troncales se clasifican en:

1. Pluripotentes: aquellas células que provienen de la masa celular interna del blastocisto y pueden diferenciarse (*in vitro e in vivo*) a linajes de las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo).
2. Multipotentes: células que pueden diferenciarse a diferentes linajes de una misma capa germinal.
3. Unipotentes: células que pueden diferenciarse a un solo linaje de una capa germinal.

Desde un punto de vista molecular, el estado de potencialidad se ha asociado con la expresión de un número limitado de genes, por ejemplo: *Sox2*, *Oct4*, *Nanog* y *Lin28*. El inicio de la expresión de estos genes en cualquier célula sugiere que la célula se encuentra en un estado que permite su diferenciación hacia otros linajes. Por el contrario el término de su expresión, se ha asociado, generalmente, a que la célula se ha diferenciado. Los factores de pluripotencia SOX2, OCT4 y NANOG en conjunto, reprimen la actividad transcripcional de los genes implicados en la formación de las 3 capas blastodérmicas. Por esta razón se han utilizado experimentalmente como “marcadores de potencialidad” (Chávez-González et al., 2017).

1.5.3 Regeneración retiniana: la glía de Müller (GM)

Heinrich Müller, en 1851, describió este tipo celular glial como un tipo de fibras radiales en la retina de peces, anfibios y aves (Hamon et al., 2016). La GM es la responsable de numerosos roles que contribuyen a mantener la homeostasis retiniana, así como la función visual. La GM representa aproximadamente del 4 al 5% de las células de la retina (Hamon et al., 2016), siendo el tipo glial más abundante (90%) y el único que presenta un origen embriológico común con las neuronas de la retina, muy conservado en vertebrados (Vecino et al., 2016). Además, la GM es de los últimos tipos celulares que se desarrollan durante la embriogénesis, prolongándose su formación incluso hasta el día 12 post-natal (P) (Bedran-Russo et al., 2013).

La GM se puede identificar experimentalmente mediante el análisis de la expresión génica de marcadores específicos como la proteína de unión a retinaldehído celular (CRALBP), proteína Glutamina Sintasa (GS) y el transportador de glutamato aspartato (GLAST) (Vecino et al., 2016).

Recientemente se ha demostrado que la GM puede fungir como célula troncal unipotente de la retina y se ha sugerido que pudiera presentar potencialmente poder regenerativo en este tejido (Bedran-Russo et al., 2013).

El modelo más utilizado para el estudio de la regeneración retiniana es el pez cebra (*Danio Renio*). En esta especie se ha observado que a partir de la GM se pueden regenerar todos los tipos neuronales que se hayan perdido después de daño de tal manera que finalmente se obtiene una regeneración funcional (Hamon et al., 2016).

En el pez cebra se ha descrito que cuando la GM prolifera se expresan algunos genes asociados a progenitores como: SOX2, un factor de transcripción imprescindible para el desarrollo correcto de la retina (Matsushima et al., 2011); LIN28, factor de transcripción que se requiere para mantener el estado de pluripotencia y que, junto con otros genes como *Ascl1*, es imprescindible para la desdiferenciación de la GM (Ramachandran et al., 2010).

El proceso regenerativo de la GM en las especies permisivas involucra diversos mecanismos. En pasos sucesivos, la GM re-entra a ciclo celular, prolifera y sigue un proceso de desdiferenciación con el que adquiere un fenotipo de progenitor retiniano. En este punto, la célula desdiferenciada ha adquirido la capacidad para diferenciarse en nuevas neuronas. Cada uno de estos cambios va acompañado de modificaciones en la expresión génica. Durante el proceso de desdiferenciación se produce una reducción en la expresión de marcadores específicos de la retina como CRALBP y GS (Hamon et al., 2016) y un incremento en la expresión de marcadores asociados a células progenitoras como los genes *Ascl1* y *Six3*; y de genes usualmente expresados por células pluripotentes como *Oct4*, *Lin28*, *Klf4* y *Sox2* (Karl et al., 2008.; Reyes-Aguirre & Lamas, 2016).

Específicamente, el factor de transcripción proneural *Ascl1* y el factor de transcripción asociado a pluripotencia *Lin28* se inducen en la GM después del daño y su co-expresión es imprescindible para la desdiferenciación y proliferación de este tipo glial (Ramachandran et al., 2010).

En otras especies, como en el pollo, se ha demostrado que la capacidad de regeneración a partir de la GM existe pero está restringida a la células amacrinas, bipolares y ganglionares (Fischer & Reh, 2001).

Por el contrario, la respuesta fisiológica ante el daño en el SNC de mamíferos es principalmente un proceso llamado gliosis reactiva. En esta reacción entran en juego diversos tipos celulares como la microglía, precursores de oligodendrocitos y astrocitos. En la retina, las células de la GM responden hipertrofiándose e induciendo la expresión de la proteína fibrilar acídica de la glía (GFAP) (Thomas et al., 2016). Esto se acompaña por un proceso de proliferación descontrolada, que va a dar como resultado la formación de una cicatriz glial constituida predominantemente por astrocitos. Este proceso inicialmente es neuroprotector. Sin embargo, la liberación de factores tróficos y la pérdida de función de la GM terminan por contribuir a la neurodegeneración y con ello a la pérdida de la visión (Fawcett & Asher, 1999; Lewis & Fisher, 2003).

En los últimos años se ha podido demostrar que, bajo condiciones específicas, algunas células de la GM de mamíferos tienen la capacidad de desdiferenciarse después del daño y subsecuentemente diferenciarse hacia fenotipos neuronales. En experimentos *in vivo* con ratones adultos se observó que la GM en respuesta al daño con NMDA se desdiferencia a una célula parecida a un progenitor retiniano, reentra a ciclo celular y se divide. Esto ocurre siempre y cuando se administre en conjunto factores de crecimiento (EGF o FGF1 e insulina). Sin embargo, la GM solo llega a expresar marcadores de neuronas inmaduras (GAD67) y no logra diferenciarse finalmente en neuronas maduras (Karl et al., 2008; Karl & Reh, 2012).

También, se ha descrito que al sobreexpresar el gen *Ascl1* en un modelo de daño agudo en ratones adultos *in vivo* en combinación con la administración de Tamoxifeno, estimula a algunas células de la GM a responder de forma similar a como ocurre inicialmente en el pez cebra. Es decir, disminuye la expresión de

Sox9 y se incrementa la de marcadores de células bipolares y fotorreceptores. Sin embargo, esta respuesta se pierde pronto. Una respuesta similar se observa en ratones jóvenes (P14-P16), aunque se producen más células que expresan marcadores tempranos de diferenciación de células amacrinas (*Pax6*), bipolares y fotorreceptores (*Otx2*). Finalmente, estas células tampoco se diferencian a neuronas maduras. Por lo cual, se concluyó que ninguna de estas respuestas son suficientes para estimular la regeneración a neuronas diferenciadas a partir de GM.

Tanto en células en cultivo como en modelos *in vivo* en nuestro laboratorio se ha podido demostrar que la GM contiene la maquinaria necesaria para iniciar un proceso de regeneración (Ramirez et al, 2012; Reyes-Aguirre et al, 2013; Ferraro et al, 2015; Quintero et al, 2016; Reyes-Aguirre & Lamas, 2016).

Resultados importantes del conjunto de estos experimentos son las observaciones de que una diferencia entre la retina madura y la de ratones P14-16 era la accesibilidad a la cromatina (Ueki et al., 2015) y de que la manipulación de los patrones epigenéticos, y por lo tanto, de la estructura de la cromatina mediante fármacos, tenía un efecto directo sobre la capacidad regenerativa de la GM en mamífero.

Entonces, si la estructura anatómica de la retina está altamente conservada desde el desarrollo embrionario de todos los vertebrados (Hamon et al., 2016) y la GM contiene la maquinaria necesaria para iniciar un proceso de regeneración, ¿Qué factores o procesos se encuentran implicados en la inhibición de la regeneración retiniana en mamíferos?.

1.6 Incapacidad de regeneración retiniana en mamíferos: relevancia de mecanismos epigenéticos

El término epigenética se acuñó en la década de los 50's para describir el mecanismo de expresión diferencial del genoma por el cual se desarrollan

diferentes tipos celulares, tejidos, órganos y sistemas a partir de un único genoma (Robles, Ayala Ramírez, & Perdomo Velásquez, 2012). Las modificaciones epigenéticas son sensibles al ambiente e incluyen aquellos cambios heredables en la expresión génica que no conllevan cambios en la secuencia de nucleótidos del DNA. Entre los procesos epigenéticos se incluyen:

- Metilación del DNA
- Modificación de histonas (acetilación, fosforilación, metilación, etc)
- Regulación post-transcripcional por RNAs no codificantes

En conjunto, estas modificaciones controlan la condensación de la cromatina regulando el acceso espacial de la maquinaria transcripcional y con ello la expresión génica.

Estos procesos epigenéticos se consideran como una limitante en la regeneración en la GM. Por ejemplo, la relevancia del proceso de modificación de histonas se demostró mediante la sobreexpresión del factor de transcripción *ASCI1* en el ratón en un modelo experimental in vivo. Este factor, que es imprescindible para el proceso de regeneración en el pez cebra, está ausente en el mamífero. Su sobreexpresión habilita a la GM de ratones adultos a iniciar el proceso de desdiferenciación, pero la diferenciación neuronal posterior, y por lo tanto, el inicio del proceso de regeneración solo es posible en presencia de un fármaco inhibidor del proceso de acetilación de histonas (Jorstad et al., 2017).

La discrepancia de respuestas ante el daño entre especies impulsó el estudio contrastado del patrón de expresión de genes específicos asociados a células progenitoras y a pluripotencia después del daño entre peces y mamíferos adultos. Los experimentos confirmaron que el patrón de expresión génico difiere entre especies. En particular, se determinó que el gen *Oct-4* presenta un comportamiento diferencial. Así, en peces, *Oct4* se encuentra expresado antes del daño y mantiene su expresión, al menos, hasta 7 días después. Sin embargo, en

mamíferos, este gen se encuentra silenciado en las células de la retina, se induce su expresión en respuesta al daño a tiempos cortos (4 h) y se regresa a las condiciones basales transcurridas 24 h. La activación de *Oct4* se correlacionó con la disminución en la expresión del gen *Dnmt3b* (Reyes-Aguirre & Lamas, 2016) encargado de mantener la metilación *de novo* del DNA (Xie et al., 1999).

Estas observaciones sustentaron la hipótesis de que existen mecanismos epigenéticos, como la metilación del DNA, directamente relacionados con el silenciamiento de genes que impiden que la GM de mamíferos lleve a cabo el proceso de regeneración tras el daño retiniano.

La metilación del DNA es uno de los mecanismos implicados en la regulación de la expresión génica en mamíferos. Este proceso afecta las interacciones DNA-proteínas, la estructura y replicación del DNA, la diferenciación celular y la transcripción de elementos genéticos. La metilación del DNA se caracteriza por la adición enzimática de un grupo metilo (CH₃) al carbono 5 de la citosina que genera un grupo 5-metilcitosina (5mC). Esta marca se presenta en una distribución heterogénea en el genoma, pero principalmente concentrada en regiones ricas en dinucleótidos CpG, denominadas islas CpG. Estos patrones de metilación del DNA son específicos para cada especie y tipo de tejido. El proceso de metilación del DNA está mediado por DNA-metiltransferasas (Dnmt's).

Las Dnmt's se clasifican de la siguiente manera:

- Dnmt1= se encarga de la metilación de mantenimiento, ya que tiene una alta especificidad por citosinas en el DNA recién sintetizado durante la replicación celular. Su expresión es más abundante en células proliferantes.
- Dnmt3= de la que se conocen dos isoformas Dnmt3a y Dnmt3b. Ambas son metiltransferasas *de novo* ya que tienen una alta afinidad por DNA previamente desmetilado. Este tipo de metilación ocurre principalmente

durante la embriogénesis aunque la Dnmt3a también se expresa en el SNC de adultos.

La metilación, como otras modificaciones epigenéticas, es un proceso reversible que puede ocurrir global o localmente. En la actualidad, como herramienta farmacológica se han desarrollado diversos fármacos que permiten la inhibición de las Dnmt's. Entre ellos, el más utilizado es la 5-Azacitidina, un análogo de la citidina, cuya principal aplicación es en el tratamiento de tumores; o el SGI-1027, un derivado de las quinolonas. Este es un fármaco relativamente nuevo, más eficaz que otras moléculas utilizadas previamente en la terapéutica. El fármaco SGI-1027 actúa por inhibición competitiva en la reacción de metilación con S-adenosil-L- metionina (SAM) que es el sustrato de las Dnmt's, degrada a la Dnmt1 a las 24 h por vía proteasoma y no se incorpora al DNA celular. Además, este inhibidor tiene la ventaja de ser más estable en un medio fisiológico que otros inhibidores, presenta una CI_{50} de 6-13 μ M sin causar daño tóxico a las células evitando los efectos secundarios de otros fármacos (Gros et al., 2015).

En las células de la GM de ratones adultos la administración intravítrea del inhibidor SGI-1027 permite que se mantenga la expresión del gen de pluripotencia *Oct4* hasta 24 h después del daño (Reyes-Aguirre & Lamas, 2016). Estas observaciones sugieren que, en la GM de mamíferos, la inducción de la expresión de genes asociados a pluripotencia pudiera estar frenada debido a procesos de metilación del DNA. En ese caso, el bloqueo de la metilación del DNA podría favorecer la expresión sostenida de estos genes y por lo tanto de la adquisición de pluripotencia por parte de la GM.

2. Justificación

En algunos vertebrados, peces y aves existe regeneración neuronal retiniana a partir de células de la GM. Sin embargo, en mamíferos este proceso de regeneración es parcial. Se ha propuesto que la metilación del DNA es un mecanismo que bloquea la dediferenciación de la GM después del daño impidiendo la regeneración celular y tisular. Por esta razón se propone el bloqueo farmacológico de la metilación como un mecanismo de inducción de la dediferenciación de la GM en mamíferos a través de la reactivación de la expresión de genes que se encuentran silenciados.

3. Hipótesis

El bloqueo farmacológico de la metilación con SGI-1027 favorecerá procesos de regeneración (desdiferenciación y proliferación) en respuesta al daño retiniano, así como la sobreexpresión de *Lin28*, un gen asociado a pluripotencia.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del daño excitotóxico con NMDA y de la administración del inhibidor de la metilación SGI-1027 en la proliferación celular y en la expresión de un gen asociado a células progenitoras (*Lin28*) en un modelo murino de daño tisular retiniano *in vivo*.

4.2 Objetivos particulares

1. Estandarizar y caracterizar el modelo de daño excitotóxico mediante la administración intravítrea de NMDA en la retina de ratón P 14-15 *in vivo*.
2. Caracterizar por inmunohistoquímica la proliferación celular mediante el marcaje con BrdU, la expresión de genes característicos de la GM y del gen asociado a pluripotencia *Lin28* en un modelo de daño *in vivo* en ratón.
3. Evaluar el efecto del bloqueo farmacológico de la metilación del DNA mediante la administración intravítrea de SGI-1027 en la retina de ratón.
4. Evaluar por inmunohistoquímica cambios en la proliferación celular mediante el marcaje con BrdU, la expresión de genes específicos de la GM y del gen asociado a pluripotencia (*Lin28*) después del daño y de la administración de SGI-1027 en un modelo de daño *in vivo* en ratón.

5. Métodos

5.1 Animales

Se utilizaron ratones de ambos sexos de la cepa C57BL/6J de entre 14 y 15 días post natal (P). Se mantuvieron en el bioterio del CINVESTAV Sede Sur con un ciclo de luz oscuridad 12/12 y temperatura controlada, con alimento y agua *ad libitum*. Los animales fueron tratados con estricto apego a los lineamientos del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del CINVESTAV (CICUAL con el número de protocolo 0259-17).

5.2 Inyección intravítrea

Los ratones se anestesiaron vía intraperitoneal con pentobarbital sódico a una dosis de 0.1 mg/10 g de peso. Posteriormente, se les colocó una gota en cada ojo de anestesia tópica, tetracaína y otra de tropicamida/fenilefrina que causa midriasis y ciclopejía.

Los animales se colocaron bajo el microscopio estereoscopio y con ayuda de una aguja de 27 G se realizó una incisión en la ora serrata temporal superior del ojo izquierdo en donde con ayuda de una aguja acoplada a una jeringa Hamilton de 5 µl se administraron, según el grupo, 2 µl de volumen total final dentro del humor vítreo como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Grupos experimentales, tratamientos y parámetros evaluados.

Tratamiento	Ojo inyección (2 µl)	Ojo vehículo (2 µl)	Ojo intacto
Tinción H&E	NMDA 100 mM	Solución salina 0.9%	–
	SGI-1027 10 µM	DMSO al 0.05%	–
	SGI-1027 + NMDA	Solución salina + DMSO	–
TUNEL y pluripotencia	NMDA 100 mM	Solución salina 0.9%	–
	SGI-1027 10 µM	DMSO al 0.05%	–
	SGI-1027 + NMDA	Solución salina + DMSO	–
Incorporación de BrdU (proliferación)	NMDA 100 µM / BrdU 10mM	BrdU 10 mM / solución salina.	–
	SGI-1027 10 µM / BrdU 10mM	DMSO al 0.05%/ BrdU 10 mM	–
	SGI-1027 + NMDA / BrdU (24 h después)	DMSO al 0.05% + BrdU / solución salina (24 h después)	–
Metilación	SGI-1027 10 µM	DMSO al 0.05%	–

Para evitar la sequedad ocular luego de la inyección se les colocó una capa de ácido poliacrílico oftálmico en gel.

Posteriormente a la inyección intravítrea, los animales se regresaron a sus cajas con agua y comida *ad libitum* y se mantuvieron en observación.

5.3 Inyección intravítrea de SGI-1027

Para bloquear a las Dnmt's se inyectó el inhibidor SGI-1027 (Sigma Chemical Co, St Louis, Mo) disuelto en 0.05% de DMSO y se administró 24 h previas a la inyección de NMDA y/o BrdU, según sea el caso, siguiendo el mismo protocolo descrito previamente.

5.4 Enucleación

Los animales fueron sacrificados a las 2 h, 24 h o a los 6 días después de la inyección intravítrea en una cámara de CO₂ e inmediatamente ambos ojos se enuclearon con ayuda de unas tijeras curvas. Los ojos se colocaron en paraformaldehído (PFA) 4% para análisis posteriores (pruebas histológicas e inmunohistoquímicas). Para las pruebas de metilación global se extrajo la retina completa en PBS 1x a 4°C y se congeló para los análisis posteriores.

5.5 Preparación de PFA al 4%

Para preparar 100 ml de solución se adicionaron 4 g de PFA en 70 ml de PBS 1x. Se calentó en agitación hasta 55°C y se agregaron unas gotas de NaOH para facilitar la disolución del PFA hasta aclarar la solución. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró con papel Whatmann No. 1 o 4. Se ajustó el pH a 7.5 y se aforó a 100 ml. Esta solución se cubrió de la luz con papel aluminio y se almacenó a 4°C hasta por una semana.

5.6 Tinción Hematoxilina-eosina (H-E)

Los ojos se fijaron en PFA 4% durante 8 días a 4°C. Transcurrido este tiempo los ojos se transfirieron a casetes para embeber y se colocaron en diferentes alcoholes a 35°C por 30 min en el siguiente orden.

1. alcohol 96°
2. alcohol absoluto
3. alcohol absoluto:xilol (50:50)
4. alcohol absoluto:xilol (30:70)

Inmediatamente después los casetes se pasaron a un recipiente con parafina a 45°C por 30 min y posteriormente los ojos se embebieron en moldes con parafina y se refrigeraron por al menos 20 min.

Con ayuda de un micrótopo se realizaron cortes de 4 µm de grosor, se desparafinaron las muestras por 15 min a 45°C e inmediatamente después se rehidrataron y tiñeron en el siguiente orden:

1. xilol
2. alcohol absoluto:xilol (30:70)
3. alcohol absoluto
4. hematoxilina (1 min)
5. alcohol ácido
6. lavado con agua
7. agua amoniacal (1 min)
8. eosina con agitación vertical (1 min)
9. alcohol 96°
10. alcohol absoluto
11. alcohol: xilol
12. lavado con agua

Finalmente, las laminillas se sumergieron en xilol y se realizó el montaje de las mismas.

La observación de las laminillas y la toma de fotografías se realizaron en un microscopio óptico de campo claro (Leica DM IL LED, Wetzlar, Alemania).

5.7 Muerte celular, ensayo de TUNEL

Se analizó la muerte celular después de la inyección intravítrea mediante el "Kit de detección de muerte celular in situ por fluoresceína" (Roche, cat. 11684795910) siguiendo las instrucciones del fabricante. El análisis se basa en la unión de

deoxiuridina transferasa terminal (TdT) a los extremos del DNA, permitiendo la adhesión del desoxi-uridina-trifosfato (dUTP) al cual se acopla un fluoróforo.

Los ojos se enuclearon a las 2 h, 24 h y 6 días después de la inyección intravítrea y se procesaron de la misma manera que se describió previamente para el análisis por inmunofluorescencia.

Como control positivo se pre-trataron las retinas con 200 U/ml DNAsa I (Sigma Chemical Co.St. Louis, Mo.) durante 10 min a temperatura ambiente. Para el control negativo se pre-trataron las retinas con solución de etiquetado.

5.8 Inmunofluorescencia

Tras la enucleación de los ojos y la fijación de los mismos en PFA al 4% durante toda la noche a 4°C, se colocaron en sacarosa al 20% a 4°C nuevamente durante toda la noche. Al día siguiente se transfirieron a una solución de sacarosa al 30% a 4°C y se quedaron 24 h más para criopreservarlos por deshidratación. Después se colocaron en moldes con compuesto para la temperatura óptima de corte O.C.T. (Tissue-Tek® O.C.T. Compound, Sakura® Finetek). Los bloques se rebanaron sagitalmente en un criostato de 10 – 12 µm y se adhirieron a portaobjetos cargados con adhesivo VWR SuperFrost plus (Biocare Medical, Northern California). Se realizó un lavado con PBS para eliminar el compuesto OCT.

5.9 Inmunofluorescencia para BrdU y 5mC

Después del corte de los ojos se realizaron 3 lavados de 3 min c/u con PBS 1x, se incubaron con PBS y Tritón 1% durante 30 min, continuando con 3 lavados de 3 min c/u con PBS 1x. Se incubaron con HCl 2N a 37°C durante 20 min y 20 min más a temperatura ambiente, se neutralizó con buffer de boratos por 5 min. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS 1x de 3 min c/u.

El bloqueo de las uniones inespecíficas de proteína-anticuerpo se realizó con una solución de PBS 1x, albumina de suero bovino (BSA) 1%, suero normal de cabra 3% y Tritón 0.1% durante 1 h a temperatura ambiente y en una cámara húmeda. Se incubó con el anticuerpo primario anti-BrdU (1:800) hecho en rata (Bio-Rad, Berkeley, California, cat. OBT0030) o 5mC (1:500) hecho en ratón (Diagenode NJ, USA, cat.C15200081) en solución de bloqueo por 1 h a temperatura ambiente y por toda la noche a 4°C. Al día siguiente para retirar el exceso de anticuerpo se realizaron 3 lavados de 5 min c/u con PBS 1x y Tritón 0.1% y se colocó el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Massachusetts, USA) cabra anti-rata (1:500) o Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Massachusetts, USA) cabra anti-ratón (1:500) diluido en PBS 1x y solución de bloqueo (50:50) por al menos 2 h a temperatura ambiente. Para eliminar el exceso de anticuerpo secundario se realizaron 3 lavados de 5 min c/u con PBS-T 0.1%.

Los núcleos se tiñeron con 4', 6-diamino-2-fenidol (DAPI) a una concentración de 5 mg/ml diluido en PBS 1x por aproximadamente 5 min. Finalmente se realizaron 3 lavados con PBS 1x de 1 min c/u y se montó con DABCO. Las laminillas se observaron en un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axiovert 40 CFL (Jena, Alemania) acoplado a una cámara Carl Zeiss AxioCam MRm. Las imágenes se procesaron con el software ImageJ.

5.10 Inmunofluorescencia para CRALBP y LIN28

Después del corte de los ojos se realizaron 3 lavados de 3 min c/u con PBS 1x, se incubaron con PBS y Tritón 1% durante 30 min, continuando con 3 lavados de 3 min c/u con PBS 1x. Se incubaron con una solución de PBS 1x, albumina de suero bovino (BSA) 3%, suero normal de cabra 5% y Tritón 0.1% durante 1 h a temperatura ambiente y en una cámara húmeda.

Se incubó con el anticuerpo primario anti-CRALBP (1:500) hecho en ratón (Cambridge, Reino Unido, cat. ab15051) o anti-LIN28 (1:500) hecho en conejo (Cambridge, Reino Unido, cat. ab46020) en solución de bloqueo por 1 h a

temperatura ambiente y por toda la noche a 4°C. Al día siguiente para retirar el exceso de anticuerpo se realizaron 3 lavados de 5 min c/u con PBS 1x y Tritón 0.1% y se colocó el anticuerpo secundario Alexa Fluor 568 cabra anti-ratón (1:500) o Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Massachusetts, USA) cabra anti-conejo (1:500) diluido en PBS 1x y solución de bloqueo (50:50) por al menos 2 h a temperatura ambiente. Para eliminar el exceso de anticuerpo secundario se realizaron 3 lavados de 5 min c/u con PBS-T 0.1%.

La tinción de núcleos, el montaje y la observación se realizó de la forma antes descrita.

5.11 Extracción de DNA con solventes orgánicos

Se realizó la extracción de 5 retinas completas en PBS 1x en frío y se colocaron en buffer de lisis FTB y Proteinasa K (EpiTect, LyseAll Lysis Kit, Quiagen, Alemania) durante toda la noche a 56°C. Al día siguiente se les añadió 500 µl de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (25:24:1) y se agitaron vigorosamente en un vortex por aproximadamente 30 segundos para posteriormente centrifugarlos a 14 000 x g durante 15 min a 4°C.

Una vez centrifugado se colectó solo la fase acuosa superior en un nuevo tubo de 1.5 ml y se le añadió el mismo volumen de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se dejó incubar 5 min a 4°C, 20 min a -20°C y 1 h a -78°C seguido de otra centrifugación a 14 000 x g durante 15 min a 4°C.

Se retiró el sobrenadante por inversión y se le adicionó 1 ml de etanol al 75% frío mezclando por inversión e incubando a -78°C por 2 min y se centrifugó nuevamente a 14 000 x g durante 15 min a 4°C (se realizó dos veces consecutivas). Se retiró el sobrenadante por inversión y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente por aproximadamente 15 min o hasta que no quede rastro del solvente.

Se resuspendió el pellet en agua inyectable estéril (50 a 100 μ l) y se calentó a 60°C durante 10 min e inmediatamente se colocó a 4°C por 5 min. Finalmente, se centrifugó a 14 000 x g durante 1 min a 4°C y se dejó a temperatura ambiente 5 min para proseguir con la cuantificación de la concentración de DNA en un espectrofotómetro. Posteriormente llevó a cabo la electroforesis en un gel de agarosa al 1% para revisar la integridad del material genético.

5.12 Metilación global

Una vez realizada la extracción, cuantificación y revisada la integridad del DNA se prosiguió con la prueba de metilación global con el kit “Global DNA Methylation LINE-1 kit” (ACTIVE MOTIF, cat. 55017) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este trata de un ensayo colorimétrico que detecta fragmentos metilados mediante la unión del anticuerpo primario contra 5-metilcitosina (5mC) en el DNA y puede ser utilizado para comparar los cambios relativos en los niveles de diferentes muestras.

6. Resultados

6.1 Controles para la caracterización del modelo de daño con NMDA

6.1.1 Estructura y morfología de la retina

En primera instancia se realizó un control intacto para observar la estructura y morfología característica de la retina en los ratones P14-15. Se realizaron tinciones de Hematoxilina-Eosina (H-E) donde se observan en tinción diferencial las 3 capas de núcleos celulares ONL, INL y GCL (Fig. 5 a).

Al evaluar el efecto de la administración intravítrea de los vehículos correspondientes a cada fármaco (solución salina 0.9%, DMSO 0.05% y la combinación de estos; solución salina + DMSO) no se observó daño, ni alteraciones morfológicas y/o estructurales en las capas de la retina (Fig. 5 b).

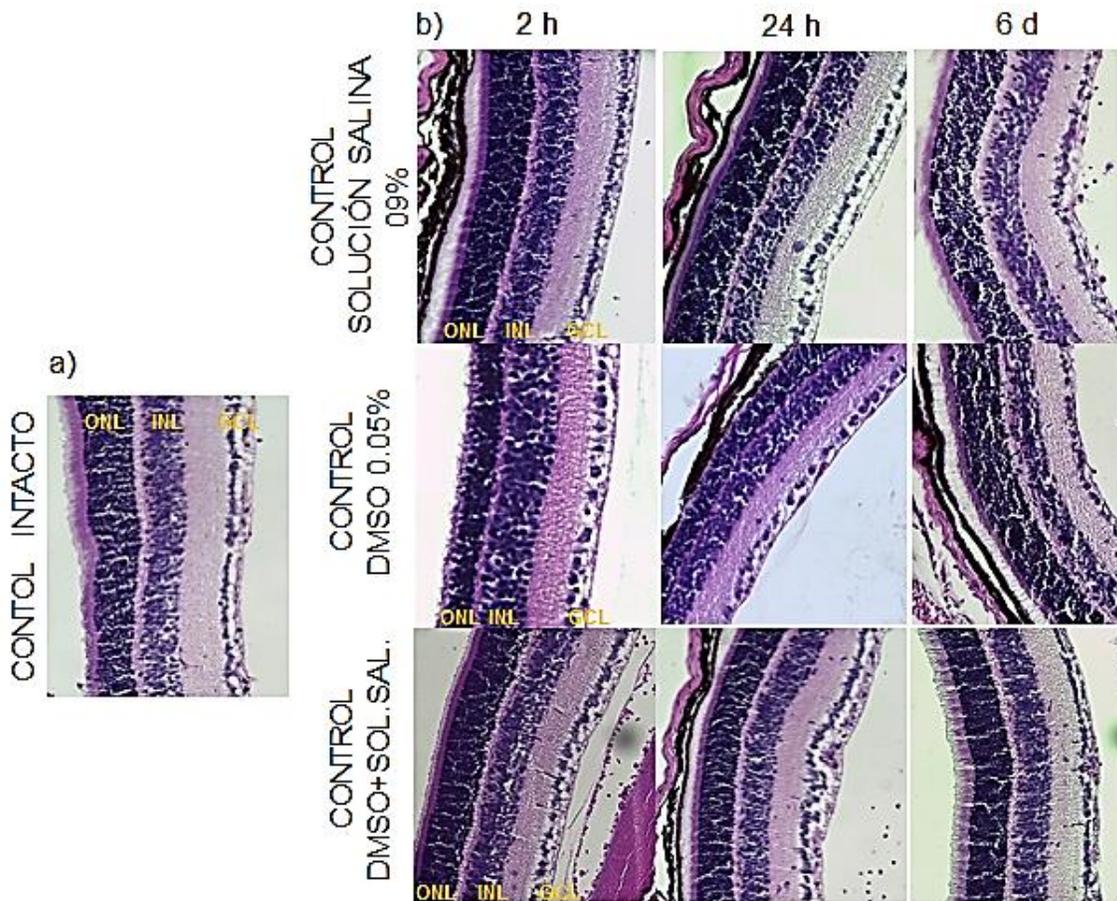


Figura 5. Inocuidad de la administración intravítrea de los vehículos observada por H-E. Comparativa entre control intacto y controles con vehículo en los 3 tiempos evaluados 2 h, 24 h y 6 días post-inyección. Fotomicrografías de cortes sagitales de 5 μ m de retinas de ratones con tinción mediante la técnica H-E. Se pueden observar las capas nucleares ONL (Capa Nuclear Externa), INL (Capa Nuclear Interna) y GCL (Capa Ganglionar), además de las capas plexiformes en coloración rosa. La barra de calibración corresponde a 50 μ m. Aumento 20x.

6.1.2 Evaluación de muerte celular por ensayo de TUNEL

La muerte celular por apoptosis se evaluó mediante un ensayo de inmunofluorescencia con un kit de TUNEL. Fue importante corroborar que la inyección intravítrea de NMDA causara muerte celular y descartar que fuera debido a la manipulación experimental, mecánica y/o la inyección de los vehículos correspondientes a cada fármaco.

La estructura laminar de las capas nucleares de la retina se identificó mediante la tinción con DAPI (Fig. 6, marca azul). Tanto el control intacto como los controles

de vehículo de cada fármaco (solución salina 0.9%, DMSO 0.05% y la combinación de estos; solución salina + DMSO) mantuvieron la estructura laminar intacta. No se observa marca positiva a TUNEL en las capas nucleares ONL, INL y GCL de la retina ni en ninguno de los grupos de controles analizados aunque si se observa autofluorescencia (rojo) de la capa de fotorreceptores. Este efecto es común en tinciones retinianas y se considera inespecífico.

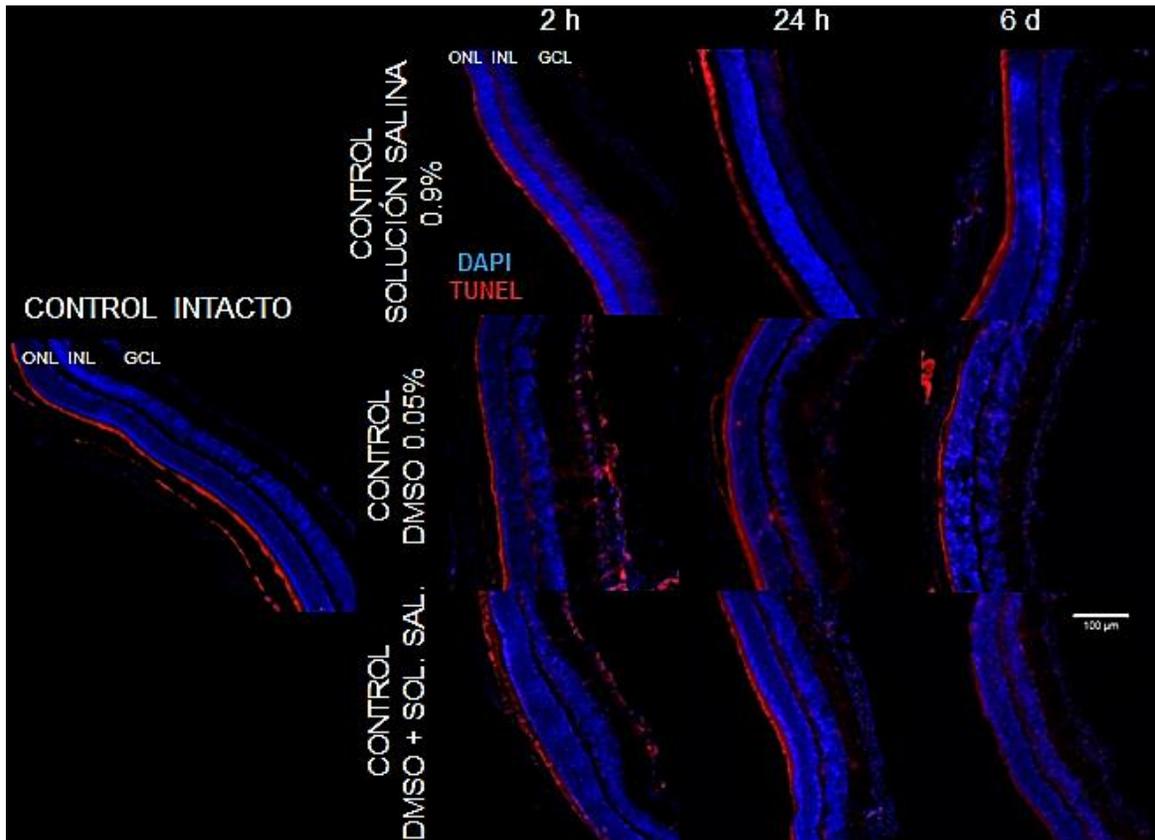


Figura 6. Inocuidad de la administración intravítrea de los vehículos observada por TUNEL. Comparativa entre control intacto y controles con vehículos. Fotomicrografías de cortes sagitales de retina 12 μm. Inmunoquímica con la técnica de TUNEL. Se pueden observar las capas nucleares ONL (Capa Nuclear Externa), INL (Capa Nuclear Interna) y GCL (Capa Ganglionar) con DAPI (azul). La barra de calibración corresponde a 100 μm. Aumento 10x.

6.1.3 Caracterización de la proliferación celular por incorporación de BrdU

Se optimizó la técnica para la evaluación de la proliferación celular en la retina mediante el análisis de la incorporación de BrdU. Como control positivo de estos experimentos se utilizaron ratones P0 en los cuales se ha demostrado que el proceso de proliferación se encuentra activo. En la figura 7 se observa marca positiva a BrdU (amarillo) y los núcleos celulares con DAPI (azul).

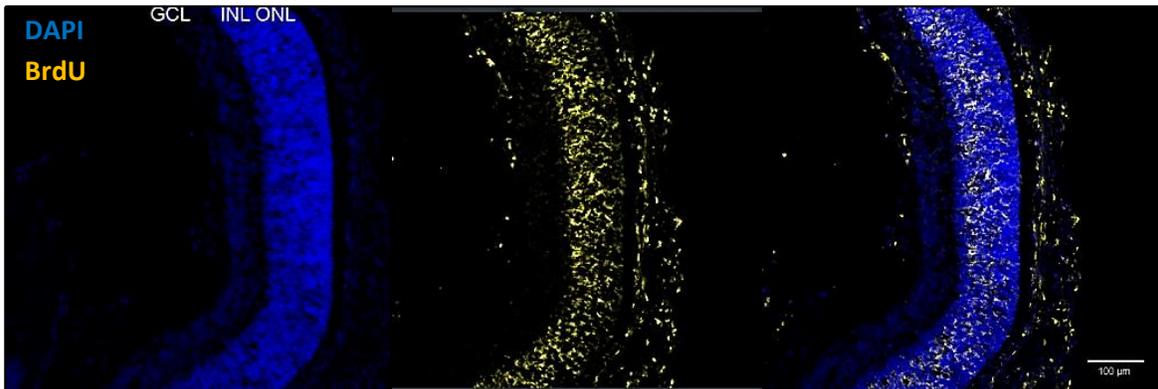


Figura 7. Fotomicrografías de control positivo a BrdU en retinas de ratones P0. Cortes sagitales de retina 12 µm. Inmunohistoquímica en donde se pueden observar en azul los núcleos celulares de ONL (Capa Nuclear Externa), INL (Capa Nuclear Interna) y GCL (Capa Ganglionar) con DAPI y la marca positiva a BrdU en amarillo. La barra de calibración corresponde a 100 µm. Aumento 10x.

6.1.4 Caracterización por inmunohistoquímica de la expresión de CRALBP (marcador de GM)

Para analizar la expresión basal de genes específicos de GM en retinas controles intactas, se utilizó el marcador CRALBP específico de este tipo celular y DAPI que marca los núcleos celulares y permite observar la estructura característica de las capas nucleares ONL, INL y GCL de la retina.

Se utilizaron ratones de P14-15, ya que a esta edad la retina ha finalizado su desarrollo y la GM ya se encuentra localizada a travesando todas las capas de la retina. Los resultados observados coinciden con lo previamente descrito en la

literatura ; observamos marca positiva al anticuerpo anti-CRALBP en la localización característica de la GM (Fig.8).

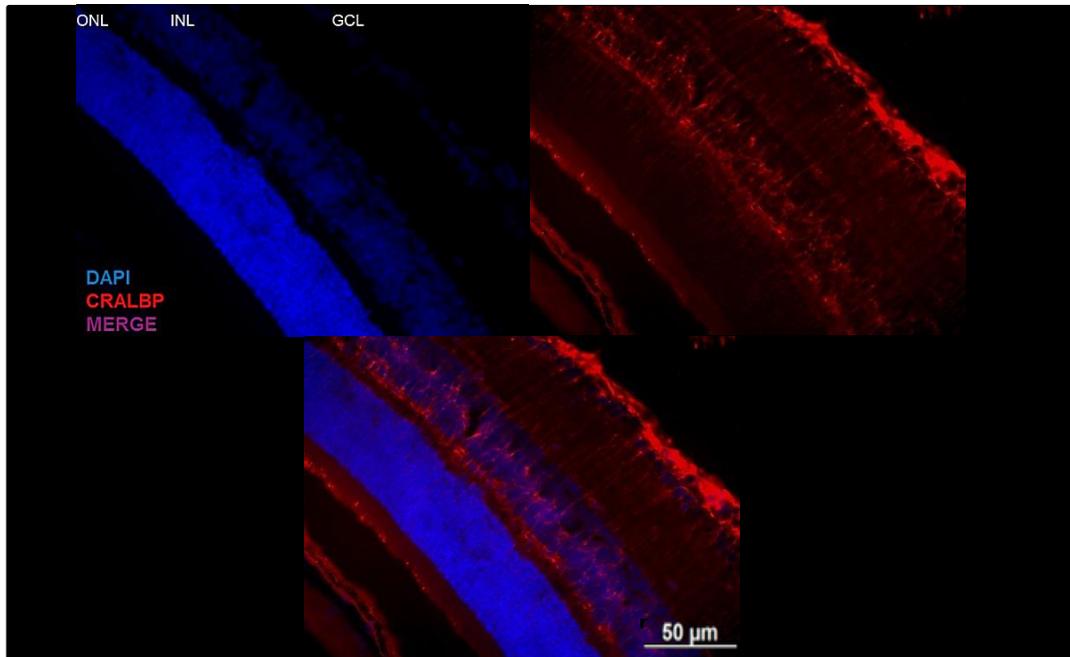


Figura 8. Fotomicrografías de la expresión del gen específico de GM (CRALBP) en retinas intactas de ratones P14-15. Cortes sagitales de retina 12 μm . Inmunofluorescencia en donde se pueden observar en azul los núcleos celulares de las ONL (Capa Nuclear Externa), INL (Capa Nuclear Interna) y GCL (Capa Ganglionar) con DAPI y la marca positiva a CRALBP en rojo. La barra de calibración corresponde a 50 μm . Aumento 40x.

6.1.5 Caracterización de la expresión de un gen asociado a pluripotencia (*Lin28*)

Para evaluar la expresión de pluripotencia, en primer lugar, se realizó un control positivo de detección de la expresión del gen *Lin28*. Se utilizaron ratones P2, en donde se ha demostrado que a esta edad la retina se encuentra todavía en desarrollo. En la figura 9 se observa la expresión de LIN28 distribuido a lo largo de toda la retina con un patrón característico similar al que se observa en GM. Adicionalmente, se muestra también el control negativo, donde se observan únicamente los núcleos celulares con DAPI.

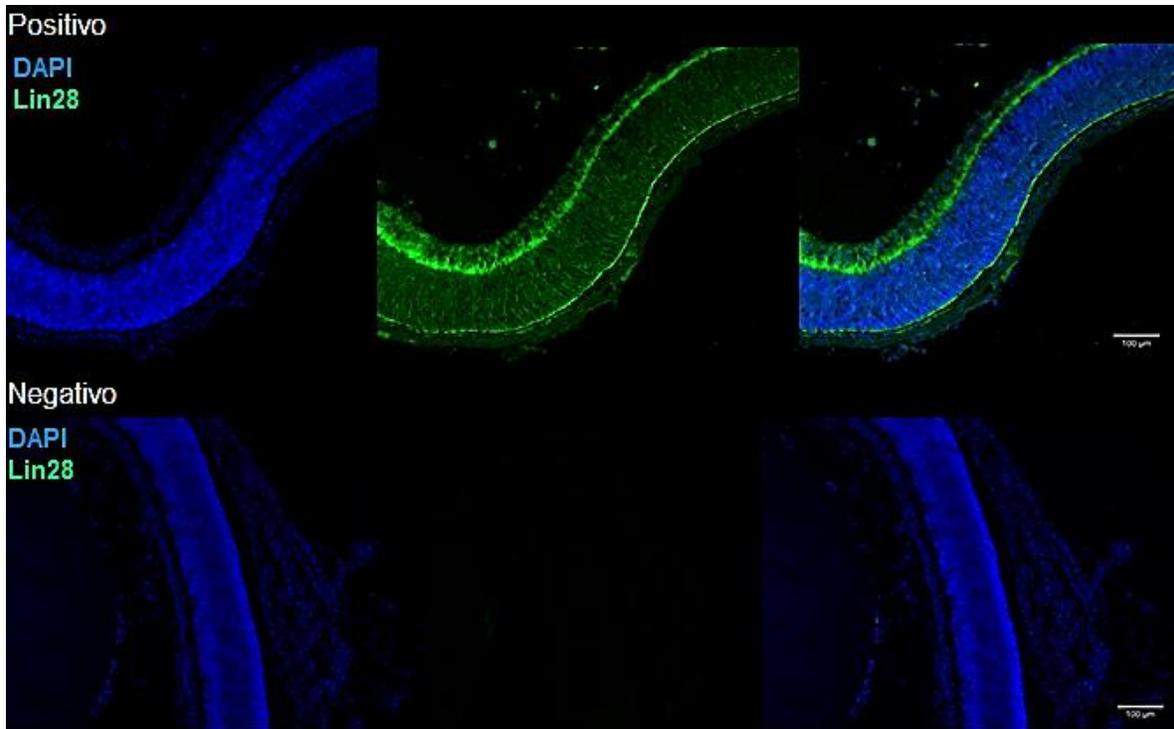


Figura 9. Expresión por inmunofluorescencia de LIN28, controles positivo y negativo en ratones P2. Cortes sagitales de retina 12 μm . Fotomicrografías en donde se pueden observar en azul los núcleos celulares con DAPI y marca positiva a LIN28 en verde. La barra de calibración corresponde a 100 μm . Aumento 10x.

6.2 Caracterización en el modelo de daño con NMDA en ratones P14-15

6.2.1 La inyección intravítrea de NMDA induce cambios en la estructura y morfología de la retina

Se analizó, mediante tinciones H-E, la estructura y morfología de la retina después de la administración intravítrea de NMDA a las 2 h, 24 h y 6 días. En la figura 10 se muestran imágenes representativas de cada tiempo evaluado. Los controles corresponden a retinas con administración intravítrea de solución salina al 0.9%.

Se observa daño estructural y morfológico desde las 2 h después de la inyección en comparación con el grupo tratado únicamente con el vehículo, siendo en la IPL donde el daño es más evidente.

A las 24 h se puede observar disminución en la celularidad quedando pequeños espacios entre las células (flechas amarillas) en las capas GCL, IPL e INL. Esta

disminución que se torna más evidente a los 6 días post-inyección. Además, la retina se vuelve extremadamente frágil por el extenso daño. Por esta razón, a partir de este experimento nos enfocamos en los tiempos 2 h y 24 h en donde se puede analizar de mejor manera los procesos de desdiferenciación y proliferación.

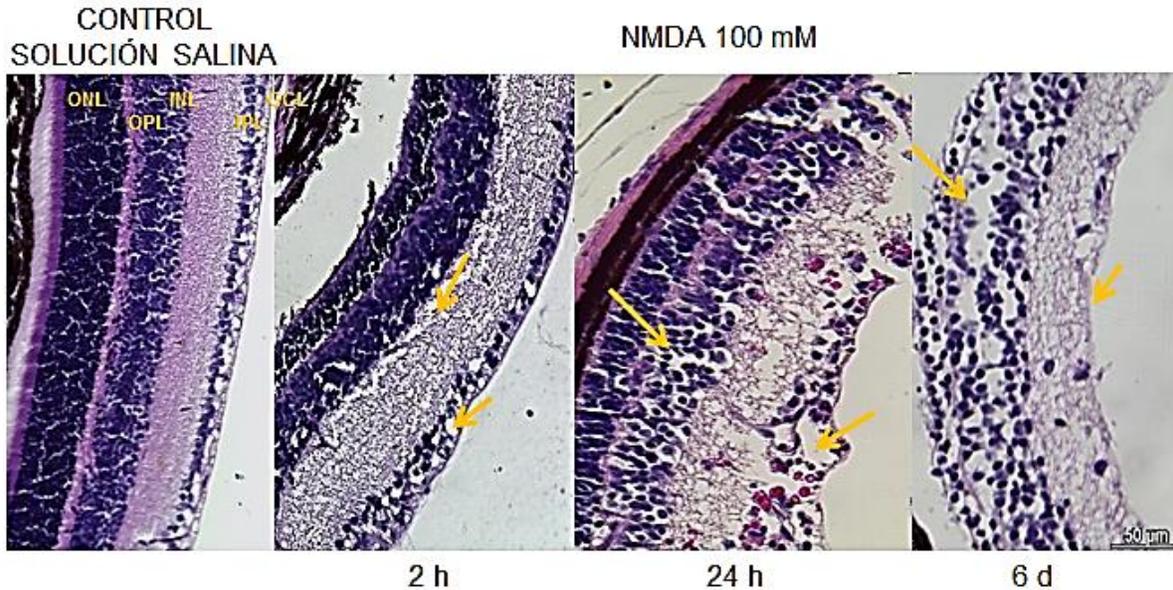


Figura 10. Daño causado por la administración intravítrea de NMDA. Fotomicrografías de daño con NMDA 100 mM en cortes sagitales de retina de 5 µm con tinción H-E. Control con vehículo (solución salina 0.9% 24 h). Se pueden observar las capas nucleares ONL (Capa Nuclear Externa), INL (Capa Nuclear Interna) y GCL (Capa Ganglionar), además de las capas plexiformes en coloración rosa. La barra de calibración corresponde a 50 µm. Aumento 20x.

6.2.2 La inyección intravítrea con NMDA induce muerte celular en la retina P14-P15

Se analizó la muerte celular después de la inyección intravítrea con NMDA mediante un ensayo de inmunofluorescencia con el kit de TUNEL.

En la figura 11 se observan teñidos únicamente con DAPI (azul) los núcleos de las células que no se encontraban en un proceso de apoptosis, distribuidos en la disposición espacial característica de las 3 capas nucleares ONL, INL y GCL de la retina. En los grupos con inyección intravítrea de NMDA 100 mM se observan en marca positiva a TUNEL (rojo y violeta) las células que se encuentran atravesando

por un proceso de muerte celular. Las células apoptóticas se localizan principalmente en las capas GCL e INL a las 2 h y se extiende a las 24 h en las capas IPL y OPL.

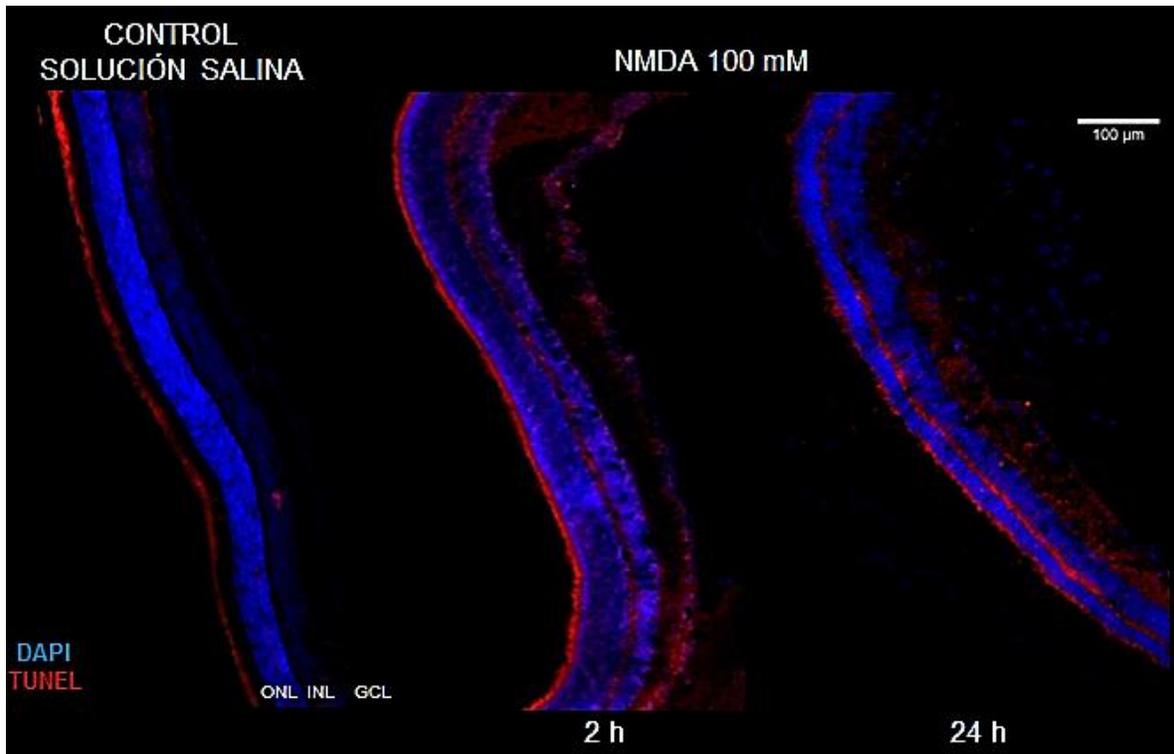


Figura 11. Análisis de muerte celular después del daño con NMDA 100 mM mediante técnica de TUNEL. Fotomicrografías de cortes sagitales de retina 12 μm. Inmunofluorescencia en donde se pueden observar en azul los núcleos celulares de las ONL (Capa Nuclear Externa), INL (Capa Nuclear Interna) y GCL (Capa Ganglionar) con DAPI y marca positiva a TUNEL en coloración roja y violeta. Aumento 10x.

6.2.4 La inyección de NMDA 100 mM induce la proliferación celular (incorporación de BrdU) en la INL

La administración intravítrea de NMDA 100 mM aumenta la proliferación celular (Fig. 12). En el control del vehículo con solución salina 0.9% se observan únicamente las capas nucleares positivas a DAPI en azul. Por el contrario, después de 24 h del daño, algunas células principalmente de la INL y GCL se encuentran en proliferación. En este ensayo se consideraron positivas a BrdU

únicamente aquellas que co-localizan con DAPI y que se observan en color blanco (flechas).

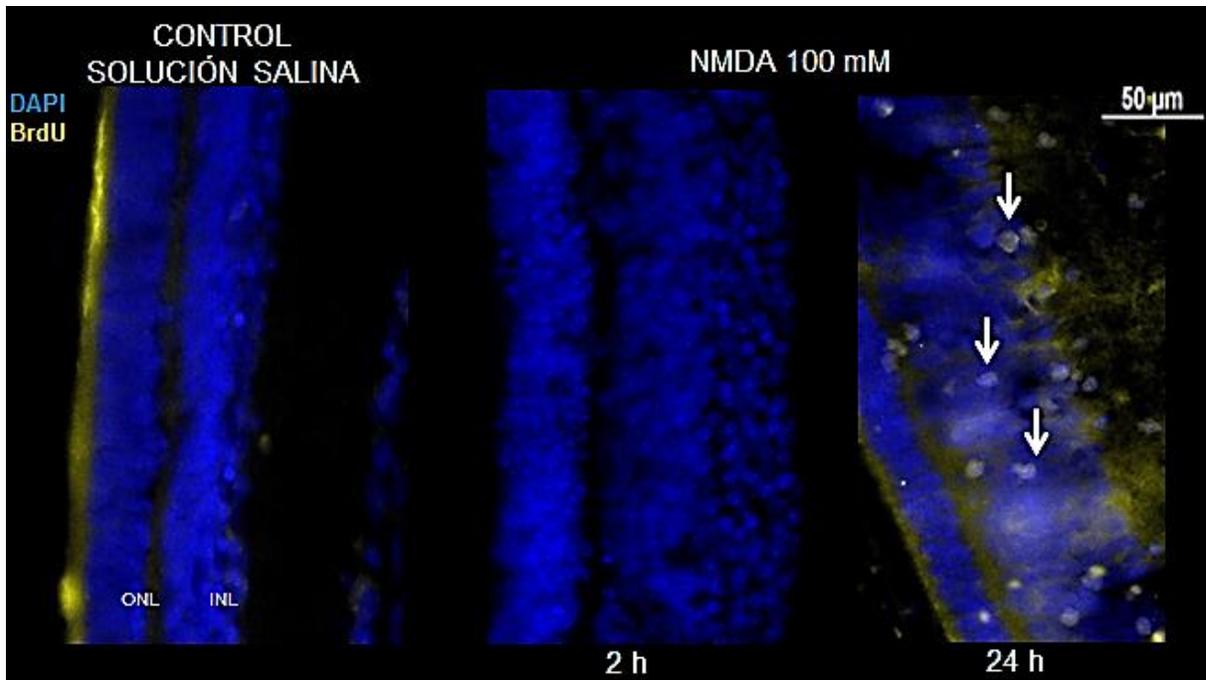


Figura 12. Evaluación de la proliferación celular mediante el marcaje con BrdU después de la administración de NMDA 100 mM. Fotomicrografías de cortes sagitales de retina 12 μm. Se observan las capas nucleares ONL (Capa Nuclear Externa), INL (Capa Nuclear Interna) y GCL (Capa Ganglionar) con DAPI y la colocalización con BrdU en color blanco de los núcleos celulares proliferando (flechas). Aumento 40x.

6.2.3 La inyección intravítrea de NMDA 100 mM induce la expresión de *Lin28* en la GM

Con el fin de evaluar la respuesta al daño de la GM, se analizó la expresión por inmunofluorescencia de LIN28 y de CRALBP en retinas controles de vehículo con solución salina 0.9% y de daño con NMDA 100 mM a 2 h y 24 h post-inyección. (Fig. 13).

La coexpresión de CRALBP y LIN28 se observa hasta las 24 h post-inyección en algunas células de la INL (flecha). La administración del vehículo (solución salina 0.9%) no cambia el patrón de expresión característico de CRALBP en la GM (rojo).

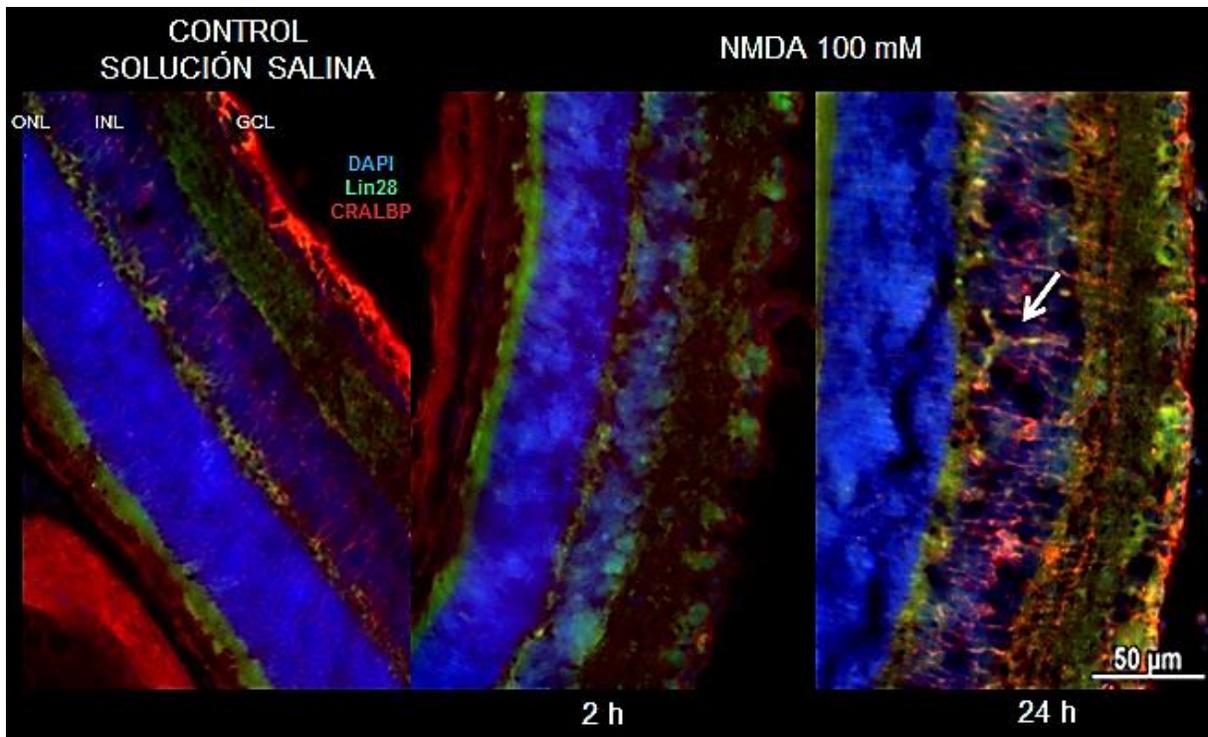


Figura 13. Inmunofluorescencia a CRALBP y LIN28 en las células de la retina de ratón P14-P15 a las 2 h y 24 h post-inyección intravítrea de NMDA 100 mM. Cortes sagitales de retina de 12 μ M. Comparativa contra control vehículo (solución salina 0.9% 24 h). Se pueden observar las capas nucleares ONL (Capa Nuclear Externa), INL (Capa Nuclear Interna) y GCL (Capa Ganglionar) con DAPI, GM en rojo y la expresión de LIN28 en verde, observando colocalización de estos dos últimos en amarillo (flecha). La barra de calibración corresponde a 50 μ m. Aumento 40x.

6.3 Efecto de la inhibición de la metilación por la administración de SGI-1027 10 μ M sobre los procesos celulares y moleculares inducidos tras el daño retiniano con NMDA

6.3.1 Control experimental 1: Evaluación de la inhibición de la metilación del DNA por administración intravítrea de SGI-1027

Se utilizaron dos aproximaciones con el fin de comprobar la capacidad inhibitoria de la metilación del DNA con SGI-1027 10 μ M. En primer lugar, se analizó el patrón de metilación global mediante inmunofluorescencia contra 5mC (verde). Se observa la disminución de la inmunorreactividad desde las 2 h post- inyección con respecto al control que se mantiene hasta las 24 h post-inyección (Fig. 14).

Adicionalmente, se realizó una cuantificación manual doble ciego del porcentaje de inhibición de 5mC que permitió la determinación del porcentaje de inhibición de 5mC con respecto a los grupos control vehículo DMSO 0.05% (Fig. 15). La inhibición de la inmunofluorescencia a las 2 h y 24 h representa aproximadamente el 15% y 25%, respectivamente. Se consideró como 100% el control vehículo.

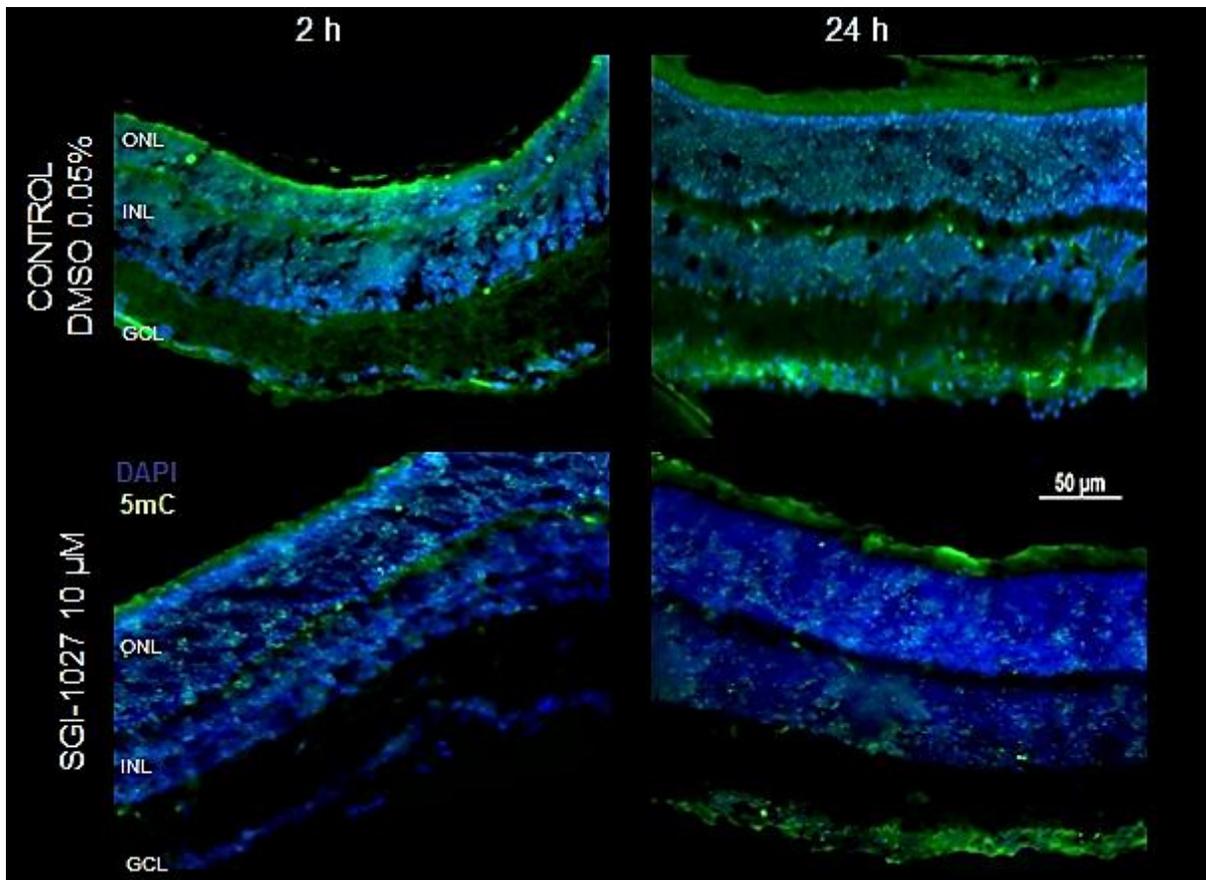


Figura 14. Bloqueo farmacológico de la metilación tras la inyección del inhibidor SGI-1027 10 μM en la retina de ratón P14-15 a las 2 y 24 h post-inyección. Fotomicrografías de cortes sagitales de retina de 12 μM. Marcaje por inmunofluorescencia contra 5mC y comparativa contra control vehículo (DMSO 0.05%). Se pueden observar las capas nucleares ONL (Capa Nuclear Externa), INL (Capa Nuclear Interna) y GCL (Capa Ganglionar) con DAPI y la marca positiva a 5mC en colocalización verde-azulado. La barra de calibración corresponde a 50 μm. Aumento 40x.

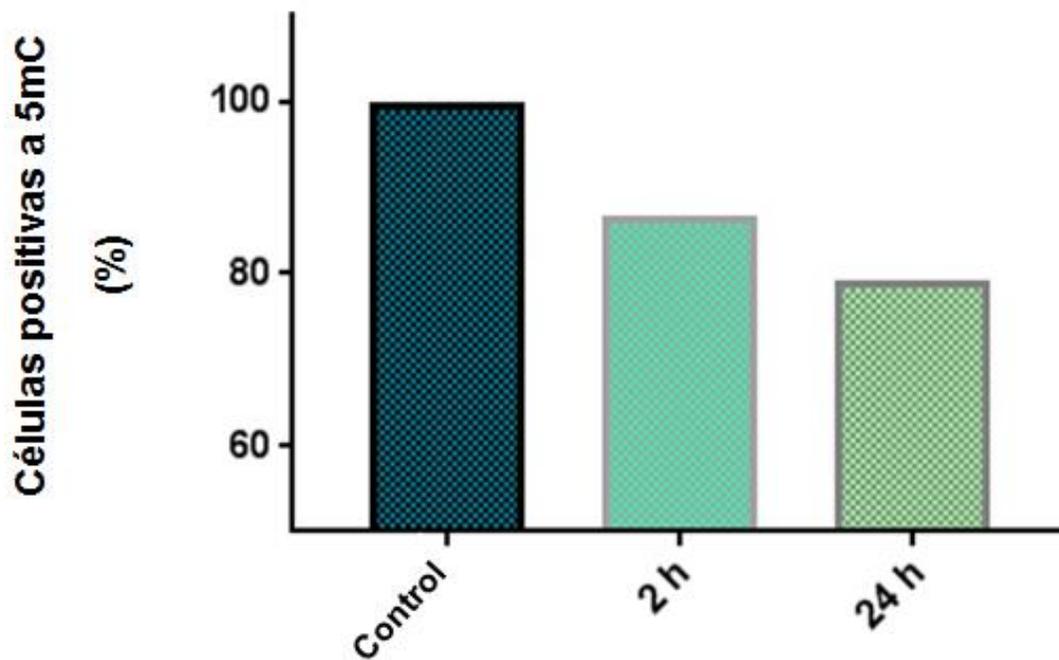


Figura 15. Porcentaje de células positivas a 5mC después de la inyección del inhibidor SGI-1027 10 μ M en la retina de ratón P14-15. Cuantificación manual doble ciego de la expresión por inmunofluorescencia a 5mC. Se asume que el control con vehículo representa el 100%. En las barras de 2 h y 24 h se observa el porcentaje en que disminuyó, en cada tiempo, la expresión de 5mC con respecto al total de núcleos marcados con DAPI.

Los datos anteriores se corroboraron mediante la realización de una prueba colorimétrica a través del kit “Global DNA Methylation LINE-1 kit” que permitió evaluar cambios en la metilación global antes y después de administrar el inhibidor de la metilación SGI-1027.

Estos resultados determinaron que la expresión de 5mC disminuye aproximadamente 9% a las 2 h post-inyección y 25% a las 24 h post-inyección (Fig. 16).

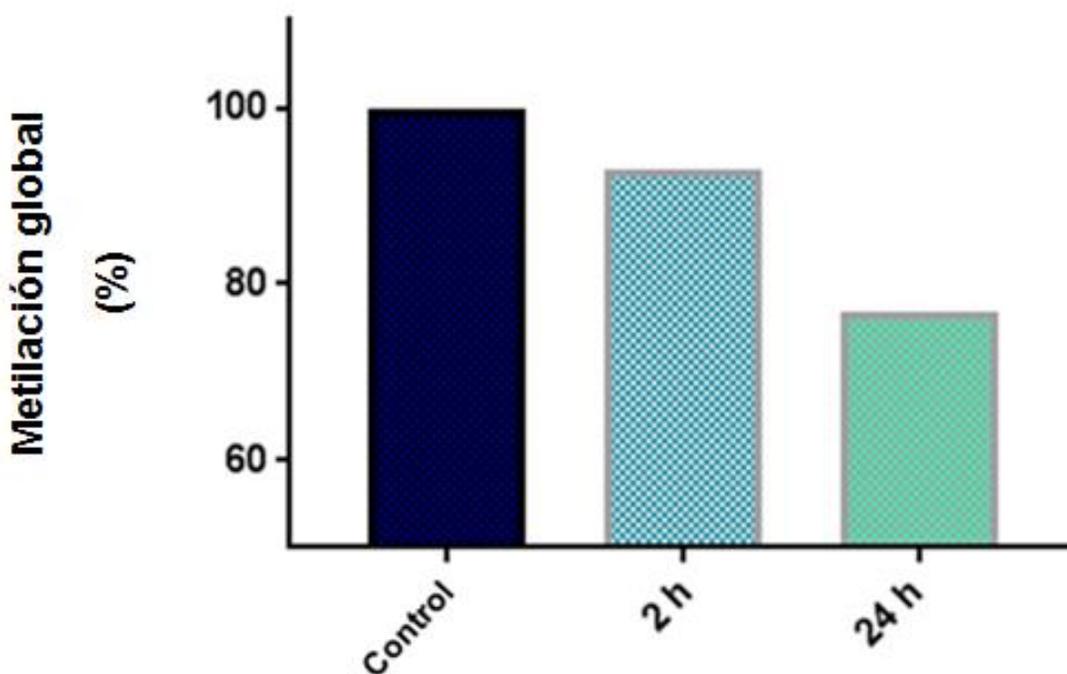


Figura 16. Evaluación del efecto de la inhibición de la metilación global debida a la administración intravítrea de SGI-1027 10 μ M en ratones P14-P15 expresada en porcentaje (%). Análisis colorimétrico de metilación mediante el kit “Global DNA Methylation LINE-1 kit”. Se asume que el control vehículo representa el 100% y en las barras de 2 h y 24 h se observa el porcentaje en que disminuyo la expresión de 5mC, en cada tiempo, con respecto al control.

6.3.2 Control experimental 2: La administración intravítrea de SGI-1027 induce muerte celular por apoptosis

En el ensayo de TUNEL a las 2 h post-inyección del inhibidor de la metilación SGI-1027 se observó, principalmente, marca positiva en las IPL y ONL. Luego de 24 h se observa muerte celular por apoptosis principalmente en la ONL, IPL y GCL. En el control del vehículo con DMSO 0.05% se observan únicamente las capas nucleares positivas a DAPI (Fig.17).

Como ya se puntualizó anteriormente, se observa una consistente autofluorescencia (rojo) de la capa de fotorreceptores sin considerarse positiva.

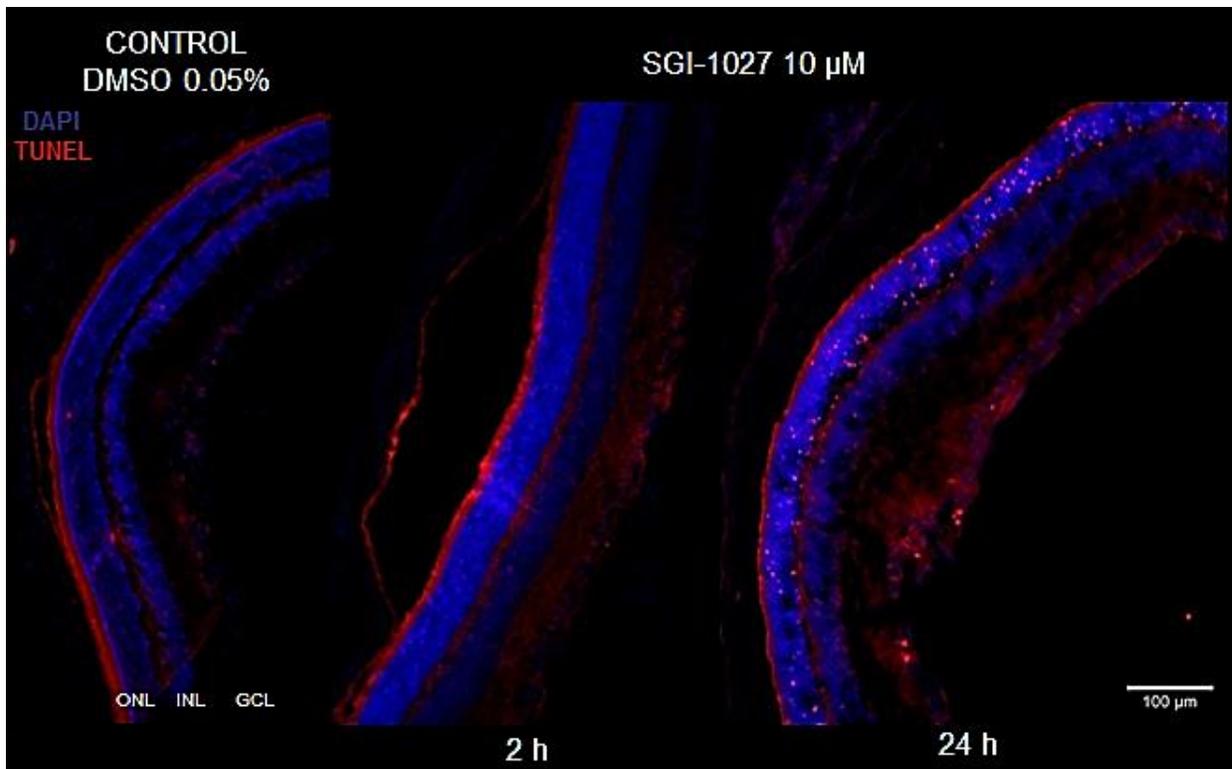


Figura 17. Análisis de la muerte celular después de la administración intravítrea de SGI-1027 10 μM en la retina de ratón P14-15 mediante técnica de TUNEL. Fotomicrografías de cortes sagitales de retina de 12 μm . Comparativa contra control vehículo (DMSO 0.05%, 24 h post-inyección). Se observan las capas nucleares ONL (Capa Nuclear Externa), INL (Capa Nuclear Interna) y GCL (Capa Ganglionar) con DAPI y marca positiva a TUNEL en rojo. La barra de calibración corresponde a 100 μm . Aumento 10x.

6.3.3 La administración intravítrea de SGI-1027 induce la proliferación celular (incorporación de BrdU)

Se evaluaron el patrón de incorporación de BrdU y la expresión por inmunofluorescencia de CRALBP en retinas controles de vehículo con DMSO 0.05% y en daño con NMDA 100 mM a 2 h y 24 h post-inyección. En ambos tiempos se observa incorporación de BrdU, principalmente, en las INL y ONL (flechas), así como pérdida de la localización característica de la GM (Fig. 18).

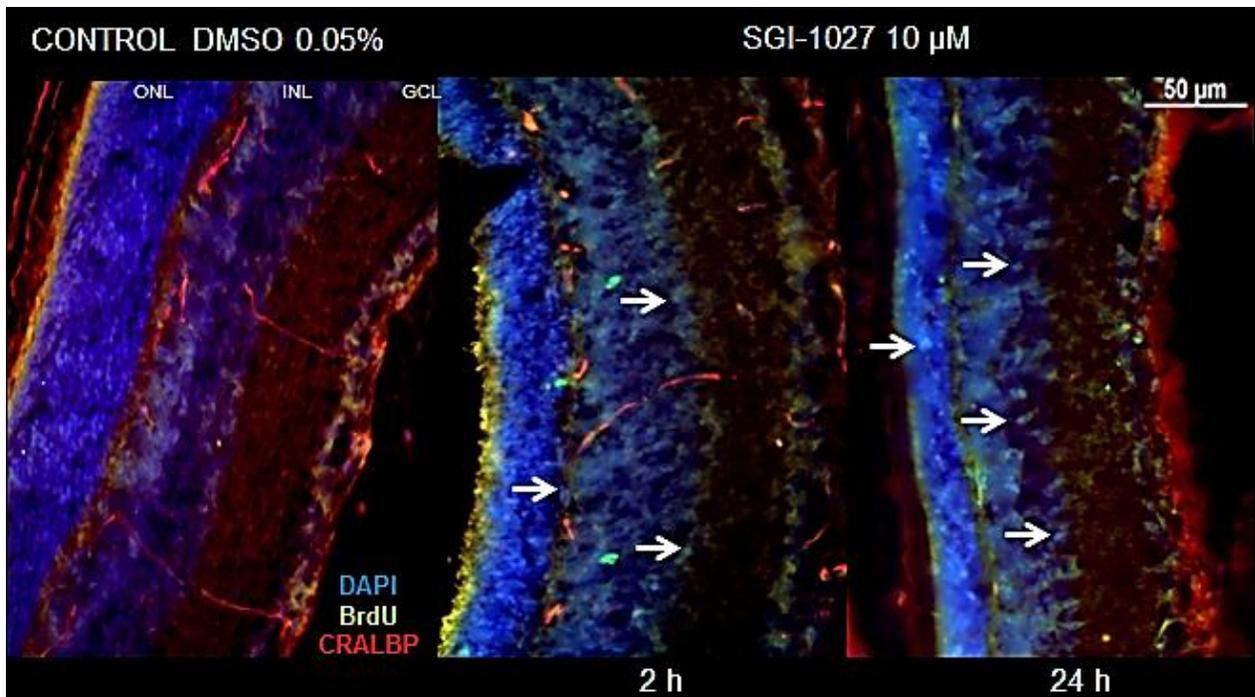


Figura 18. Expresión por inmunofluorescencia de BrdU y CRALBP después de 2 h y 24 h de la administración intravítrea de SGI-1027 10 μM en la retina de ratón P14-15. Fotomicrografías de cortes sagitales de retina de 12 μM . Comparativa contra control vehículo (DMSO 0.05%, 24 h). Se observan las capas nucleares ONL (Capa Nuclear Externa), INL (Capa Nuclear Interna) y GCL (Capa Ganglionar) con DAPI, la GM marcada con CRALPB (rojo) y en colocalización con BrdU los núcleos en proliferación (flechas). La barra de calibración corresponde a 50 μm . Aumento 40x.

6.4 La inhibición de la metilación producida por la administración de SGI-1027 exacerba el daño retiniano inducido por NMDA

Para evaluar el efecto del inhibidor de la metilación en la respuesta al daño se inyectó 24 h previas a la administración del NMDA el inhibidor de la metilación SGI-1027 y posteriormente se evaluaron las siguientes respuestas:

6.4.1 Cambios estructurales y morfológicos

La tinción H-E revela que la inyección de la combinación de SGI-1027 10 μM + NMDA 100 mM induce cambios estructurales desde las 2 h post-inyección. Se observa pérdida en la celularidad de la retina, cambio que incrementa a las 24 h post-inyección hasta el punto de perderse casi por completo la estructura característica de las capas que conforman la retina (flecha amarilla).

Adicionalmente, es importante resaltar la aparición de núcleos extra-retinianos (flechas rojas) en ambos tiempos analizados.

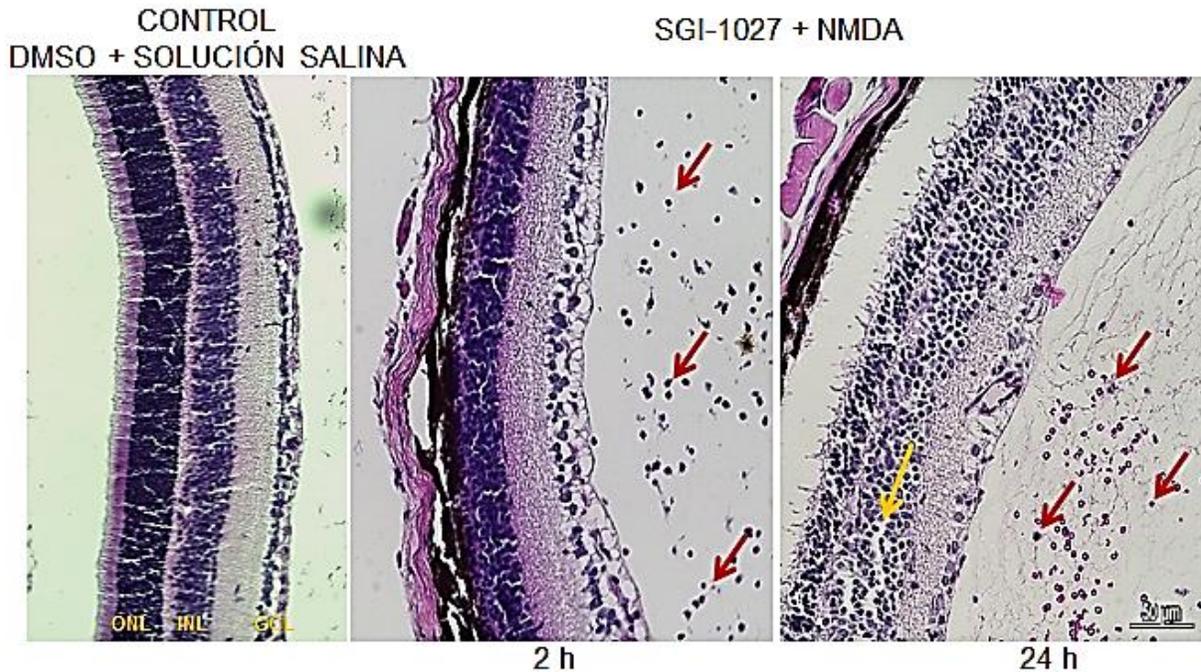
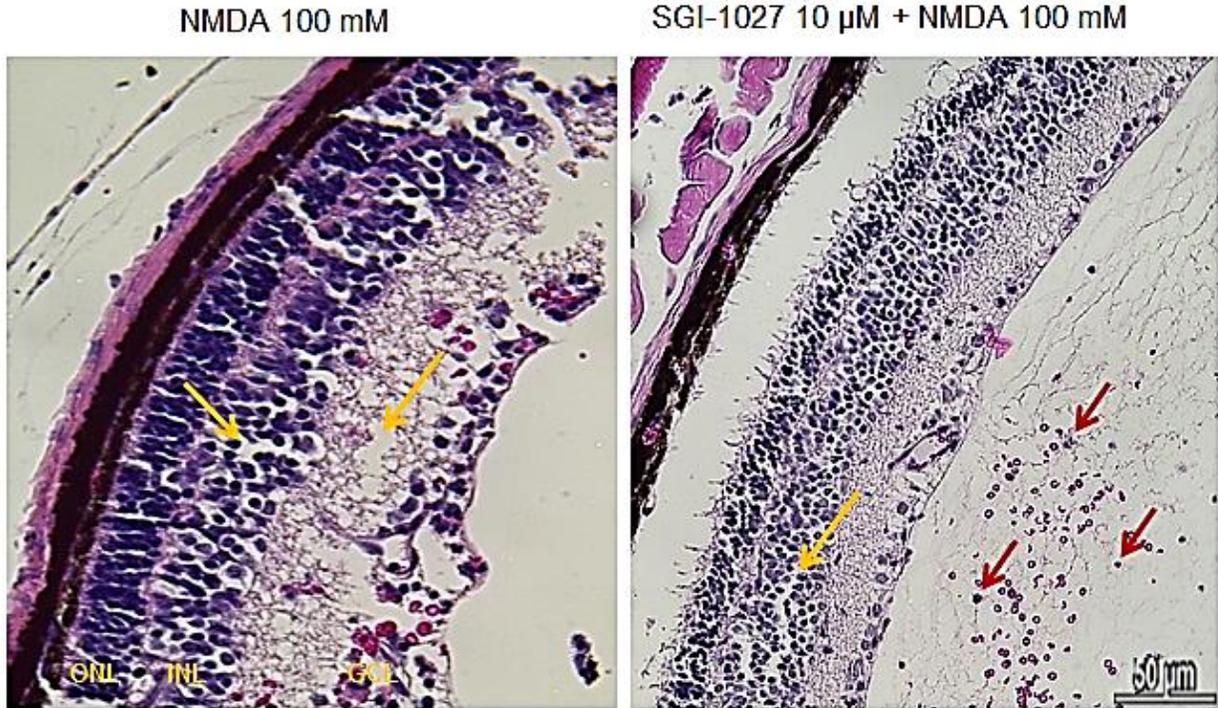


Figura 19. Estructura de la retina después del daño con NMDA y previa administración de SGI-1027 en ratones P14-15. Cortes sagitales de retina de 5 μm con tinción H-E. Comparación contra control vehículo (solución salina 0.9% + DMSO 0.05% 24 h post-inyección). Se observan las capas nucleares ONL (Capa Nuclear Externa), INL (Capa Nuclear Interna) y GCL (Capa Ganglionar), además de las capas plexiformes en coloración rosa. La flecha amarilla corresponde a la pérdida en estructura y celularidad en la retina. Las flechas rojas señalan la aparición de células extra-retinianas. La barra de calibración corresponde a 50 μm . Aumento 20x.

En la figura 20, a modo comparativo, se muestran imágenes representativas de retinas tratadas exclusivamente con NMDA contra la combinación de SGI-1027 + NMDA a las 24 h post-inyección. Se observa que al inhibir la metilación se exagera el daño retiniano, disminuyendo la celularidad en todas las capas nucleares, además de la aparición de núcleos celulares extra-retinianos.



24 h

Figura 20. Comparación de NMDA contra la combinación de SGI-1027 + NMDA a las 24 h post-inyección en retinas de ratones P14-15. Cortes sagitales de retina de 5 μ m con tinción H-E. Se pueden observar las capas nucleares ONL (Capa Nuclear Externa), INL (Capa Nuclear Interna) y GCL (Capa Ganglionar), además de las capas plexiformes en coloración rosa. Las flechas amarillas corresponden a la pérdida en estructura y celularidad de la retina. Las flechas rojas señalan la aparición de células extra-retinianas. La barra de calibración corresponde a 50 μ m. Aumento 20x.

6.4.2 Inducción de muerte celular

Para analizar si la pérdida en la estructura característica de la retina era debida a procesos de muerte celular por apoptosis. Se realizó un ensayo por TUNEL en ratones P14-15 después de la inyección de SGI-1027 y 24 h previas a la inyección de NMDA (Fig.21).

Los resultados mostraron marca positiva a apoptosis. Esta marca se observa que colocaliza en coloración violeta en todas las capas nucleares (ONL, INL y GCL) a lo largo de toda la retina, en ambos tiempos evaluados. Adicionalmente se observa nuevamente la aparición de núcleos extra-retinianos (flechas blancas).

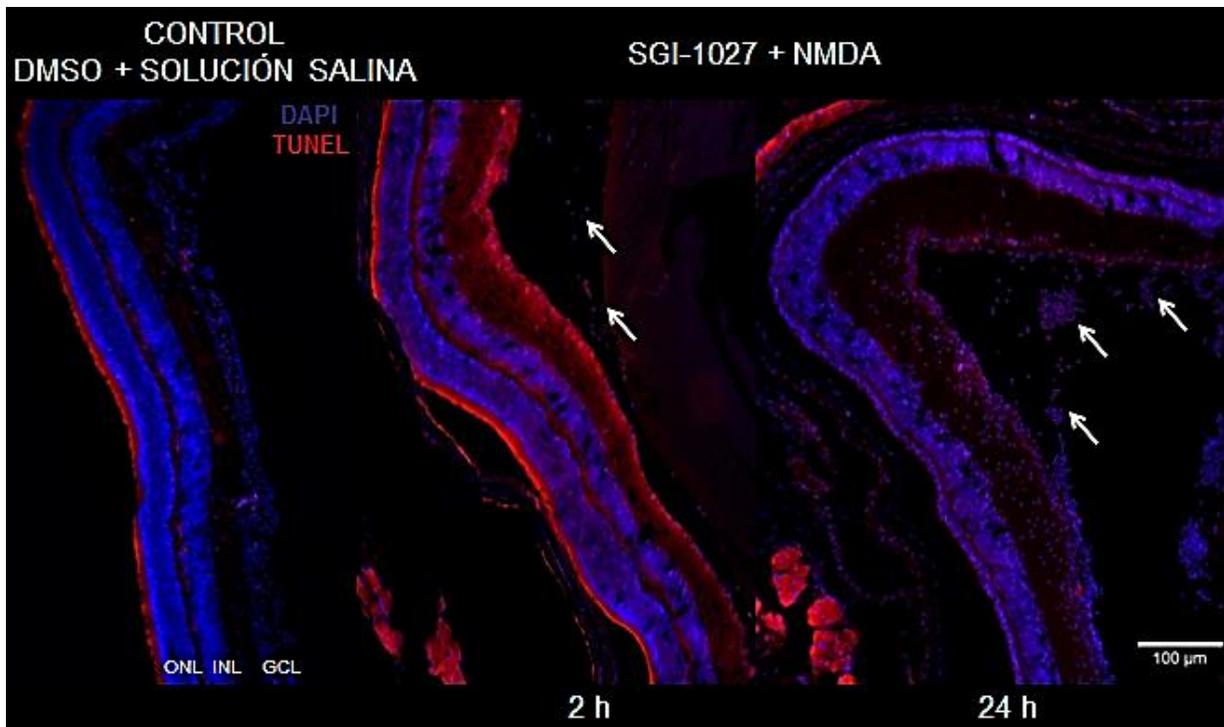


Figura 21. Análisis de muerte celular por apoptosis con la técnica de TUNEL tras la inyección intravítrea de la combinación de SGI-1027 + NMDA. Estructura de la retina de ratones P14-15. Cortes sagitales de retina de 12 µm. Se pueden observar las capas nucleares ONL (Capa Nuclear Externa), INL (Capa Nuclear Interna) y GCL (Capa Ganglionar) con DAPI y la marca positiva a TUNEL en morado y rojo. La barra de calibración corresponde a 100 µm. Aumento 10x.

En la figura 21 a manera comparativa, se muestran los tratamientos a las 24 h post-inyección de NMDA en ausencia y/o presencia del pretratamiento con SGI-1027. Los resultados muestran que la combinación de daño más inhibición de la metilación en el DNA incrementa la muerte celular por apoptosis en todas las capas nucleares de la retina (ONL, INL y GCL).

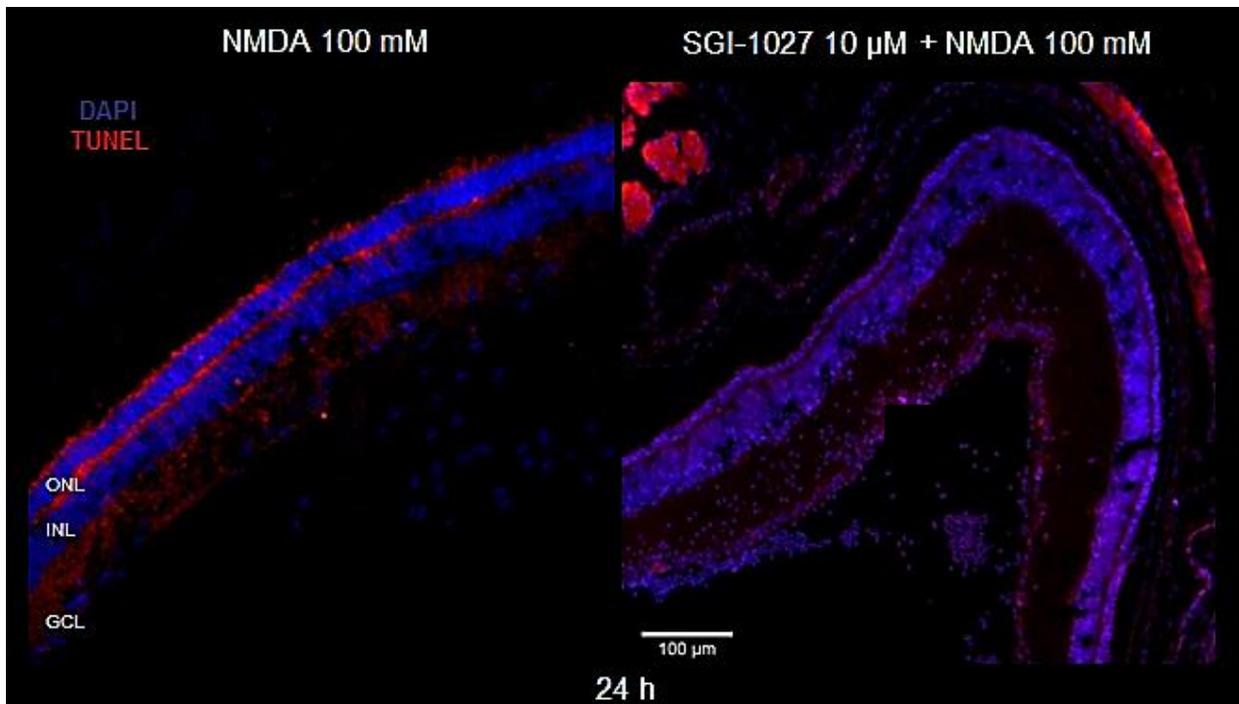


Figura 22. Comparación de la muerte celular entre el tratamiento con NMDA contra la combinación SGI-1027 + NMDA a las 24 h post-inyección. Inmunofluorescencia en ratones P14-15. Cortes sagitales de retina de 12 μm . Se pueden observar las capas nucleares ONL (Capa Nuclear Externa), INL (Capa Nuclear Interna) y GCL (Capa Ganglionar) con DAPI y marca positiva a TUNEL en morado y rojo. La barra de calibración corresponde a 100 μm . Aumento 10x.

6.4.3 Proliferación celular

El ensayo de incorporación de BrdU y su colocalización con CRALBP revela un marcaje difuso de BrdU desde las 2 h post-inyección de la combinación de SGI-1027 + NMDA en todas las capas nucleares de la retina, así como pérdida del patrón característico de localización de la GM. Esta marca se mantiene hasta las 24 h (fig. 23). Adicionalmente se observan núcleos positivos a BrdU extra-retinianos (flechas blancas).

Al realizar un análisis comparativo de la incorporación de BrdU entre el tratamiento con NMDA en ausencia o presencia del pretratamiento con SGI-1027 a las 24 h post-inyección (Fig.24) se observa que mientras en el modelo experimental con solo el daño se induce la proliferación celular en la INL, por el contrario, con el pretratamiento con SGI-1027 se produce un marcaje difuso e inespecífico a BrdU que

podría reflejar la desestabilización de la estructura retiniana. Además, se observó la aparición de núcleos marcados positivamente a BrdU, es decir, en proliferación extra-retinianos (flechas).

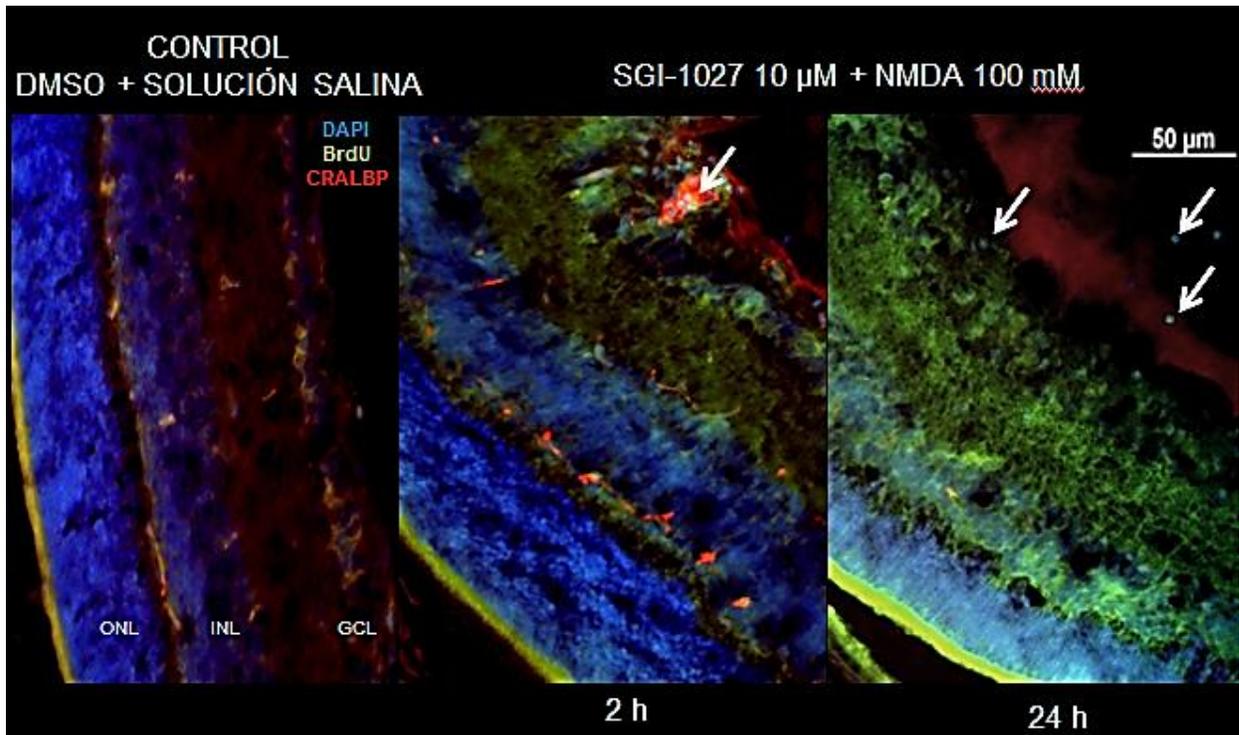


Figura 23. Análisis de la proliferación celular mediante el marcaje positivo a la incorporación de BrdU tras la inyección intravítrea de la combinación de SGI-1027 + NMDA. Fotomicrografías en la retina de ratón P14-15 a las 2 h y 24 h post-inyección. Cortes sagitales de retina de 12 μm. Comparativa con control vehículo (DMSO 0.05% + Solución Salina 0.9%, 24 h). Se pueden observar las capas nucleares ONL (Capa Nuclear Externa), INL (Capa Nuclear Interna) y GCL (Capa Ganglionar) con DAPI, la GM marcada con CRALPB (rojo) y en colocalización los núcleos en proliferación (flechas). La barra de calibración corresponde a 50 μm. Aumento 40x.

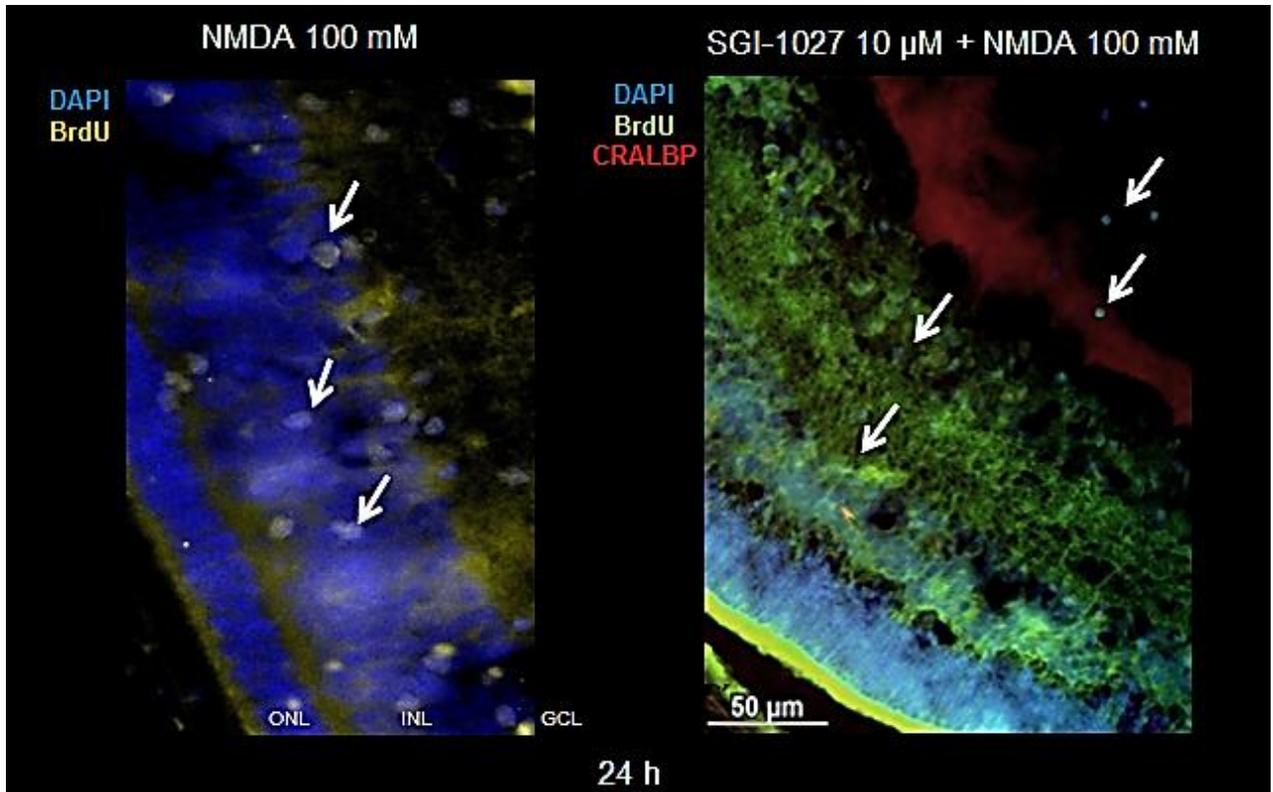


Figura 24. Comparación de la proliferación celular por la incorporación de BrdU entre NMDA y SGI-1027 + NMDA a las 24 h post-inyección. Fotomicrografías de retina de ratón P14-15. Cortes sagitales de retina de 12 μm . Se observan las capas nucleares ONL (Capa Nuclear Externa), INL (Capa Nuclear Interna) y GCL (Capa Ganglionar) con DAPI, la GM mediante marca positiva a CRALPB (rojo) y en colocalización los núcleos en proliferación (flechas). La barra de calibración corresponde a 50 μm . Aumento 40x.

6.4.4 Inducción de la expresión del gen de pluripotencia

En el análisis de inmunofluorescencia contra LIN28 en la retina de ratones P14-15 se observa la formación de una nueva “capa” (flecha blanca) de células extra-retinianas a las 24 h post-inyección de la combinación de SGI-1027 + NMDA. Gracias al marcaje con CRALBP se observan cambios en la expresión del patrón característico de la GM. Esto es más evidente al compararlo con la administración únicamente de NMDA (Fig. 25).

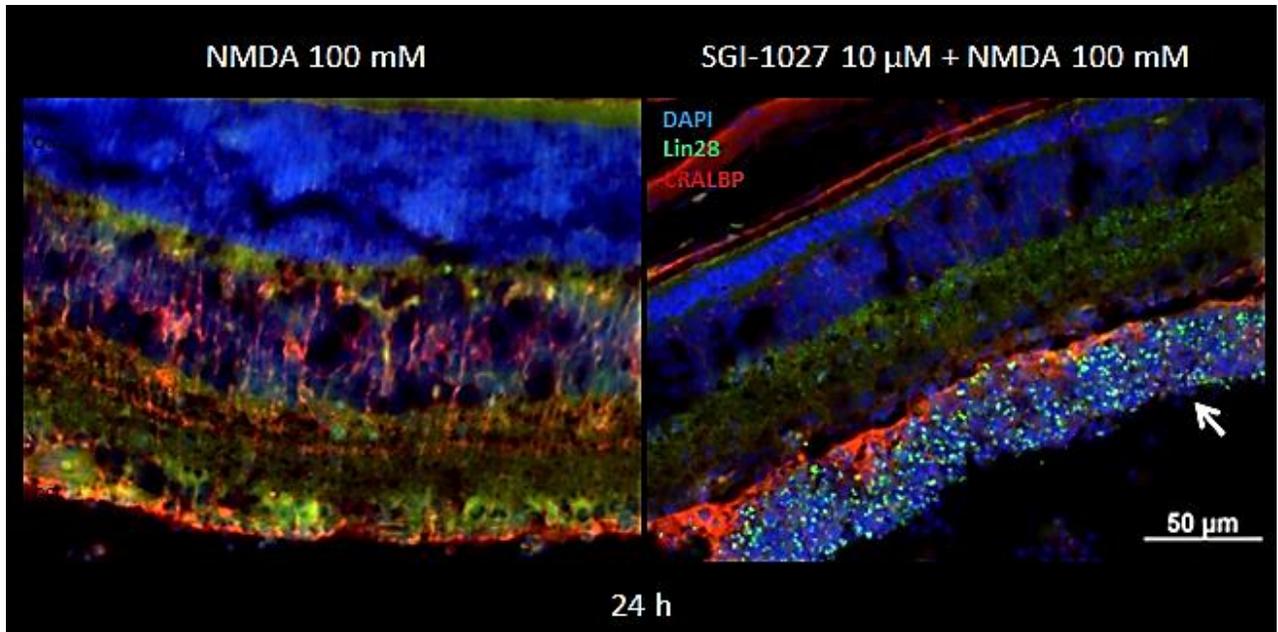
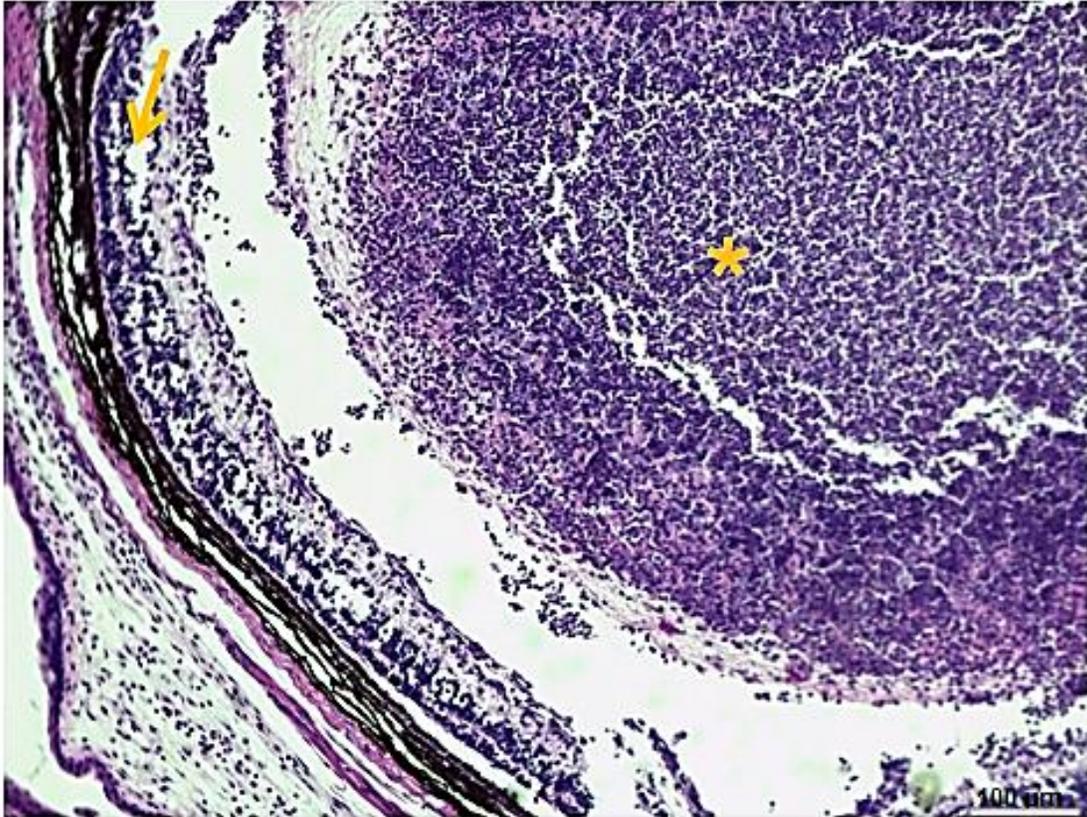


Figura 25. Comparación de la expresión del gen asociado a pluripotencia *Lin28* y de CRALBP 24 h post-inyección de la combinación de SGI-1027 + NMDA contra NMDA. Fotomicrografías en la retina de ratón P14-15. Cortes sagitales de retina de 12 μm . Se observan las capas nucleares ONL (Capa Nuclear Externa), INL (Capa Nuclear Interna) y GCL (Capa Ganglionar) con DAPI, la GM marcada con CRALBP (rojo) y en colocalización los núcleos extra-retinianos en proliferación (flechas blancas). La barra de calibración corresponde a 50 μm . Aumento 40x.

6.5 Efectos a mediano plazo de la administración del inhibidor de la metilación en el modelo de daño retiniano inducido por NMDA

Al evaluar lo que ocurre en la estructura y morfología de la retina con tinción H-E a mediano plazo (6 días), se observó disminución en la celularidad retiniana, a tal grado que se pierde la estructura característica (flecha amarilla). Adicionalmente se presenta la formación y acumulación extensa de núcleos extra-retinianos en lo que parece ser una estructura compacta (asterisco) (Fig. 26).

SGI-1027 10 μ M + NMDA 100 mM



6 d

Figura 26. Evaluación histológica por H-E a los 6 días de la administración intravítrea de la combinación de SGI-1027 + NMDA en la retina de ratones P14-P15. Cortes sagitales de retina de 5 μ m con tinción H-E. Se observa que la estructura de la retina se ha perdido casi en su totalidad (flecha amarilla). El asterisco representa la formación y acumulación extensa de células extra-retinianas. La barra de calibración corresponde a 100 μ m. Aumento 10x.

7. Discusión

En este trabajo se demostró, contrario a nuestra hipótesis, que la inhibición de la metilación del DNA exacerba el daño tisular en el modelo de daño excitotóxico con NMDA en la retina de ratón joven (P14-15). En la tabla 2 se resumen los parámetros evaluados y los resultados obtenidos.

Tabla 2. Resumen de los resultados obtenidos de todos los tratamientos y parámetros evaluados.

Tratamiento/parámetro	NMDA	SIG-1027	NMDA + SIG-1027
Daño morfológico y estructural (Tinciones H-E)	+	----	+++
Muerte celular (TUNEL)	++	+	+++
BrdU (Proliferación)	+	++	+++
Genes de pluripotencia (Expresión de <i>Lin28</i>)	+	----	+++
Metilación global	++	+	----

NMDA: modelo de daño excitotóxico por inyección intravítrea de NMDA 100 mM, SIG-1027: inyección intravítrea del inhibidor de la metilación del DNA 10 μ M, + baja, ++ moderada, +++ alto, ---- no disponible.

7.1 La inhibición de la metilación del DNA como propuesta terapéutica para la regeneración tisular

La regulación epigenética juega un papel importante en diversos procesos biológicos, incluyendo procesos de regeneración, que abarcan desde proliferación y migración celular hasta procesos de remodelación tisular como respuesta al daño externo (Ti et al., 2014).

Al inhibir a las Dnmt's se pueden reactivar genes que se encuentran silenciados . En condiciones patológicas, el porcentaje de metilación del DNA se altera

provocando el desarrollo de algunas patologías (Feinberg, 2007). Por lo cual, se ha propuesto como un posible blanco terapéutico. Por ejemplo, genes supresores de tumores que se encuentran silenciados en células cancerosas *in vitro* se hipometilan mediante la administración de 5-azacitidina o 5-D-aza-2-deoxitidina disminuyendo el crecimiento tumoral (García-Domínguez et al., 2013).

Por otra parte, algunos estudios indican que el nivel de metilación del DNA es un factor crítico y está relacionado con la regeneración tisular. En particular, el bajo estado de metilación de *Shh*, gen involucrado en el desarrollo temprano del embrión, está directamente relacionado con la regeneración de las extremidades en *Xenopus* adultos (Yakushiji et al., 2007). En contraste, el aumento en el estado de metilación del DNA disminuye la capacidad regenerativa del corazón en ratones neonatales después del daño (Górnikiewicz et al., 2016). En este sentido, nuestro grupo de investigación demostró que la inhibición de la metilación del DNA, mediante el fármaco SGI-1027, permite la expresión sostenida del gen de pluripotencia *Oct4* en células de la GM en retinas de ratones adultos en un modelo de daño con NMDA (Reyes-Aguirre & Lamas, 2016).

A partir de estas observaciones, en este trabajo evaluamos el efecto de la inhibición de la metilación del DNA en las células de la GM mediante la administración intravítrea del fármaco SGI-1027 en condiciones fisiológicas y en un modelo de daño con NMDA *in vivo*.

7.2 Efecto de la inhibición de la metilación en la retina en ausencia de daño excitotóxico

El diseño experimental de este proyecto incluyó un control de evaluación del efecto del fármaco sobre los parámetros de interés en ausencia del modelo de daño excitotóxico.

En primer lugar, se observó que el tratamiento con SGI-1027 induce disminución de 9-25% de la inmunofluorescencia a 5mC (Fig. 15 y 16). Este, relativamente pequeño, decremento en el patrón de metilación global fue suficiente para causar

cambios drásticos en los parámetros evaluados. Esto pudiera coincidir con observaciones realizadas en células cancerosas *in vitro*, donde la inhibición de la metilación con algunos fármacos no causa desmetilación global, si no que se desmetilan específicamente las islas CpG de genes supresores de tumores que se encontraban silenciados (Datta et al., 2010). El protocolo experimental utilizado en este trabajo no abordó la identificación de los promotores de los genes que se hipometilan. Sin embargo, sería relevante realizar este estudio y evaluar la expresión de genes de interés asociados a proliferación, pluripotencia, daño y regeneración.

En segundo lugar observamos que, en la retina, la inhibición de la metilación del DNA en ausencia de daño induce muerte celular por apoptosis e incorporación de BrdU y consideramos que ambos procesos pudieran estar relacionados. Ya que, en principio, la muerte celular es una señal de activación del proceso de desdiferenciación y proliferación de la GM (Sardar-Pasha et al., 2017). Sin embargo, la incorporación de BrdU en las células también puede reflejar procesos de reparación en el DNA de células dañadas (Zheng et al., 2011).

En cualquier caso, estos experimentos contribuyen a la generación de conocimiento sobre el controvertido papel de la metilación del DNA durante la retinogénesis, en la retina posnatal y en el desarrollo de retinopatías. En este sentido, se ha descrito que tanto la hipermetilación como la hipometilación conducen a la muerte de fotorreceptores. Por ejemplo, la inhibición de la Dnmt1 disminuye la marca positiva a fotorreceptores diferenciados en la retina de peces cebra. Sin embargo, esto ocurre sin observarse muerte celular (Rhee et al., 2012).

Depletar a la Dnmt1 durante la retinogénesis en ratones causa alteraciones que no impiden el desarrollo. Se desarrollan células ganglionares, horizontales y amacrinas; es decir, se mantiene la proliferación de los progenitores en la retina.

Sin embargo, se afecta gravemente la supervivencia y diferenciación neuronal retiniana, causando la muerte celular y degeneración a tiempos cortos. Además, la inhibición de la Dnmt1 disminuye considerablemente el grosor y celularidad retiniana desde el P0 hasta P30 y causa cambios en el ciclo celular manteniendo a las células principalmente en la fase G1 (Rhee et al., 2012). Esta inhibición de la Dnmt1 en la retina de mamíferos post natal es, por lo tanto, deletérea (Farinelli et al., 2014).

Nuestros hallazgos demuestran que la inhibición de Dnmt's en retinas de ratón P14-15, es decir, completamente desarrolladas, también conduce a proliferación celular y a la degeneración de la retina. Quizá entonces la función de estas no se limite a lo que se ha descrito y en cambio presenten otras funciones o regulen diversos procesos. Por ejemplo, en el cerebro adulto de ratones las Dnmt's son necesarias para mantener la función normal y la plasticidad (Feng et al., 2010).

7.3 Efecto de la inhibición de la metilación en el modelo de daño excitotóxico

7.3.1 El protocolo de daño excitotóxico inducido por NMDA

El daño excitotóxico con NMDA se ha utilizado ampliamente por diversos grupos de investigación (Jorstad et al., 2017; Karl et al., 2008; Karl & Reh, 2012; Reyes-Aguirre & Lamas, 2016) con el propósito de estimular a las células de la GM para desdiferenciarse, proliferar y diferenciarse en nuevas neuronas. En algunas especies como el pez cebra, estos procesos consiguen finalmente la regeneración funcional (Gallina et al., 2014). En este trabajo aportamos observaciones novedosas que se suman al entendimiento de este modelo.

La capacidad regenerativa de las células de la GM se restringe por diversos factores como la especie y la edad, entre más joven sea el individuo, es más sencillo que la GM pueda responder proliferando y expresando genes de pluripotencia que subsecuentemente podrían dar paso a procesos de

regeneración. Sin embargo, esta capacidad se pierde muy pronto en el ratón, (P16-18) y la GM responde entonces con procesos que presentan los organismos adultos, en donde la proliferación y regeneración es prácticamente inexistente (Löffler et al., 2015; Ueki et al., 2015). En nuestro caso, al utilizar ratones de P14-15 nos encontramos en una ventana de tiempo importante ya que las células de la GM están completamente desarrolladas desde el día P12, pero podrían no responder aun como organismos adultos y conservar cierta capacidad regenerativa.

7.3.2 Modificaciones estructurales y muerte celular

La retina se encuentra organizada en capas bien definidas. Atravesándola completamente se encuentran las células de la GM, que juegan un papel importante tanto en la función normal de la retina como en el daño y las patologías (Swaroop et al., 2010; Vecino et al., 2016). Este tipo celular además es resistente particularmente al daño con NMDA (Karl & Reh, 2012). En este trabajo se observó que el protocolo de daño con la inyección de NMDA 100 mM es suficiente para generar daño estructural destacable en ratones P14-15 desde las 2 h post inyección principalmente en las capas GCL, IPL e INL. Este daño se mantiene e incluso incrementa con el tiempo hasta las 24 h post-inyección y además causa muerte celular por apoptosis desde las 2 h en GCL e INL y a las 24 h en IPL y OPL. Estas observaciones junto con experimentos previos de nuestro laboratorio sugieren que el daño podría ser dosis dependiente ya que al usar una concentración mayor de NMDA (250 mM) el daño observado es mayor (Reyes-Aguirre & Lamas, 2016).

7.3.3 Proliferación (Incorporación de BrdU)

A través de la medición de la incorporación de BrdU en las células se pueden evaluar algunos de los procesos por los cuales está atravesando una célula, principalmente proliferación e incluso el proceso de migración. Esto dependerá del tiempo de análisis post administración. El BrdU se incorpora en la fase S del ciclo

celular por lo cual podemos analizar la proliferación celular a tiempos cortos (Miller & Nowakowski, 1988).

El proceso de proliferación celular es uno de los primeros procesos que ocurren después del daño y se ha asociado, en el pez cebra, con el inicio de la fase de regeneración (King & Newmark, 2012). Sin embargo, esta respuesta, específicamente en el SNC de mamíferos, se trata más bien de un fenómeno bivalente que puede tener como consecuencia o bien un proceso de gliosis reactiva que dará origen a una cicatriz glial o el inicio del proceso de regeneración. En la retina la respuesta de proliferación ante el daño se produce casi exclusivamente en las células de la GM (Bringmann et al., 2009).

En este trabajo, en consonancia con la literatura, observamos la incorporación de BrdU principalmente 24 h después del daño con NMDA. Este patrón se vuelve difuso al administrar además, el inhibidor de la metilación del DNA. En este caso podemos especular que esta proliferación es deletérea para la retina y que finalmente se refleja una pérdida importante de la localización característica de las células retinianas, así como la presencia de células proliferantes en el espacio extra-retiniano.

7.3.4 Inducción de la expresión del gen de pluripotencia *Lin28*

La expresión de genes de pluripotencia se asocia a la capacidad regenerativa de las células, por lo cual evaluamos la expresión de un gen asociado a un estado pluripotente, en este caso, *Lin28*. Sin embargo, la expresión de un solo gen, no garantiza el carácter pluripotente de las células o su capacidad de regeneración, pero se considera un signo de desdiferenciación. Se requiere de la combinación de dos o más factores que promuevan la sobrevivencia, desdiferenciación y/o migración para lograr la regeneración funcional después del daño retiniano en mamíferos a partir de las células de la GM (Datta et al., 2010; Jorstad et al., 2017; Ueki et al., 2015).

En este trabajo reportamos por primera vez la inducción de la expresión de *Lin28* en células de la GM de la retina de ratones P14-15 sometidos por 24 h al modelo de daño excitotóxico con NMDA. De manera interesante observamos que tras la administración del inhibidor SGI-1027 se forma una agrupación de células extra-retinianas que expresan marcadamente *Lin28*. La potencialidad real de estas células o el posible destino celular son aspectos que deberán ser explorados.

7.4 La inhibición de la metilación del DNA exagera el daño tisular en el modelo de daño excitotóxico

En todos los parámetros evaluados, la inhibición de la metilación del DNA resultó en la exacerbación del daño. Se pierde la estructura laminar de la retina casi por completo, la muerte celular se incrementa, así como la incorporación de BrdU desde las 24 h post-inyección en la capa INL. Además, esta marca se vuelve difusa con la administración del inhibidor de la metilación del DNA en el modelo de daño. La estructura ordenada de la retina ya no es visible y la marca de CRALBP se confina principalmente en la GCL e incluso en el espacio extra-retiniano al igual que una nueva formación de células que responden positivamente al marcaje contra *Lin28*. En este sentido, especulamos que se ha producido una proliferación deletérea para la retina y que finalmente se refleja en la pérdida importante de la localización característica de las células retinianas.

La migración de células al espacio extra-retiniano es una de las observaciones más novedosas del presente trabajo. En el transcurso de la evaluación de la inducción de la expresión del gen de pluripotencia *Lin28* observamos que la administración del inhibidor SGI-1027 induce la agrupación de células que expresan marcadamente *Lin28* pero que se localizan en un espacio extra-retiniano. El seguimiento de este experimento a mediano plazo (6 días) muestra la formación de una gran masa celular en el espacio extra-retiniano y la pérdida de la estructura laminar de la retina.

El grado de potencialidad troncal de estas células, el posible destino celular o fenotipo y su carácter tumoral son aspectos que deberán ser explorados ya que estas observaciones pudieran tener un correlato con ciertas patologías descritas en el humano. La proliferación celular se ha asociado con el inicio de la fase de regeneración. Sin embargo, esta proliferación debe estar finamente controlada ya que de lo contrario se daría origen principalmente a tumores. Por ejemplo, el caso de dos tumores intraoculares: melanoma y retinoblastoma. El primero de ellos se presenta más frecuente en adultos (Serrano et al., 2014) y el segundo se desarrolla más bien en la infancia (Fredy et al., 2012). La vitreorretinopatía proliferativa, es otra patología retiniana que se caracteriza por la migración de células del epitelio pigmentario a través de la retina hasta la cavidad vítrea donde proliferan (Ng-González & Graue-Wiechers, 2004).

La migración de las células de la GM desde la INL hacia la o las zonas de regeneración neuronal se ha descrito en especies regenerativas como en el pez cebra (Lahne et al., 2015), dicha migración es necesaria para la regeneración estructural y funcional del tejido. En mamíferos se ha descrito muy poco respecto a este proceso. Se sabe que las células de la GM seguidas de los astrocitos migran hacia la membrana limitante interna (ILM) o a la zona del vítreo bajo algunas condiciones idiopáticas y/o patologías (Edwards et al., 2016); tal es el caso de la retinopatía diabética y el desprendimiento retiniano (Bringmann et al., 2009). Se ha descrito, además, que el tamaño y número de las estructuras pre-retinianas (formaciones de células gliales en la ILM) incrementa de acuerdo al daño (Edwards et al., 2016). Aparentemente, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas existen proyecciones gliales al espacio extra-retiniano. Sin embargo, éstas no se han asociado a respuestas de regeneración retiniana.

Los procesos por los cuales se rige la migración de células retinianas no se conocen exactamente. Se ha descrito que las interacciones con proteínas del vítreo pueden estimular la migración de células gliales y que la inyección

intravítrea del factor de crecimiento de fibroblastos estimula la migración glial en el vítreo felino (Lewis & Fisher, 2003).

7.5 Regeneración retiniana en mamíferos: algunas puntualizaciones y nuevas perspectivas

Pocos han sido los protocolos que se han desarrollado para estudiar procesos de proliferación y regeneración retiniana *in vivo* en mamíferos (Shu-Zhen, 2012) y menos aun los que evalúan el posible efecto de los inhibidores de la metilación del ADN por lo que este es un campo con un alto potencial de exploración.

Como se menciona anteriormente, la terapéutica actual utiliza con éxito agentes hipometilantes para disminuir el crecimiento tumoral (García-Domínguez et al., 2013). Sin embargo, en las células cancerígenas las condiciones fisiológicas se encuentran alteradas. El patrón de metilación global se encuentra hipometilado, y los genes que codifican para supresores tumorales particularmente hipermetilados (Feinberg & Tycko, 2004).

Por otro lado, se ha descrito que se exagera el daño neurotóxico en neuronas dopaminérgicas tras administrar inhibidores de Dnmt's (5-aza-dC) en modelos de daño de Parkinson. Además, el daño *per se* causa una disminución en el porcentaje de metilación del DNA (Wang et al., 2013). En coincidencia, en el modelo de daño excitotóxico con NMDA en la retina de ratón también disminuye el porcentaje de metilación global del DNA (Reyes-Aguirre & Lamas, 2016). Por lo cual, inferimos que inhibir la metilación solo es favorable en patologías y/o modelos en donde se presenten fenómenos hipermetilantes.

Podemos especular que la vía que toma la GM entre una respuesta regenerativa o una respuesta deletérea está directamente relacionada con un complejo equilibrio entre los procesos que conllevan a la regeneración (desdiferenciación, proliferación controlada, diferenciación neuronal) y los procesos de gliosis reactiva que conllevan a la formación de la cicatriz glial (proliferación descontrolada,

activación de macroglía, activación de genes como GFAP, pérdida funcional) (Thomas et al., 2016).

La GM de peces cebra, después del daño, atraviesa por un proceso de activación que en inicio es neuroprotector, se trata de una respuesta que inicialmente activa a las células de la macroglía y que es imprescindible para la regeneración (De Hoz et al., 2016). Este proceso se conoce como gliosis reactiva y se presenta de dos formas: proliferativa y no proliferativa. Para que se activen procesos de regeneración se requiere que dicha respuesta sea proliferativa (Fig. 27) (Thomas et al., 2016).

A pesar de que en la GM de mamíferos no se han dilucidado completamente los mecanismos celulares o moleculares que subyacen a la activación de procesos de regeneración (Thomas et al., 2016). En peces cebra se ha caracterizado que después del daño se activan algunos genes como *Oct4*, *Ascl1* y *Lin28* y estos fungen como iniciadores del proceso de regeneración (Ramachandran et al., 2010). Por lo que como perspectiva a este proyecto se propone el uso de la técnica CRISPR/Cas 9 (repeticiones palíndromicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas) para la activación específica de los genes activadores de procesos de regeneración anteriormente mencionados. Esta técnica es una herramienta de ingeniería genómica que permite selectivamente activar o inhibir la expresión de un gen de interés (Ran et al., 2013).

Adicionalmente, a los parámetros evaluados, nos parece interesante determinar si la GM se encuentra atravesando por un proceso de gliosis reactiva después de la administración del inhibidor de la metilación del DNA en nuestro modelo de daño con NMDA, esto con ayuda de marcadores como GFAP o Vimentina (Graca et al., 2018). Además, evaluar los cambios en la expresión de ciertos genes de interés en diferentes condiciones y tiempos. Por ejemplo, los gen que codifican a las Dnmt's y genes asociados a pluripotencia.

De esta manera consideramos entonces imprescindible el estudio combinado de ambos procesos (daño y regeneración) que permitan analizar de manera más integra los procesos moleculares que subyacen a ambas respuestas por las que puede atravesar la GM en respuesta al daño retiniano (fig. 27) y favorecer el desplazamiento del equilibrio hacia una respuesta regenerativa.

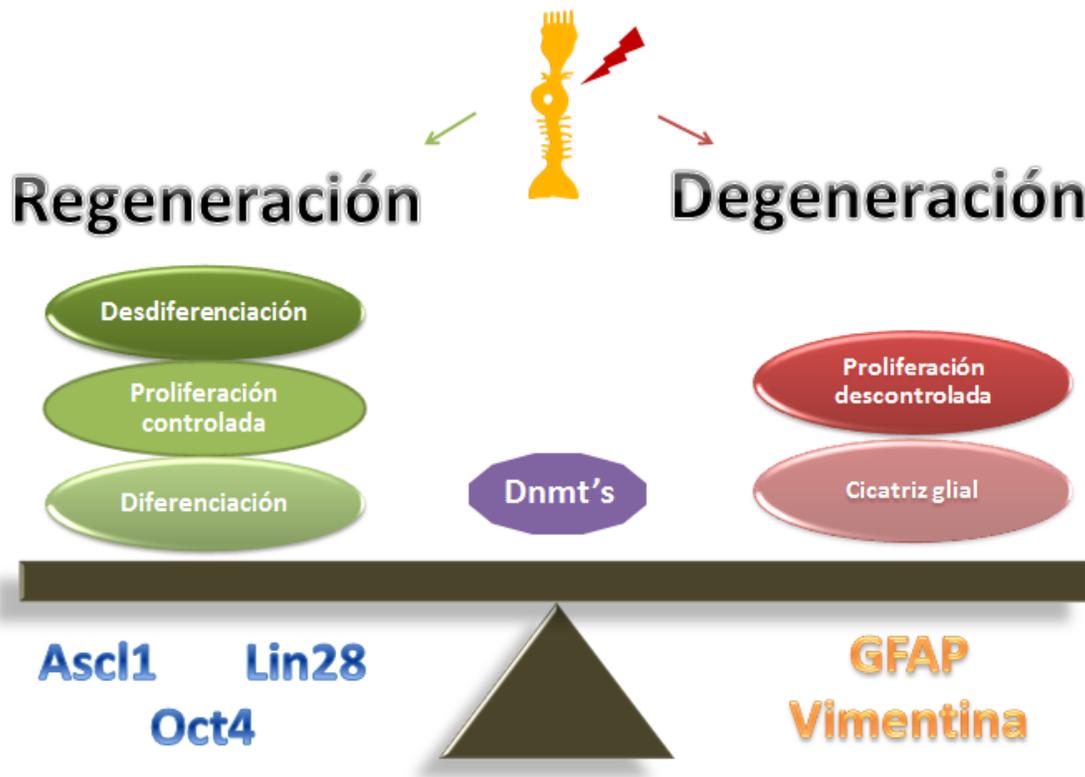


Figura 27. Respuestas por las que puede atravesar la GM ante el daño retiniano. Se esquematizan dos respuestas principales en equilibrio: regeneración y degeneración. En la primera de ellas, en la GM después del daño se activan procesos que finalmente conllevaran a la regeneración del tejido, durante esta activación se activarán genes asociados a pluripotencia como *Ascl1*, *Oct4* y *Lin28*. Por el otro lado, se activa una respuesta degenerativa en donde se originará una cicatriz glial y finalmente conducirá a la pérdida en la funcionalidad de la retina, durante esta respuesta se incrementan los niveles de expresión de GFAP y Vimentina.

8. Conclusión

Los resultados sugieren que la inhibición de la metilación del DNA con SGI-1027 exacerba el daño tisular retiniano en el modelo de daño con NMDA. Esto conduce a la pérdida estructural, incremento de la proliferación celular, cambio en la localización característica de la GM y formación de una nueva capa de células extra-retinianas.

9. Referencias

- Bedran-Russo, A. K., Karol, S., Pashley, D. H., Viana, G. (2013). Site specific properties of carious dentin matrices biomodified with collagen cross-linkers. *American Journal of Dentistry*, 26(5), 244–248. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9767-z>.Plastid
- Blackshaw, S., Harpavat, S., Trimarchi, J., Cai, L., Huang, H., Kuo, W. P., Cepko, C. L. (2004). Genomic analysis of mouse retinal development. *PLoS Biology*, 2(9), e247. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020247>
- Bringmann, A., Landiev, 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(09), 423–451. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2009.07.001>
- Chávez-González, M.A., Chimal-Monroy, J., Flores-Figueroa, E., Lamas, M. (2017). Células troncales, Biología y aplicaciones en Biomedicina. *Universidad Nacional Autónoma de México*. CDMX, México.
- Datta, J., Ghoshal, K., Denny, W. A., Gamage, S. A., Darby, G., Phiasivongsa, P., Jacob, S. T. (2010). Methyltransferase 1 activity and inducing its degradation. *Cancer*, 69(10), 4277–4285. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3669.A>
- Datta, J., Ghoshal, K., Denny, W. A., Gamage, S. A., Brooke, D. G., Phiasivongsa, P., Jacob, S. T. (2009). A new class of quinoline-based DNA hypomethylating agents reactivates tumor suppressor genes by blocking DNA methyltransferase 1 activity and inducing its degradation. *Cancer Research*, 69(10), 4277–4285. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3669>
- De Hoz, R., Rojas, B., Ramírez, A. I., Salazar, J. J., Gallego, B. I., Trivini, A., Ramírez, J. M. (2016). Retinal macroglial responses in health and disease. *BioMed Research International*, (20)16, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2016/2954721>

- Edwards, M. M., McLeod, D. S., Bhutto, I. A., Villalonga, M. B., Seddon, J. M., Luty, G. A. (2016). Idiopathic preretinal glia in aging and age-related macular degeneration. *Experimental Eye Research*, 150, 44–61. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.07.016>
- Farinelli, P., Perera, A., Arango-Gonzalez, B., Trifunovic, D., Wagner, M., Carell, T., Ekström, P. A. R. (2014). DNA methylation and differential gene regulation in photoreceptor cell death. *Cell Death and Disease*, 5(12), e1558. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.512>
- Fawcett, J. W., Asher, R. A. (1999). The glial scar and central nervous system repair. *Brain Research Bulletin*, 49(6), 377–391. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(99\)00072-6](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(99)00072-6)
- Feinberg, A. P. (2007). Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature*, 447(7143), 433–440. <https://doi.org/10.1038/nature05919>
- Feinberg, A. P., Tycko, B. (2004). The history of cancer epigenetics. *Nature Reviews Cancer*, 4(2), 143–153. <https://doi.org/10.1038/nrc1279>
- Feng, J., Zhou, Y., Campbell, S. L., Le, T., Li, E., Sweatt, J. D., Fan, G. (2010). Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nature Neuroscience*, 13(4), 423–430. <https://doi.org/10.1038/nn.2514>
- Fischer, A. J., Reh, T. A. (2001). Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nature Neuroscience*, 4(3), 247–252. <https://doi.org/10.1038/85090>
- Fischer, A. J., & Reh, T. A. (2003). Potential of Müller glia to become neurogenic retinal progenitor cells. *Glia*, 43(1), 70–76. <https://doi.org/10.1002/glia.10218>
- Fredy, J., Duarte, V., María, L., Pérez, Q., Andrea, I., Martínez, M. (2012). Consideraciones clínicas, diagnósticas y de tratamiento en retinoblastoma. *MedUnab*, 14(3), 180–187.

- Gallina, D., Todd, L., Fischer, A. J. (2014). A comparative analysis of Müller glia-mediated regeneration in the vertebrate retina. *Experimental Eye Research*, 123(14), 121-130. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.06.019>
- García-Domínguez, P., Dell'Aversana, C., Alvarez, R., Altucci, L., De Lera, Á. R. (2013). Synthetic approaches to DNMT inhibitor SGI-1027 and effects on the U937 leukemia cell line. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 23(6), 1631–1635. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.01.085>
- Górnikiewicz, B., Ronowicz, A., Krzemiński, M., Sachadyn, P. (2016). Changes in gene methylation patterns in neonatal murine hearts: Implications for the regenerative potential. *BMC Genomics*, 17(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2545-1>
- Graca, A. B., Hippert, C., Pearson, R. A. (2018). Müller glia reactivity and development of gliosis in response to pathological conditions. *Retinal Degenerative Diseases, Advances in Experimental Medicine and Biology*, 891, 303–308. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75402-4_37
- Graue Wiechers, E. (2009). El ojo: estructura y función. *Oftalmología En La Practica de La Medicina General*, 1–13.
- Gros, C., Fleury, L., Nahoum, V., Faux, C., Valente, S., Labella, D., Arimondo, P. B. (2015). New insights on the mechanism of quinoline-based DNA methyltransferase inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 290(10), 6293–6302. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.594671>
- 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(16), 727–738. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24375>
- INEGI. (2016). La discapacidad en México, datos al 2014. *Instituto Nacional de Estadística y Geografía*, 358. <https://doi.org/362.4021>

- Jorstad, L., Wilken, M. S., Grimes, W. N., Wohl, S. G., Vandenbosch, L. S., Yoshimatsu, T., Reh, T. A. (2017). Stimulation of functional neuronal regeneration from Müller glia in adult mice. *Nature*, 548, 103–107. <https://doi.org/10.1038/nature23283>
- Karl, M. O., Hayes, S., Nelson, B. R., Tan, K., Buckingham, B., Reh, T. A. (2008). Stimulation of neural regeneration in the mouse retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(49), 19508–19513. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807453105>
- Karl, M. O., Reh, T. A. (2012). Studying the generation of regenerated retinal neuron from Müller glia in the mouse eye. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 884, 213–227. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-848-1_15
- King, R. S., Newmark, P. A. (2012). The cell biology of regeneration. *Journal of Cell Biology*, 196(5), 553–562. <https://doi.org/10.1083/jcb.201105099>
- Lahne, M., Li, J., Marton, R. M., Hyde, D. R. (2015). Actin-Cytoskeleton- and rock-mediated INM are required for photoreceptor regeneration in the adult zebrafish retina. *Journal of Neuroscience*, 35(47), 15612–15634. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5005-14.2015>
- Lenkowski, J. R., Raymond, P. A. (2014). Müller glia: Stem cells for generation and regeneration of retinal neurons in teleost fish. *Progress in Retinal and Eye Research*, 40(14), 94-123. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2013.12.007>
- Lewis, G. P., Fisher, S. K. (2003). Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. *International Review of Cytology*, 230, 263–290. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(03\)30005-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(03)30005-1)
- Livesey, F. J., Cepko, C. L., Medical, H. H. (2001). Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina, *Nature Reviews, Mcmillan Magazines Ltd*, 2(02), 109-118. <https://doi.org/10.1038/35053522>

- Löffler, K., Schäfer, P., Völkner, M., Holdt, T., Karl, M. O. (2015). Age-dependent Müller glia neurogenic competence in the mouse retina. *Glia*, 63(10), 1809–1824. <https://doi.org/10.1002/glia.22846>
- Matsushima, D., Heavner, W., Pevny, L. H. (2011). Combinatorial regulation of optic cup progenitor cell fate by SOX2 and PAX6. *Development and Stem Cells*, 138(11), 443-454. <https://doi.org/10.1242/dev.055178>
- Miller, M. W., Nowakowski, R. S. (1988). Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. *Brain Research*, 457(88), 44-52. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90055-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90055-8)
- Ng González, K. D. R., Graue Wiechers, F. A. (2004). Tratamiento médico de la vitreorretinopatía proliferativa con colchicina oral. *Revista Mexicana de Oftalmología*, 78(1), 13–16.
- Organización mundial de la salud.(OMS) Datos y cifras. 10 datos de la ceguera y la discapacidad visual. Consultado y recuperado en Octubre 2018 de http://www.who.int/features/factfiles/blindness/blindness_facts/es/index9.html
- 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. *Nature Cell Biology*, 12(11), 1101–1107. <https://doi.org/10.1038/ncb2115>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- 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(16) 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00523>

- Rhee, K. D., Yu, J., Zhao, C. Y., Fan, G., Yang, X. J. (2012). Dnmt1-dependent DNA methylation is essential for photoreceptor terminal differentiation and retinal neuron survival. *Cell Death and Disease*, 3(11), e427. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.165>
- Robles, R. G., Ayala Ramírez, P. A., Perdomo Velásquez, S. P. (2012). Epigenética: Definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. *Revista Ciencias de La Salud*, 10(1), 59–71.
- Sardar Pasha, S. P. B., Münch, R., Schäfer, P., Oertel, P., Sykes, A. M., Zhu, Y., Karl, M. O. (2017). Retinal cell death dependent reactive proliferative gliosis in the mouse retina. *Scientific Reports*, 7(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09743-8>
- Serrano, A. P., Benitez, J. T. C., Vega, M. B., Vielmaa, S. R. (2014). Características ecográficas de melanomas uveales en población Mexicana (serie de casos). *Revista Mexicana de Oftalmología*, 88(4), 200–204. <https://doi.org/10.1016/j.mexoft.2014.06.001>
- Swaroop, A., Kim, D., Forrest, D. (2010). Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(8), 563–576. <https://doi.org/10.1038/nrn2880>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.09.017>
- Ti, D., Li, M., Fu, X., Han, W. (2014). Causes and consequences of epigenetic regulation in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 22(3), 305–312. <https://doi.org/10.1111/wrr.12160>
- Ueki, Y., Wilken, M. S., Cox, K. E., Chipman, L., Jorstad, N., Sternhagen, K., Reh, T. A. (2015). Transgenic expression of the proneural transcription factor *Ascl1* in Müller glia stimulates retinal regeneration in young mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 112(44), 13717–13722.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1510595112>

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(16), 1-40. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.06.003>

Wang, Y., Wang, X., Li, R., Yang, Z. F., Wang, Y. Z., Gong, X. L., Wang, X. M. (2013). A DNA methyltransferase inhibitor, 5-Aza-2'-deoxycytidine, exacerbates neurotoxicity and upregulates Parkinson's disease-related genes in dopaminergic neurons. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 19(3), 183–190. <https://doi.org/10.1111/cns.12059>

Xiang, M. (2013). Intrinsic control of mammalian retinogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(14), 2519–2532. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1183-2>

Xie, S., Wang, Z., Okano, M., Nogami, M., Li, Y., He, W. W., Li, E. (1999). Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene*, 236(1), 87–95. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00252-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00252-8)

Yakushiji, N., Suzuki, M., Satoh, A., Sagai, T., Shiroishi, T., Kobayashi, H., Tamura, K. (2007). Correlation between Shh expression and DNA methylation status of the limb-specific Shh enhancer region during limb regeneration in amphibians. *Developmental Biology*, 312(1), 171–182. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.09.022>

Yurco, P., Cameron, D. A. (2005). Responses of Müller glia to retinal injury in adult zebrafish. *Vision Research*, 45(8), 991–1002. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2004.10.022>

Zheng, Y., Begum, S., Zhang, C., Fleming, K., Masumura, C., Zhang, M., Darlington, C. (2011). Increased BrdU incorporation reflecting DNA repair, neuronal de-differentiation or possible neurogenesis in the adult cochlear nucleus following bilateral cochlear lesions in the rat. *Experimental Brain Research*, 210(3–4), 477–487. <https://doi.org/10.1007/s00221-010-2491-0>