



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE LOS
RECEPTORES TIPO TOLL (TLRs) EN CÉLULAS
MADRE DE LA RETINA DE MAMÍFERO ADULTO

Ana Paz Flores Raga



Tesis

Doctorales

www.eltallerdigital.com

UNIVERSIDAD de ALICANTE



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Departament de Fisiologia, Genètica i Microbiologia
Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE LOS
RECEPTORES TIPO TOLL (TLRs) EN CÉLULAS
MADRE DE LA RETINA DE MAMÍFERO ADULTO**

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante
Tesis doctoral presentada por:

Ana Paz Flores Raga

Alicante, 2015



Universitat d'Alacant Universidad de Alicante

Departament d'Òptica, Farmacologia i Anatomia
Departamento de Óptica, Farmacología y Anatomía

<p>La Dra. Victoria Eugenia Maneu Flores Profesora titular del Departamento de Óptica, Farmacología y Anatomía de la Universidad de Alicante.</p>	<p>La Dra. M^a Violeta Gómez Vicente Profesora Ayudante Doctor del Departamento de Óptica, Farmacología y Anatomía de la Universidad de Alicante.</p>
--	--

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación que se recoge en la presente memoria, presentada por la licenciada Dña. Ana Paz Flores Raga para optar al título de **Doctora por la Universidad de Alicante** titulada "**Estudio de la expresión y función de los receptores tipo Toll (TLRs) en células madre de la retina de mamífero adulto**" ha sido realizado bajo su dirección en el departamento de Óptica, Farmacología y Anatomía de la Universidad de Alicante.

<p>Conforme</p>	<p>Conforme</p>
<p>Firmado: Victoria Eugenia Maneu Flores</p>	<p>Firmado: M^a Violeta Gómez Vicente</p>

Índice general

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. EL GLOBO OCULAR	1
1.2. LA RETINA	3
1.2.1. Estructura de la retina	4
1.2.2. Organización histológica de la retina	5
1.2.2.1. Células de la retina	5
1.2.2.2. Capas de la retina	6
1.2.2.3. Fotorreceptores	8
1.2.2.4. Células horizontales	11
1.2.2.5. Células bipolares	12
1.2.2.6. Células amacrinas	14
1.2.2.7. Células ganglionares	15
1.2.2.8. Células del epitelio pigmentario	16
1.2.2.9. Células gliales	18
1.2.3. La transducción visual	24
1.3. CÉLULAS MADRE Y PROGENITORAS	25
1.3.1. Células madre y progenitoras embrionarias de la retina	28
1.3.2. Células madre y progenitoras neurales en la retina adulta	30
1.3.3. Identificación de células madre y progenitoras en la retina de ratón adulto	32
1.3.3.1. Células madre y progenitoras en peces y anfibios	35
1.3.3.2. Células madre y progenitoras en aves	36
1.3.3.3. Células madre y progenitoras en mamíferos	37
1.3.3.4. Células VSELs	42
1.4. RECEPTORES TIPO TOLL	44
1.4.1. Receptores tipo Toll en la respuesta inmunitaria	45
1.4.2. Receptores tipo Toll en las células madre hematopoyéticas (HSCs)	46

1.4.3. Receptores tipo Toll en las células madre mesenquimales (MSCs)	47
1.4.4. Receptores tipo Toll en el sistema nervioso central (SNC)	47
2. OBJETIVOS	51
3. MATERIALES Y MÉTODOS	53
3.1. Animales utilizados	53
3.2. Extracción de retinas	53
3.3. Obtención de células linaje negativo a partir de retinas adultas	54
3.4. Análisis mediante citometría de flujo	55
3.4.1. Preparación de las células y marcaje con anticuerpos .	55
3.4.2. Análisis de células con fenotipo "Side Population" (SP)	55
3.4.3. Separación celular mediante citometría de flujo	55
3.4.4. Anticuerpos utilizados en citometría de flujo	56
3.4.5. Equipos y programas utilizados para el análisis de células mediante citometría de flujo	56
3.5. Ligandos de los TLRs	57
3.6. Medida de la proliferación celular	58
3.7. Obtención de una línea celular a partir de retinas de ratón adulto	58
3.8. Obtención de neuroesferas	59
3.9. Aislamiento de ARNm y PCR	60
3.10. Oligonucleótidos	61
3.11. Análisis de expresión de proteínas mediante Western blot.	63
3.12. Ensayos de inmunocitoquímica	65
3.13. Medida del calcio intracelular	66
3.14. Estudio del efecto de toxinas de los canales de sodio dependientes de voltaje sobre la viabilidad celular	67
3.15. Determinación de la producción de TNF- α <i>in vitro</i>	67
3.16. Ensayo de la actividad de agentes antioxidantes y antiapoptóticos sobre la viabilidad de células MU-PH1 sometidas a estrés oxidativo	68
3.17. Análisis estadístico de los resultados	69
3.18. Medios de cultivo y soluciones	69
4. RESULTADOS	73
4.1. IDENTIFICACIÓN DE POBLACIONES DE CÉLULAS MADRE EN RETINA DE RATONES ADULTOS	74
4.1.1. Identificación de células madre con el fenotipo "Side Population"	74

4.1.2.	Identificación de células madre mediante la detección del antígeno Sca-1	75
4.2.	ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y FUNCIONALIDAD DE RECEPTORES TIPO TOLL EN LAS POBLACIONES DE CÉLULAS Sca-1⁺ CD45⁻ IDENTIFICADAS	77
4.2.1.	Estudio de la expresión de TLR2 en las células Lin ⁻ Sca-1 ⁺ CD45 ⁻ en retina de ratón adulto	78
4.2.2.	Estudio de la funcionalidad de TLR2 en células Lin ⁻ Sca-1 ⁺ CD45 ⁻ en retina de ratón adulto	81
4.2.2.1.	Estudio en células en cultivo durante una semana	81
4.2.2.2.	Estudio en células en cultivo durante dos semanas	83
4.3.	AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS Lin⁻ Sca-1⁺ CD45⁻..	86
4.4.	ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD DE LOS RECEPTORES TIPO TOLL EN LAS CÉLULAS AISLADAS Lin⁻ Sca-1⁺ CD45⁻	88
4.4.1.	Estudio del efecto de la activación de TLRs sobre la proliferación celular	88
4.4.2.	Estudio del efecto de la activación de TLRs en la expresión de Sca-1, TLR2 y CD11b	89
4.5.	OBTENCIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR A PARTIR DE CÉLULAS PROGENITORAS DE RETINA ADULTA	93
4.6.	CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR MU-PH1	94
4.6.1.	Estudio de la pérdida de diferenciación: formación de neuroesferas	95
4.6.2.	Estudio de la expresión de marcadores celulares y proteínas relacionadas con la visión	96
4.6.2.1.	Estudio de la expresión de marcadores celulares mediante RT-PCR	96
4.6.2.2.	Estudio de la expresión de marcadores celulares mediante Western blot	97
4.6.2.3.	Estudio de la expresión de marcadores celulares mediante inmunofluorescencia	98
4.6.3.	Estudio de la expresión de otras proteínas no relacionados con la visión	100
4.6.3.1.	Expresión de receptores de melatonina	100
4.6.3.2.	Expresión de canales de sodio dependientes de voltaje	102
4.6.4.	Estudio de la sensibilidad a la luz	104

4.7.	EXPRESIÓN Y FUNCIONALIDAD DE RECEPTORES TIPO TOLL EN LA LÍNEA CELULAR MU-PH1	105
4.7.1.	Estudio de la expresión de receptores tipo Toll en la línea celular MU-PH1	105
4.7.2.	Estudio de la funcionalidad de receptores tipo Toll en la línea celular MU-PH1	106
4.7.2.1.	Estudio del aumento de la expresión de TLRs en respuesta a la activación por MAMPs	106
4.7.2.2.	Estudio del efecto de la estimulación de los TLRs de las células MU-PH1 sobre la proliferación celular	107
4.7.2.3.	Estudio del efecto de la estimulación de los TLRs en las células MU-PH1 sobre la diferenciación celular	110
4.7.2.4.	Producción de citocinas: implicación de los TLRs de las células MU-PH1 en la respuesta inmunitaria	110
4.8.	UTILIZACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR MU-PH1 COMO MODELO DE CRIBADO DE COMPUESTOS NEUROPROTECTORES	112
4.8.1.	Estudio de la sensibilidad de la línea MU-PH1 a distintos estímulos nocivos	112
4.8.2.	Estudio del efecto neuroprotector de sustancias antioxidantes en la línea MU-PH1	113
5.	DISCUSIÓN	117
6.	CONCLUSIONES	129
7.	ABREVIATURAS	131

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

La función del ojo es percibir y captar la luz del exterior, de manera que una vez percibida, pueda ser procesada y enviada al cerebro donde se forma la imagen. Para realizar esta función, el globo ocular dispone de un sistema óptico que va enfocando la imagen, la cual se proyecta sobre una capa sensible que es la que finalmente procesa y emite dicha señal. Esta capa sensible es la retina y es la capa más importante para la visión. La degeneración de la retina, debido a enfermedades o a lesiones, es la causa más común de ceguera irreversible en el mundo desarrollado (Cuenca et al., 2014; Singh and MacLaren, 2011).

1.1. EL GLOBO OCULAR

El ojo es un órgano esférico alojado en el cráneo, dentro de una cavidad ósea denominada órbita, que protege al globo ocular de los impactos. Entre el ojo y la órbita se encuentran: **El saco lacrimal**, que secreta el líquido lacrimal, **los músculos extraoculares**, seis músculos extrínsecos encargados de la motilidad ocular, **tejido adiposo** que actúa como almohadilla, **la arteria central de la retina** que es una rama colateral de la arteria oftálmica e irriga el globo ocular y **el nervio óptico** o II par craneal que es un nervio sensitivo encargado de transmitir la información visual al cerebro (Fig. 1.1) (Derrickson, 2011).

El globo ocular está compuesto por una cubierta llamada **conjuntiva** y tres capas esféricas, cada una de las cuales cumple una función distinta. Estas capas forman la pared del globo ocular y en su interior hay líquido a presión y una estructura lenticular transparente llamada **crystalino** que separa dos cavidades. (Fig 1.1). **El humor acuoso** es el líquido que ocupa el segmento anterior del globo ocular y **el humor vítreo**, el líquido que ocupa el segmento posterior del

globo ocular.

1. **LA CAPA EXTERNA** o capa fibrosa, está formada por **la córnea** y **la esclerótica**. Tienen la función de proteger el contenido ocular y mantener la forma del globo ocular. Ofrecen, además, una superficie para la inserción de los músculos extraoculares.
2. **LA CAPA MEDIA** es una capa vascular de la cual depende el metabolismo de las capas externa e interna. Por su color, a esta capa se le denomina úvea, y por las diferenciaciones que presenta, podemos reconocer en ella tres regiones: el iris, el cuerpo ciliar y la coroides. **El iris** es una membrana delicada, fina y pigmentada. Tiene un orificio central llamado **pupila** cuya función es regular la cantidad de luz que pasa. **El cuerpo ciliar** se extiende desde la base del iris hasta el final de la coroides, la *ora serrata*. Está constituido por dos partes: la *pars plicata* que contiene los procesos ciliares y la *pars plana* en la que se encuentra el músculo ciliar. **La coroides** está formada por vasos sanguíneos y su función principal es nutrir y recoger los productos de desecho (Fig. 1.1).
3. **LA CAPA INTERNA** del globo ocular es **la retina**. Aunque todas las partes del ojo son necesarias para percibir una buena imagen, esta es la capa más importante para la visión. La retina es esencialmente una extensión del sistema nervioso central (SNC) que recibe la estimulación directa de la luz y genera impulsos nerviosos que son transmitidos al cerebro para su interpretación (Alm, 2004; Derrickson, 2011; Karl and Reh, 2010).

Al final de la tercera semana del desarrollo embrionario comienzan a desarrollarse los ojos a ambos lados del prosencéfalo como vesículas ópticas:

1. La retina, el nervio óptico, los músculos, el epitelio del iris, y el cuerpo ciliar derivan todos ellos del neuroectodermo del cerebro anterior.
2. El cristalino, el epitelio de las glándulas lacrimales, los párpados, la conjuntiva y la córnea surgen del ectodermo superficial.
3. Los músculos extraoculares, el tejido conectivo y vascular de la córnea, el iris, el cuerpo ciliar, la coroides y la esclerótica tienen su origen en el mesodermo (Gilbert, 2005).

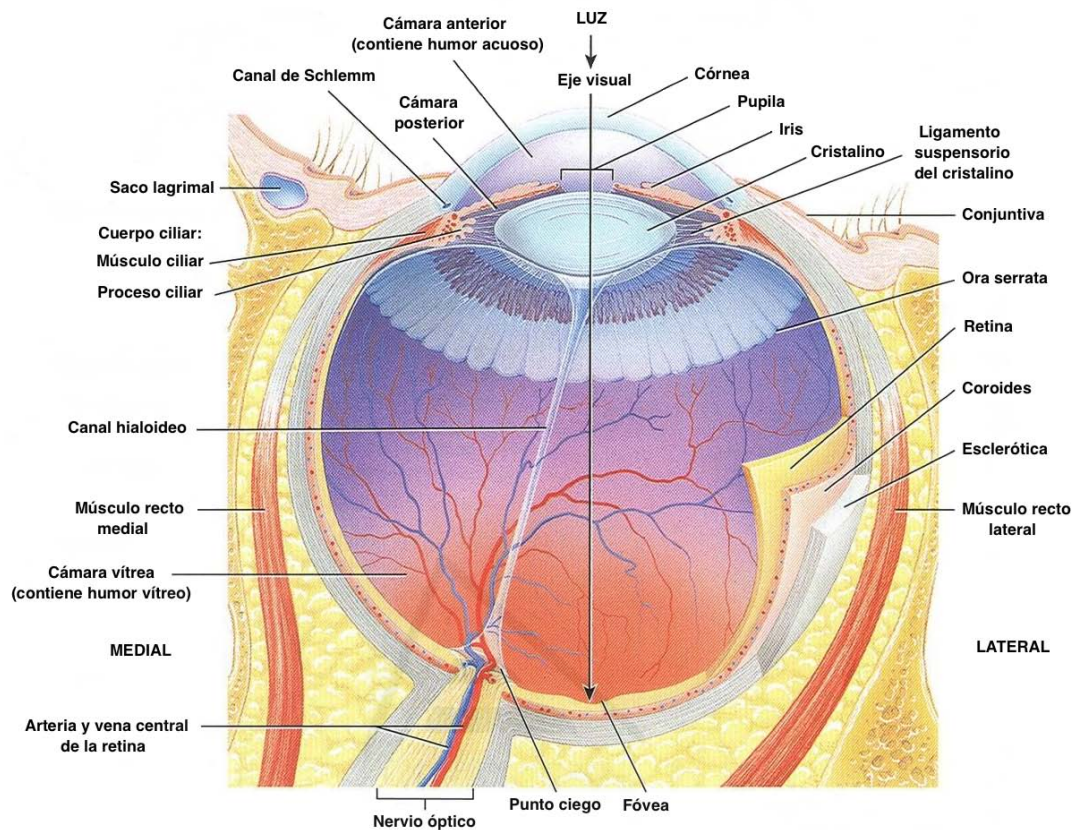


Figura 1.1: Corte transversal del globo ocular humano. El eje visual corresponde al trayecto seguido por los rayos luminosos provenientes de un objeto enfocado con la mirada, pasando por el punto nodal del cristalino hasta la fóvea. Modificada a partir de: Derrickson (2011).

1.2. LA RETINA

La retina es una lámina translúcida de tejido nervioso que tapiza la parte posterior del globo ocular llegando hasta la *ora serrata* (Fig. 1.2). Es la capa encargada de procesar la información visual (Cuenca et al., 2014; Lledó Riquelme et al., 2010).

Cuando realizamos una sección vertical de la retina y la observamos al microscopio, resulta evidente que la retina es una estructura muy compleja que contiene muchos elementos aunque tiene una arquitectura común en todas las especies (Fig. 1.2) tanto en mamíferos como en no mamíferos (Karl and Reh, 2010).

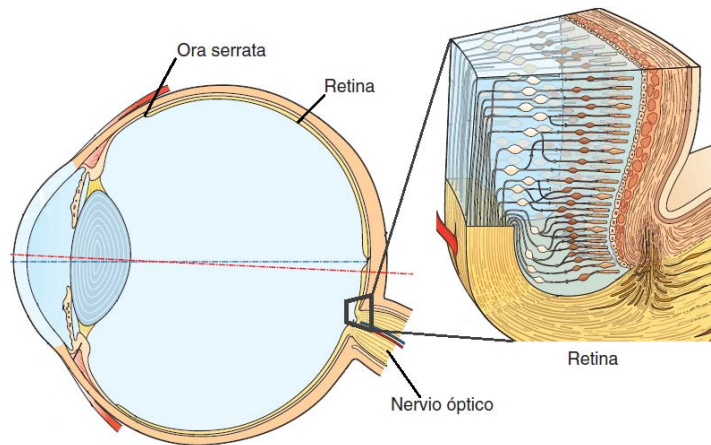


Figura 1.2: Corte transversal del globo ocular humano. Ampliación de la estructura de la retina.

1.2.1. Estructura de la retina

La retina humana tiene un diámetro total aproximadamente de 42 mm. En el centro de la retina se encuentra un área de forma circular u oval que mide aproximadamente 2×1.5 mm. Esta zona se denomina papila y corresponde a la salida del nervio óptico y al paso de los vasos sanguíneos que llegan a la retina (arteria central de la retina). A unos 17 grados ($4.5-5$ mm) a la derecha de la papila se encuentra una zona también ovoidea, con una coloración rojiza, que carece de vasos sanguíneos y se denomina fovea. Es a este nivel donde se enfocan los rayos luminosos y se consigue la máxima agudeza visual. Se denomina región central de la retina a la porción de la retina que se encuentra alrededor de la fovea (unos 6 mm alrededor de la fovea). El resto es retina periférica y llega hasta 0.5 mm de la *ora serrata* (que está a unos 21 mm desde el centro de la papila). La retina se divide en dos partes (Derrickson, 2011; Karl and Reh, 2010; Kolb and Dekorver, 1991; Lledó Riquelme et al., 2010; Polyak, 1941; Van Buren, 1963):

1. El **epitelio pigmentario** → Es la porción más externa y está formado por una sola capa de células. Capta, almacena, distribuye y metaboliza todos los pigmentos visuales fagocitando los discos membranosos más externos de los fotorreceptores durante el ciclo diurno. Constituye la barrera hemato-ocular, que controla el paso de nutrientes de la coroides

hacia la retina neurosensorial, manteniendo concentraciones apropiadas para la fisiología neural.

2. La **retina neurosensorial** → Es un complejo circuito neural situado en la porción más interna. Está compuesta por 3 capas que contienen los cuerpos neuronales y 2 capas de conexiones sinápticas denominadas plexiformes. Es responsable de la fototransducción de la luz: conversión de la energía de la luz en un patrón de impulsos eléctricos que informan al cerebro, por medio del nervio óptico, de las imágenes visuales.

1.2.2. Organización histológica de la retina

1.2.2.1. Células de la retina

El epitelio pigmentario está formado por una sola capa de células que tienen melanina y absorben la luz que les llega.

La retina neurosensorial está formada por distintas clases de células y a su vez, cada una de ellas con distintos subtipos ([Derrickson, 2011](#); [Karl and Reh, 2010](#); [Lledó Riquelme et al., 2010](#); [Marc, 2008](#)):

1. Seis tipos de **NEURONAS**:
 - a) **Sensibles a la luz** que captan en primer lugar la señal luminosa:
 - Conos (visión de colores durante el día)
 - Bastones (sensores de luz baja)
 - b) **Interneuronas** que procesan la señal de los fotorreceptores:
 - Células horizontales
 - Células bipolares
 - Células amacrinas
 - Células ganglionares (las células ganglionares que expresan melanopsina son también sensibles a la luz)
2. Tres tipos de **CÉLULAS GLIALES**:
 - a) Microglía
 - b) Macroglía:
 - Células de Müller
 - Astroglía

1.2.2.2. Capas de la retina

En todos los vertebrados, la retina se describe de forma tradicional constituida por 10 capas, donde se distribuyen las distintas células, nueve constituyen la retina sensorial y la décima es el epitelio pigmentario (Karl and Reh, 2010; Marc, 2008). Las diez capas de la retina, numeradas desde el lado más externo, el epitelio pigmentario (Fig. 1.3), son:

1. **Epitelio pigmentario** (RPE, del inglés *Retinal Pigment Epithelium*).
2. **Capa de segmentos** internos y externos de bastones y conos (OSL, del inglés *Outer Segments Layer*).
3. **Membrana limitante externa** (OLM, del inglés *Outer Limiting Membrane*).
4. **Capa nuclear externa** (ONL, del inglés *Outer Nuclear Layer*), que contiene los cuerpos celulares y terminaciones sinápticas de los conos y bastones.
5. **Capa plexiforme externa** (OPL, del inglés *Outer Plexiform Layer*), donde contactan los conos y bastones con las dendritas de las células bipolares y las células horizontales.
6. **Capa nuclear interna** (INL, del inglés *Inner Nuclear layer*), que contiene los cuerpos celulares de las células horizontales, bipolares y amacrinas.
7. **Capa plexiforme interna** (IPL, del inglés *Inner Plexiform Layer*), donde se produce la segunda sinapsis de la vía vertical de la retina. Aquí contactan los axones de las células bipolares con las dendritas de las células ganglionares. Además a este nivel, terminan gran cantidad de prolongaciones de las células amacrinas.
8. **Capa de células ganglionares** (GCL, del inglés *Ganglion Cell Layer*), que contiene los cuerpos celulares de estas células ganglionares, además de los de algunas células amacrinas desplazadas.
9. **Capa de fibras nerviosas** (OFL, del inglés *Outer Fiber Layer*).
10. **Membrana limitante interna** (ILM, del inglés *Inner Limiting Membrane*).

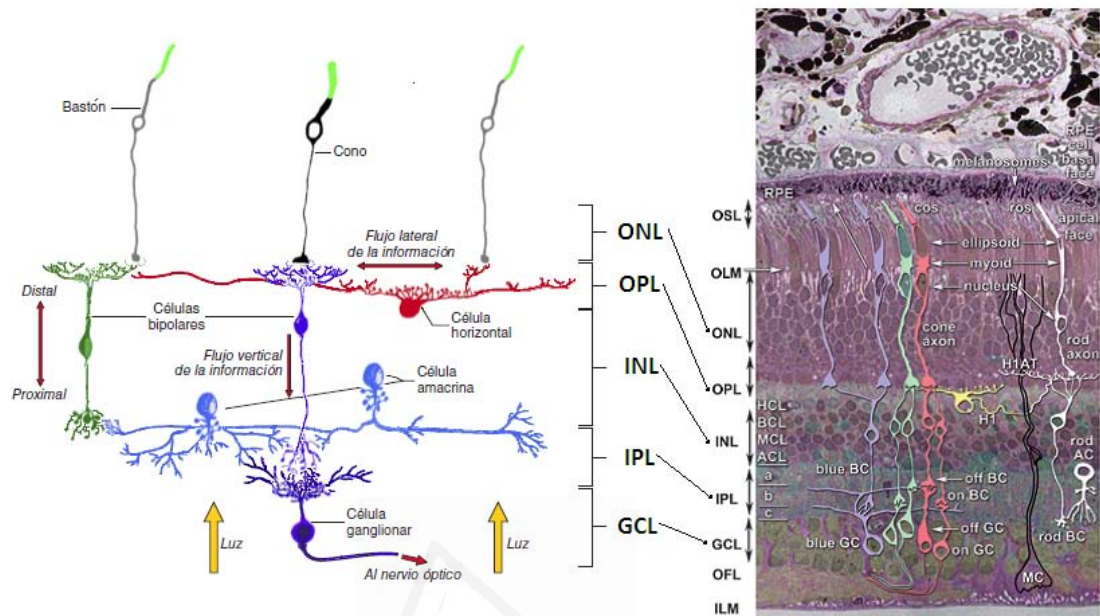


Figura 1.3: Distribución de las células retinianas responsables de la codificación visual en las distintas capas de la retina. Modificada a partir de: Marc (2008).

La luz entra al ojo a través de la córnea, atraviesa la cámara anterior, el cristalino, el humor vítreo y llega a la retina. Una vez aquí debe atravesar todas las capas de la retina hasta llegar a la capa donde se encuentran los elementos fotosensibles: conos y bastones óptimamente orientados para detectar la incidencia de los fotones (Fig. 1.4).

Los fotorreceptores, que son el primer nivel neuronal, son neuronas fotosensibles que detectan cambios en la intensidad de la luz y se hiperpolarizan al recibir la energía de un estímulo luminoso. Esta hiperpolarización es una respuesta eléctrica que se constituye en un impulso nervioso. Esta señal eléctrica se envía a través de las terminaciones sinápticas de conos y bastones que conectan con interneuronas que codifican aun más las señales eléctricas. Este proceso permite el reconocimiento de formas, tamaños, colores y movimientos. El segundo nivel neuronal está constituido por las células horizontales y células bipolares. Asimismo, existe un tercer nivel neuronal que recoge todos estos impulsos modificados por las células bipolares, son las células amacrina que procesan las señales de nuevo. Por último, las células ganglionares transmiten las señales eléctricas mediante sus axones, el conjunto de los cuales conforma el nervio óptico que sale de cada ojo (Fig 1.4).

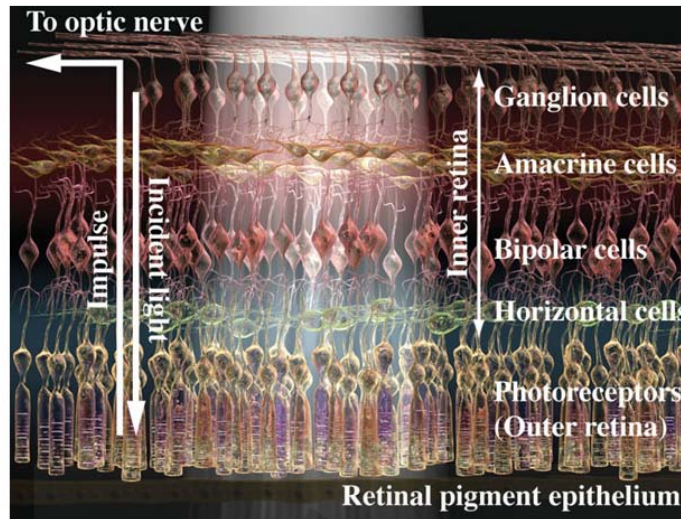


Figura 1.4: *Capas de una retina humana sana. Los fotorreceptores están orientados de manera óptima para detectar la incidencia de fotones. Su extremo exterior sensible a la luz está adosado al epitelio pigmentario retiniano y su extremo interior especializado para realizar la transmisión sináptica, conectado a neuronas de segundo orden en la retina interna. Con la entrada de luz en las capas de la retina, los fotorreceptores se estimulan generando impulsos que son procesados por las células de la retina interna y luego transmitidos al cerebro a través del nervio óptico (Singh and MacLaren, 2011).*

La información visual recibida por los fotorreceptores y codificada por las interneuronas retinianas es transmitida a áreas específicas del cerebro por los axones de las células ganglionares a través del nervio óptico. El nervio óptico deja la cavidad orbitaria a través del canal óptico para unirse con el nervio contralateral y conformar el quiasma óptico hasta el siguiente núcleo de la vía visual, el núcleo geniculado lateral. Los axones de las neuronas del cuerpo geniculado lateral, terminan sinaptando con las neuronas de la corteza visual primaria, en el tálamo (Lopez and York, 2006). La sensación visual se produce cuando los impulsos llegan a la corteza visual en el lóbulo occipital (Singh and MacLaren, 2011).

1.2.2.3. Fotorreceptores

Los fotorreceptores son elementos fotosensibles de la retina. En todos los grupos de vertebrados existen dos tipos de fotorreceptores que se clasifican según la morfología del segmento externo, si es corto y de forma cónica se de-

nominan **conos**, y si es más largo y cilíndrico **bastones** (Marc, 2008) (Fig. 1.5).

La estructura del fotorreceptor comprende varias partes principales: el segmento externo y el segmento interno, un cuerpo celular, un axón y un terminal axónico. El segmento externo tiene forma cilíndrica y está conectado con el segmento interno por un delgado cilio. Contiene discos densamente empaquetados, formados por invaginaciones de la membrana plasmática en los conos, y discos superpuestos a modo de pila de monedas y recubiertos por la membrana plasmática en los bastones. El segmento interno contiene los orgánulos subcelulares típicos, incluidos el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi en una zona denominada mioide, y un gran cúmulo de mitocondrias debajo del segmento externo en una zona denominada elipsoide, así como un cuerpo sináptico, localizado en el extremo más interno de dicho segmento que establece contacto sináptico con las células bipolares y horizontales de la retina. El terminal axónico, denominado esférula en los bastones y pedículo en los conos, contiene una gran cantidad de vesículas sinápticas, de forma que los neurotransmisores almacenados en ellas son liberados a la hendidura sináptica (Lledó Riquelme et al., 2010). Aunque los somas celulares de conos y bastones se localizan en la ONL y sus segmentos internos y externos se proyectan dentro del espacio subretiniano hacia el epitelio pigmentario, se distribuyen de manera distinta en el espesor de la capa. Mientras que los núcleos de los conos se sitúan formando una monocapa, alineados justo por debajo de la OLM, los cuerpos celulares de los bastones constituyen el resto de la ONL formando varias capas (Kolb et al., 2001).

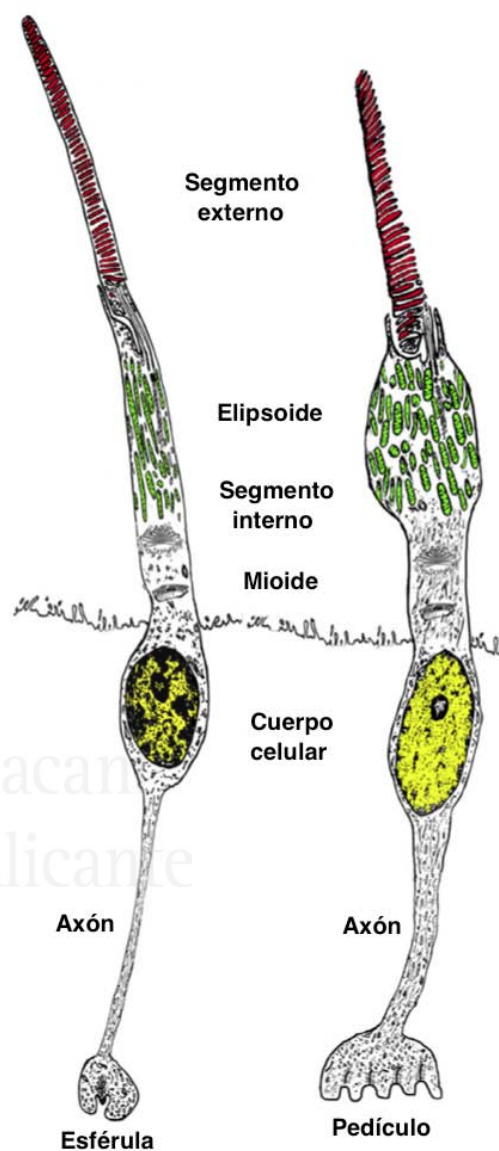


Figura 1.5: Fotorreceptores de vertebrados (Cuenca et al., 2014).

INTRODUCCIÓN

Los conos y bastones constituyen sistemas diferentes en la recepción de la señal luminosa. Los bastones contienen rodopsina y son responsables de la visión escotópica, sensibles únicamente en condiciones de baja luminosidad. A partir de cierto nivel de iluminación, los bastones se saturan e intervienen los conos, capaces de registrar cambios rápidos de la intensidad de luz, permitiendo la visión en color (Kolb et al., 2001). Mientras que los bastones forman un sólo tipo morfológico y funcional, los conos contiene opsinas y existen distintos tipos de conos según la opsina que poseen.

El número y naturaleza de los pigmentos visuales expresados en los fotorreceptores varía considerablemente entre diferentes especies. La mayoría de los mamíferos tienen dos tipos de conos (cono rojo y cono azul) pero en el caso de los primates existen tres tipos de conos que dan lugar a la visión tricromática: rojos, verdes y azules (Kolb et al., 2001). Los pájaros diurnos y los reptiles expresan cinco tipos de opsinas en los diferentes fotorreceptores, una en bastones y las otras cuatro en los conos, dando visión tetracromática. En el caso de los teleósteos existe mucha más variabilidad, ya que se han adaptado prácticamente a todos los hábitats acuáticos y la importancia de la visión cromática dependerá del ambiente y de su ciclo vital. Podemos encontrar visión monocromática en peces abisales, dicromática en peces de aguas turbias, tricromática en peces de arrecifes coralinos e incluso tetracromática para los peces de aguas dulces cristalinas (Goldsmith, 1980; Hughes et al., 1998; Robinson et al., 1993).

Estudios fotométricos y fisiológicos han demostrado que en la retina humana existen tres tipos de conos que dan lugar a la visión tricromática. El sistema de nomenclatura más utilizado es el RGB (rojo, verde, azul), pero existe también el sistema LMS (onda larga, media y corta). El sistema RGB hace alusión a los espectros de percepción (rojo, verde, azul) y el LMS a los picos espectrales de absorción de los pigmentos visuales (amarillo-verde, verde, violeta) (Marc, 2008).

Siguiendo la terminología tradicional de la fisiología, el SNC de primates muestra una visión tricromática RGB, con tres picos de percepción, representados por las tres clases de conos (Marc, 2008):

1. Conos rojos → Presentan una sensibilidad máxima para las longitudes de onda más largas: 610 nm (rojo anaranjado).
2. Conos verdes → Presentan mayor sensibilidad a las longitudes de onda medias: 535 nm (verde).
3. Conos Azules → Presentan mayor sensibilidad a las longitudes de onda

más cortas: 430 nm (azul).

Por el contrario, los bastones forman un sólo tipo morfológico y funcional de fotorreceptor, presentando un pico de mayor sensibilidad hacia la longitud de onda de los 500 nm (luz verde azulada) y son responsables de la visión en blanco y negro. Así la retina humana sólo es capaz de detectar una pequeña parte del espectro electromagnético, longitudes de onda comprendidas entre los 400-700 nm.

En muchas especies los conos se concentran en regiones especializadas para conseguir una mayor agudeza visual y apreciación del color, esta región se denomina fovea (Kolb et al., 2001). En el centro de la fovea se encuentra la foveola de aproximadamente 0,35 mm de diámetro. La estructura de la foveola es diferente de la del resto de la retina y consiste en una capa única que contiene sólo conos. Alrededor de la fovea, en el área parafoveal entre la capa de fotorreceptores y la OPL, los axones de los conos de la fovea están dispuestos oblicuamente y constituyen una región anatómica llamada capa de fibras Henle, que no está presente en la retina periférica (Cuenca et al., 2014).

En la fovea de primates, los conos predominantes son los sensibles a la luz verde y a la luz roja. No hay conos sensibles al azul en la región central de la fovea, si bien alcanzan su máxima abundancia en sus pendientes. Los conos sensibles al verde y al rojo, en el resto de la retina, se mantienen espaciados de forma homogénea y están rodeados por anillos de bastones. Los conos sensibles al azul están separados de manera más irregular (Curcio et al., 1987; Marc and Center, 2011; Osterberg, 1935).

En términos cuantitativos en la retina podemos encontrar en total 6,5 millones de conos y 120 millones de bastones. La mayor densidad de conos se concentra a nivel de la fovea (160.000 conos/mm²), decreciendo su número conforme nos alejamos de la misma hasta una densidad más o menos uniforme en la retina periférica (5.000 conos/mm²). Fuera de la fovea predominan los bastones cuya densidad máxima se alcanza en un anillo a unos 4,5 mm (140.000 bastones/mm²), que corresponde a unos 20 grados desde la fovea. En la papila óptica no hay fotorreceptores, es el llamado punto ciego de la retina (Marc, 2008).

1.2.2.4. Células horizontales

Las células horizontales son neuronas de interconexión lateral que se encuentran en la OPL. Contribuyen a integrar y regular los impulsos de entrada

enviados por las células fotorreceptoras. Permiten el cruce entre células fotorreceptoras vecinas, haciendo que estas células puedan comparar la luz que perciben, un proceso necesario para poder ver las imágenes, ya que permite a nuestro cerebro poder ver líneas y contornos. Esto se lleva a cabo gracias a los mecanismos de inhibición lateral de las células horizontales.



Cuenca et al., 2014

Si la retina simplemente transmitiera las imágenes directamente desde los fotorreceptores al cerebro, la visión resultante probablemente sería de grano grueso y borrosa. El procesamiento en la retina define y precisa los bordes de las imágenes y nos permite apreciar los detalles finos.

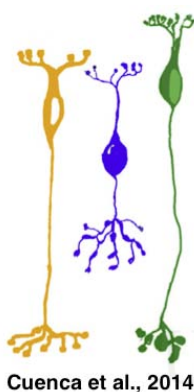
El perfeccionamiento de la imagen comienza en el primer nivel sináptico de la retina, donde las células horizontales reciben las señales de los fotorreceptores. Cada célula horizontal recibe la entrada de muchos fotorreceptores, por lo que su área de recolección o campo receptivo es grande. Este campo se vuelve aún más amplio debido a que las membranas plasmáticas de las células horizontales se fusionan con las de las vecinas. Los potenciales de membrana de toda una lámina de células se convierte en el mismo; en consecuencia, las células horizontales responden a la luz en un área muy grande (Kolb, 2003).

Las células horizontales modulan la señal de los fotorreceptores bajo diferentes condiciones de iluminación, dando mayor o menor sensibilidad a zonas con luz brillante con luz tenue y a su vez, impiden que la señal excitadora se disemine en una amplia zona de la retina. En la zona limítrofe entre la iluminación y la oscuridad, las diferencias de polarización de las membranas de los fotorreceptores son máximas. Las células horizontales aumentan el contraste entre las dos zonas, facilitando la distinción de los contornos (Marc, 2008; Marc and Center, 2011; Vicario, 1999).

1.2.2.5. Células bipolares

Se trata de neuronas que disponen de dos terminaciones, una dendrita y un axón. La dendrita las conecta con las células fotorreceptoras y producen la dicotomía funcional esencial de todas las retinas de vertebrados: canales "ON" y "OFF", mientras que el axón sirve para realizar la conexión con la capa celular más interna de la retina formada por las células ganglionares (Kolb, 2003; Marc and Center, 2011; Wässle, 2004).

La información visual que se transfiere de los fotorreceptores a las células bipolares se separa en dos vías paralelas, llamadas respectivamente vía "centro-ON" y vía "centro-OFF". Se ha visto que la respuesta al potencial de membrana que provoca la incidencia de la luz en una parte de su campo receptor es opuesta a la que provoca la luz en la otra parte del mismo. Las células bipolares poseen campos receptores centro-periféricos antagónicos. Así, podemos tener una célula bipolar en la que la iluminación en el centro de su campo receptor provoca una despolarización (respuesta "centro-ON"). En cambio, si la iluminación se produce en la periferia provoca una hiperpolarización (respuesta "centro-OFF"). Estas vías paralelas de canales visuales de una imagen son fundamentales para la visión en los vertebrados ya que permiten percibir el contraste entre las imágenes y sus orígenes. Por ejemplo, leemos letras negras en un fondo blanco utilizando los canales "centro-OFF" en la retina (Kolb, 2003).



Cuenca et al., 2014

Además, las células horizontales también modulan transversalmente el efecto que el glutamato liberado por los fotorreceptores ejerce sobre las células bipolares. Como se ha comentado anteriormente, las células horizontales responden a la luz sobre un área muy grande, mientras que una sola célula bipolar recibe la entrada de unos pocos fotorreceptores y por lo tanto tiene un campo receptivo de tamaño medio. Considerando que una sola célula bipolar con su respuesta "ON" - "OFF" transmitiría una imagen bastante borrosa a su célula ganglionar, las células horizontales añaden una señal que es espacialmente restrictiva, dando a la célula bipolar lo que se conoce como una organización envolvente central. Las células horizontales añaden una señal también "ON" - "OFF" más general, acumulan información a partir de un amplio campo de fotorreceptores transmitiendo una señal inhibitoria directamente a la señal de la célula bipolar o retroalimentando de nuevo a los fotorreceptores, información que luego transmitirán ellos hacia las células bipolares que están en contacto directo con dichos fotorreceptores (Kolb, 2003).

Los fotorreceptores situados en el centro del campo receptivo hacen sinapsis con células bipolares que entran en contacto directo con células ganglionares. Los estímulos provenientes de los conos localizados en la periferia de los campos receptivos son en cambio conducidos a lo largo de las vías colaterales que pasan a través de las células horizontales y las células amacrinas. Los cam-

INTRODUCCIÓN

pos receptivos de cada neurona bipolar se organizan en unidades concéntricas, donde la parte central (centro) recibe aferencias directas de los fotorreceptores y la periferia de las células horizontales (marco) (Marc, 2008). Las células horizontales pueden incluso crear en la respuesta de las células bipolares un código de colores, todo ello a través de los circuitos de retroalimentación con los fotorreceptores (Kolb, 2003).

En retina de primates se han encontrado al menos 10 clases distintas de células bipolares ("ON" y "OFF") y pueden contactar con todos los tipos de conos, sólo con conos rojos y verdes, con conos rojos o conos verdes, con conos azules o sólo con bastones (Marc, 2008).

1.2.2.6. Células amacrinas



Cuenca et al., 2014

Las células amacrinas son el grupo más diverso de neuronas de la retina (Vaney, 2004), con más de 70 clases en peces teleósteos (Wagner and Wagner, 1988) y más de 22 clases en mamíferos (Kolb, 2003; Macneil et al., 1999). La mayoría de células amacrinas, por definición, carecen de axones clásicos y realizan su función por medio de circuitos locales, a través de la sinapsis de sus dendritas. Las células amacrinas presentan diversas morfologías dependiendo de la extensión lateral de sus dendritas que van desde estrechas (menor de 100 μm), tamaño medio (entre 100 y 200 μm) y tamaño grande (mayores de 200 μm , con algunas células mayores de 1 μm) (Macneil et al., 1999).

Estas células presentan gran diversidad tanto en su morfología como en su neuroquímica. La cifra exacta sigue siendo incierta, pero alrededor de dos tercios de las células amacrinas utilizan como transmisor el GABA y el resto la glicina. Con frecuencia, la mayoría de células amacrinas GABA liberadoras, también liberan al medio otras sustancias neuroactivas (Kolb, 2003; Marc, 2004). Estas células tienen un cuerpo celular situado en la INL y unas prolongaciones que se extienden por la IPL. No reciben conexiones directas de los fotorreceptores, sino sólo de las células bipolares y de otras células amacrinas, estableciendo a su vez conexiones con células ganglionares y retroalimentando también a las células bipolares (Marc, 2008).

Todas ellas modulan señales en la IPL y forman la vía de asociación lateral a nivel de esta capa. Las células ganglionares tienen un campo receptivo organi-

zado en círculos concéntricos. El circuito de células amacrinas en el interior de la IPL transmite información adicional a las células ganglionares, posiblemente para perfeccionar el límite entre el centro y el marco, incluso más allá de la realizada por las células horizontales (Kolb, 2003).

Mientras que los conos se conectan a una vía directa desde las células bipolares a las células ganglionares, las células bipolares de bastones no establecen sinapsis directa con las células ganglionares, sino a través de una sinapsis previa con dos tipos de células amacrinas (Kolb, 2003; Vicario, 1999). Las células amacrinas AI (Amacrina recíproca, también conocida como A17), que establecen retroalimentación con la propia célula bipolar y las células amacrinas AII. Las células bipolares conectadas a bastones son únicamente de un tipo, solamente transmiten la señal "ON" y utilizan como células amacrinas intermedias las células AII y A17 para llevar las señales a las células ganglionares. La célula AII recoge la señal de aproximadamente 30 células bipolares de bastones y transmite una señal tanto "ON" a una célula ganglionar "ON" como una señal "OFF" a una célula ganglionar "OFF". La célula amacrina A17 recoge la señal de miles de células bipolares conectadas a bastones. Esta célula amacrina, de alguna manera, amplifica y modula la información de las células bipolares para transmitirla a las células AII. El proceso no es totalmente conocido pero en cualquier caso, esta vía está claramente diseñada para recoger y amplificar vestigios de luz para la visión nocturna (Kolb, 2003).

1.2.2.7. Células ganglionares



Cuenca et al., 2014

Las células ganglionares forman sinapsis a nivel de la IPL con las terminaciones de las células bipolares y las células amacrinas. Las cifras exactas no se conocen, pero claramente aparecen en un número superior a 15 e incluso puede superar los 20 tipos (Dacey et al., 2003; Kolb, 2003; Yamada et al., 2005). No se han establecido muchas homologías exactas entre ellas en mamíferos, pero hay algunos aspectos básicos comunes en su estructura. Casi todas las células ganglionares tienen un cuerpo celular voluminoso y ramificaciones dendríticas que muestran una gran variedad de patrones, que van desde un patrón estrecho de campo grande muy ramificado y compacto a patrones laminares, estrechos y estratificados o biestratificados y en última instancia con laminaciones difusas (Marc, 2008).

Las células ganglionares no tienen ningún contacto presináptico, son neuro-

INTRODUCCIÓN

nas puramente postsinápticas desde la perspectiva de la sustancia neuroquímica que poseen, decodifican señales de células bipolares (receptores AMPA y subtipos de NMDA) y señales de células amacrinas (receptores GABA y glicina) (Marc, 2004; Marc and Jones, 2002). Cada célula ganglionar de la retina genera un único axón que se sitúa a nivel de la capa de las fibras del nervio óptico y sólo se mieliniza a nivel del nervio óptico, por fuera ya del globo ocular. Este axón llega hasta el cuerpo geniculado externo, donde ocurre la siguiente sinapsis de la vía visual (Marc, 2008).

Las células ganglionares tienen un campo receptivo organizado en círculos concéntricos. En retinas de humanos se observan dos tipos básicos de células ganglionares "centro-ON" y "centro-OFF" y son la salida principal de la retina a los centros visuales del cerebro. Las células ganglionares "centro-ON" se activan cuando un punto de luz cae en el centro de su campo receptivo y se inactivan cuando la luz cae sobre la periferia del campo (respuesta "centro-ON" - "periferia-OFF"). Las células ganglionares "centro-OFF" reaccionan de manera opuesta, su actividad aumenta cuando la periferia de su campo receptor está encendido y disminuye cuando la luz incide en el centro del campo (respuesta "centro-OFF" - "periferia-ON") (Kolb, 2003).

En contraste con el resto de la retina, la fovea humana contiene células ganglionares conectadas en una relación de uno a uno con células bipolares. Esta vía lleva la información de un cono único, transmitiendo así la imagen de un único punto de la fovea al cerebro. Cada cono puede transmitir una señal "ON" o una señal "OFF". La señal que va al cerebro lleva información espacial y espectral de alta resolución.

1.2.2.8. Células del epitelio pigmentario



Cuenca et al., 2014

El epitelio pigmentario de la retina (RPE) se encuentra entre la coroides y la retina neural. Es una monocapa de células epiteliales

pigmentadas que individualmente presentan forma hexagonal y están dispuestas en la monocapa de forma columnar. Está flanqueada por la membrana de Bruch en su superficie basal, y por los segmentos externos de los fotorreceptores en su porción apical. Las células en esta capa están conectadas por uniones estrechas y constituyen los componentes exteriores de la barrera hemato-retiniana (Nag and Wadhwa, 2012; Spitznas, 1973).

En el espacio subretiniano, se encuentra la matriz interfotorreceptores y las microvellosidades de las células del RPE, opuestas a los segmentos externos de los fotorreceptores, formando los componentes físicos que pueden contribuir, entre otras cosas, al mantenimiento de la adhesión de la retina (Nag and Wadhwa, 2012).

El RPE tiene varias funciones fisiológicas que son indispensables para la supervivencia de las neuronas de la retina, (Strauss, 2005; Sun et al., 2003; Taylor, 2012; Urtubia Vicario, 2007), proporcionando apoyo metabólico y funcional a los fotorreceptores mediante:

1. Transporte de nutrientes como glucosa, retinol y ácidos grasos hacia los fotorreceptores, ya que no tienen suministro propio de sangre y los nutrientes deben viajar desde los capilares de la coroides a los fotorreceptores, a través de la membrana de Bruch y del RPE
2. Transporte activo de iones conservando la composición adecuada en el espacio subretiniano para mantener la excitabilidad de los fotorreceptores.
3. Transferencia de productos metabólicos finales del espacio subretiniano a la sangre. El camino seguido para la eliminación de restos celulares es el de retorno de los nutrientes.
4. Regeneración de los componentes del ciclo visual, suministrando la vitamina A para la síntesis de los pigmentos visuales. El ojo requiere un aporte continuo de vitamina A y es el único órgano en el que se ha determinado una función molecular para esta vitamina. El RPE almacena grandes cantidades de vitamina A, la cual se intercambia continuamente a uno y otro lado de la membrana de los segmentos externos de conos y bastones, que se encuentran insertados entre las evaginaciones de las células del epitelio pigmentario.
5. Contribuye a la renovación de los segmentos externos de los fotorreceptores, fagocitando y reciclando sustancias esenciales.
6. Absorbe la luz enfocada en la retina y protege contra la foto-oxidación.
7. Segrega factores de crecimiento, tales como factores de crecimiento de fibroblastos (FGF-1, FGF-2 y FGF-5), factor de crecimiento tumoral β , factor de crecimiento-I similar a la insulina, factor neurotrófico ciliar, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento de endotelio vascular y factor derivado del epitelio pigmentario.

8. Regula la activación de las células T en el ojo.

Todas estas funciones son esenciales, y un fallo de cualquiera de ellas puede conducir a la muerte de los fotorreceptores, degeneración de la retina, pérdida de la función visual y ceguera.

1.2.2.9. Células gliales

Las células gliales son células nodriza del SNC que desempeñan, de forma principal, la función de soporte y nutrición de las neuronas. Las células gliales controlan funciones fisiológicas tales como el mantenimiento adecuado del microambiente celular, los niveles de neurotransmisor y el suministro de citocinas y otros factores de crecimiento (Fig. 1.6). Además, contribuyen al mantenimiento de la barrera hemato-encefálica y del sistema inmunológico (Karl and Reh, 2010).

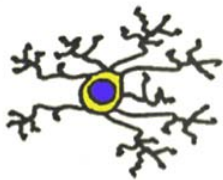
En la retina de mamíferos se han identificado tres clases de células gliales (Karl and Reh, 2010):

1. Microglía
2. Macroglía: Células de Müller y astroglía.

1- Como parte del SNC, la retina humana tiene una población de fagocitos residentes llamados **microglía** que tiene una capacidad inmunológica comparable a la de los monocitos y macrófagos en otros tejidos; representan a los macrófagos del SNC (Graeber and Stre'rt, 1990). Las células de la microglía se encuentran principalmente en INL y OPL en retinas sanas. En las tinciones de Golgi, aparecen como células multipolares, con pequeños cuerpos celulares y unos prolongaciones irregulares y cortas.

La función principal de las células microgliales en la retina es la vigilancia inmunológica. Son los principales elementos inmunocompetentes y fagocíticos residentes en el SNC: participan en la conservación de la homeostasis (detectan microrroturas de la barrera hemato-retiniana hasta el nivel de pequeños vasos sanguíneos) y forman parte en los mecanismos de defensa mediados por el sistema inmunológico, actuando como fagocitos, limpiando de restos las células dañadas desde el interior de las capas de la retina y formando una red de células con potencial efecto inmunológico (Hanisch and Kettenmann, 2007; Kreutzberg, 1996; Raivich et al., 1999).

Sin embargo, el papel de la microglía va mucho más allá de su función relevante frente a patógenos en infecciones y lesiones de la retina. Aunque muchos aspectos aún no se entienden, hoy en día se cree que la microglía es importante para mantener la supervivencia de los fotorreceptores. Las células microgliales juegan un papel clave en la supervivencia de las neuronas ya que secretan factores de protección, como citocinas antiinflamatorias, antioxidantes y factores de crecimiento, tales como el factor neurotrófico derivado del cerebro, factor neurotrófico ciliar, factor neurotrófico glial, factores de crecimiento de nervios, neurotrofina-3 y factores de crecimiento para fibroblastos básico (Langmann, 2007).



Cuenca et al., 2014

En las retinas sanas, las células de la microglía están en un estado de aparente reposo, pero sin embargo, están continuamente vigilando su entorno, moviéndose extensamente y monitorizando el área o superficie a su alrededor para eliminar los productos metabólicos y restos en los tejidos. Este estado no activado se caracteriza por una morfología muy arborescente, plasticidad y una distribución pluriestratificada en la INL y OPL. En este estado, las células microgliales expresan bajos niveles de moléculas coestimuladoras y muestran niveles relativamente bajos de actividad fagocítica (Dick et al., 2003; Hume et al., 1983; Langmann, 2007; Streit et al., 1999). El aparente estado de reposo de la microglía en una retina sana se mantiene gracias a los contactos intercelulares y factores solubles secretados por neuronas, astrocitos y el RPE (Langmann, 2007).

Las células microgliales se activan rápidamente por una variedad de señales, ya sea por factores genéticos o ambientales, como resultado de daños externos, de infecciones oculares o debido al mal funcionamiento celular de la retina o del RPE neural. Además, la microglía de la retina puede ser también activada por infecciones sistémicas, ya sea de origen viral (Zinkernagel et al., 2013) o de origen fúngico (Maneu et al., 2014). Tras la activación, las células microgliales cambian de una morfología ramificada a una forma ameboide, con una intensidad de la respuesta de acuerdo con el grado de activación (Hanisch and Kettenmann, 2007; Raivich et al., 1999). En el estado activado, las células microgliales proliferan, migran al sitio del estímulo y se observa un incremento de su capacidad fagocítica. En la fase efectora, la microglía se acumula en las capas nucleares y el espacio subretiniano, donde actúan como fagocitos, limpiando las células que mueren (Langmann, 2007). La activación de la microglía

INTRODUCCIÓN

supone una defensa para las células mientras que una activación excesiva o muy prolongada puede producir inflamación crónica y neurotoxicidad (Cuenca et al., 2014).

2- **Las células de Müller** son el principal tipo de células gliales, de mayor tamaño y más específico de la retina, abarcando todo el espesor de la misma, desde la OLM a la GCL. Sus núcleos se sitúan en la INL y sus prolongaciones rodean a las neuronas. Están en contacto con el cuerpo celular y las prolongaciones de todas las células de la retina, lo que constituye un vínculo anatómico entre las neuronas y los compartimentos con los que éstas necesitan intercambiar moléculas.



Cuenca et al., 2014

Las células de Müller son las principales responsables del mantenimiento de la homeostasis del microambiente extracelular de la retina, mediante la regulación del metabolismo de la glucosa, del flujo sanguíneo, de los procesos de señalización neuronal y de la homeostasis de iones, agua y pH, entre otros aspectos, garantizando así su correcto funcionamiento. Los factores tróficos derivados de estas células son importantes para la supervivencia de las neuronas de la retina y para la formación de circuitos neuronales (una célula de glia da soporte a más de 15 neuronas) (Bringmann et al., 2009; Franze et al., 2007; Newman and Reichenbach, 1996).

Las células de Müller también están involucradas en la regulación de la actividad sináptica de la retina interna mediante la liberación de glutamato, adenosina o ATP. Más específicamente, son responsables de la captación y el aclaramiento de los neurotransmisores, principalmente glutamato, aunque también GABA y glicina. Otra función de las células de Müller es proporcionar precursores de neurotransmisores a las neuronas, tales como la glutamina para la síntesis de glutamato (Bringmann et al., 2006; Reichenbach and Bringmann, 2013). Por otra parte, la retina tiene una elevada necesidad de protección antioxidante, debido a su exposición a la luz, el alto consumo de oxígeno y la presencia de grandes cantidades de ácidos grasos poliinsaturados que hay en los fotorreceptores. En este sentido, las células de Müller producen moléculas antioxidantes, tales como glutatión, que se genera tras el estrés oxidativo que resulta de la hipoxia en la oscuridad o en la hiperoxia durante la exposición

a la luz (Pow and Crook, 1995; Schütte and Werner, 1998). Las células de Müller también protegen a los fotorreceptores y neuronas de la retina de la muerte (Bringmann et al., 2006) a través de la secreción de factores neurotróficos, factores de crecimiento y citocinas (Bringmann et al., 2009) (Fig. 1.6).

Durante la última década, se han descrito nuevas funciones para las células de Müller (Fig. 1.6). Se ha demostrado están actuando como fibras ópticas que guían la luz a través de las capas de la retina interna hacia los fotorreceptores, lo que minimizaría su dispersión (Franze et al., 2007). Además, las células de Müller pueden actuar como sustrato deformable y flexible para la incorporación y crecimiento de neuronas y de sus ramificaciones (Lu et al., 2006), proporcionando a su vez protección a las neuronas ante la tensión mecánica causada por traumatismos o lesiones en la retina (Lu et al., 2006).

En caso de daño en la retina, las células de Müller desempeñan un papel crucial proporcionando una rápida respuesta a cualquier alteración del microambiente de la retina. Son unas de las primeras células gliales que detectan daño en la retina debido por una parte, a su distribución radial y por otra, a que son células altamente resistentes a estímulos patógenos, tales como isquemia, anoxia, hipoglucemia y presión hidrostática elevada. Esta resistencia es debida en parte, a la reserva de energía que posee en forma de glucógeno, a su alta capacidad antioxidante y su capacidad de proliferación y regeneración, entre otras propiedades (Bringmann et al., 2009).

En la retina de mamíferos, la típica respuesta a un daño es la gliosis reactiva de las células de Müller. Se trata de una respuesta no estereotipada de las células de glía asociada a un estado patológico que produce cambios en la expresión genética, en su morfología, migración, y con menos frecuencia en la proliferación celular dependiendo del tipo de daño o ataque (Karl and Reh, 2010).

Los cambios reactivos en las células de Müller en respuesta al daño tienen un efecto neuroprotector directo en la retina, especialmente en las primeras etapas después de este. En este caso, los cambios funcionales y bioquímicos en las células de Müller se describen como "conservadores" o no proliferativos. Pero esta reacción generalmente beneficiosa puede conducir a un mayor nivel de respuesta de las células de Müller que se describe como "masiva" o proliferativa, en cuyo caso la gliosis es perjudicial para el tejido de la retina y exagera la muerte neuronal. Un posible detonador para realizar la transición de

INTRODUCCIÓN

gliosis "conservadora" a "masiva" es la ruptura de la barrera hemato-retiniana, aumentando con ello el contenido de la retina de factores de crecimiento y factores inflamatorios de la retina, así como una infiltración de células inmunitarias derivadas de sangre (Bringmann et al., 2009).

Una cualidad importante de las células de Müller también son capaces de desdiferenciarse a células con características similares a las células multipotentes de la retina. Son las únicas células gliales que derivan del neuroepitelio, aunque han seguido un desarrollo filogénico y ontogénico diferente al de las neuronas. Debido a que son menos diferenciadas que las neuronas, conservan la capacidad mitótica y son las que se encargan de la reparación y regeneración de las lesiones del sistema nervioso, siendo las encargadas de la neurogénesis adulta en algunas especies animales (Karl and Reh, 2010; Raymond et al., 2006). Después de una lesión, subpoblaciones de células de Müller parecen dejar de expresar marcadores característicos de estas células, se desdiferencian y comienzan a actuar como células progenitoras, expresando marcadores específicos de células madre neuronales (Bringmann et al., 2009; Fischer and Bongini, 2010; Fischer and Reh, 2001; Kohno et al., 2006; Wohl et al., 2009).



Cuenca et al., 2014

3 - Los **astrocitos** se caracterizan por su cuerpo celular aplanado y una serie de prolongaciones radiales, llenas de filamentos intermedios. Los astrocitos son las principales células gliales en el cerebro, donde se encargan de muchas de las funciones que realizan las células de Müller de la retina (Fig. 1.6) (Coorey et al., 2012).

Estas células derivan del mesodermo circundante a las vesículas ópticas, por lo que estrictamente no son células neurogliales. Penetran en la retina coincidiendo con los precursores de los vasos sanguíneos. Estos astrocitos se encuentran casi exclusivamente a nivel de la capa de fibras del nervio óptico de la retina. No existen astrocitos a nivel de la fovea avascular ni de la *ora serrata*. Su morfología cambia según su localización, de manera que pasan de ser muy elongados a nivel de la retina central a una morfología estrellada a nivel de la retina periférica (Schnitzer, 1988).

A pesar de que muchas de las funciones de los astrocitos en la retina no se conocen, se considera que juegan un papel esencial en el desarrollo y la función de los vasos de la retina, el flujo sanguíneo y la barrera hemato-retiniana (Kur et al., 2012). Los capilares de la retina forman la barrera hemato-retiniana que consta de una sola capa de células endoteliales fuertemente adheridas, una lá-

mina basal, rodeada de pericitos, astrocitos y microglía, formando un complejo funcional denominado unidad neurovascular (Klaassen et al., 2013).

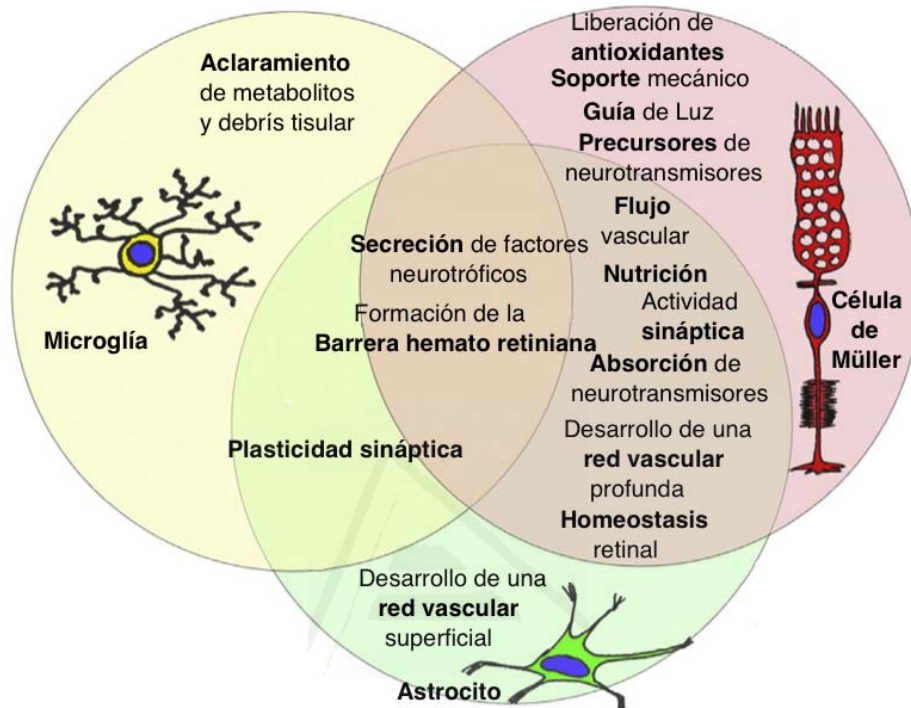


Figura 1.6: Función de las células de glía en la retina: microglía, células de Müller y astrocitos. Representación esquemática de las principales características morfológicas y funcionales de las células gliales en la retina, jugando un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis y la preservación de la supervivencia de las neuronas (Cuenca et al., 2014).

En la unidad neurovascular, las células endoteliales, pericitos, astrocitos, microglía y neuronas están conectadas activamente a través de una red funcional. Así, por ejemplo, la actividad neuronal puede regular el flujo de sangre por medio de la comunicación glial, a través de factores vasoactivos producidos por los astrocitos que pueden controlar el flujo de la sangre en regiones locales de la retina. Al igual que las células de Müller, los astrocitos forman una red en la que las células se comunican por medio de ondas de calcio o utilizando mensajeros extracelulares, tales como ATP (Metea and Newman, 2006,0). Además, los astrocitos ayudan a las células de Müller en el mantenimiento de la homeostasis iónica y en la eliminación de los neurotransmisores, dando soporte a la formación, función y eliminación de la sinapsis a través de la activación de las células de microglía (Kimelberg, 2010; Stasi et al., 2006; Stevens

et al., 2007). Por otra parte, ayudan a las neuronas a modular la transmisión sináptica, los neurotransmisores pueden producir movimientos de calcio en los astrocitos, que a su vez son capaces de modular la actividad eléctrica de las neuronas de la retina (Newman, 2004). En la figura 1.6 podemos observar las principales funciones de las células gliales y la interconexión que existe entre ellas.

1.2.3. La transducción visual

La transducción visual o fototransducción es el proceso mediante el cual un fotón genera una respuesta nerviosa en los fotorreceptores. La estimulación de la rodopsina de los bastones y las opsinas de los conos activan una compleja cascada de reacciones enzimáticas y bioquímicas como respuesta a la luz, induciendo el cierre de los canales catiónicos de la membrana del fotorreceptor. El potencial de membrana de los fotorreceptores se hiperpolariza, causando una reducción de la cantidad de neurotransmisor liberado por el terminal del fotorreceptor hacia las neuronas postsinápticas. La transducción visual tiene lugar en el segmento externo (Lledó Riquelme et al., 2010).

La rodopsina es una proteína transmembrana que consta de una parte protéica llamada opsina unida covalentemente a una parte no protéica, un cromóforo llamado retinal (11-cis retinal) derivado de la vitamina A. El retinal es la parte sensible a la luz y presenta dos conformaciones: una forma cis y una forma trans. El GMPc (monofosfato cíclico de guanosina) es una molécula central en la transducción visual que actúa como segundo mensajero. Todos los aspectos de señalización de esta cascada catalítica están dominados por el balance entre la síntesis y degradación de esta sustancia en el citoplasma del segmento externo del fotorreceptor (Burns and Arshavsky, 2005; Lledó Riquelme et al., 2010).

En condiciones de oscuridad, el retinal se encuentra en forma cis, el GMPc se une a la superficie interna de los canales de sodio Na^+ y los abre. Se origina de esta forma la denominada corriente oscura que da como resultado la despolarización del fotorreceptor. Es decir, hace más positivo el potencial de membrana del fotorreceptor (-40 mV) y se abren los canales de Ca^{2+} con la consiguiente entrada de estos iones en el interior de la célula (Baylor, 1987; Lledó Riquelme et al., 2010). Como consecuencia de esta despolarización en oscuridad, los fotorreceptores están secretando constantemente el neurotransmisor glutamato, estimulando continuamente las neuronas bipolares de la retina. Cuando un fotón de luz llega al segmento externo, estimula la molécula de

rodopsina y causa la isomerización del retinal, produciéndose un cambio conformacional de la rodopsina a su estado activo (Arshavsky et al., 2002; Chabre and Deterre, 1989; Goldstein, 2013; Hargrave, 2001; Kono et al., 2008; Lledó Riquelme et al., 2010; Serrano et al., 2006). La rodopsina, excitada por la luz, cataliza el intercambio de los nucleótidos GDP (guanosildifosfato) por GTP (guanosiltrifosfato) de una proteína G denominada transducina. La transducina activa a otra enzima denominada fosfodiesterasa (PDE). Como consecuencia de la activación de la fosfodiesterasa se estimula la degradación de la molécula GMPc (Stryer and Bourne, 1986). Por tanto, en presencia de luz, los niveles de GMPc disminuyen, ocasionando el cierre de 250 canales de Na⁺ por un cuanto de luz absorbida. Todo ello dura alrededor de un segundo. De esta forma, se acumulan iones de sodio en el exterior de la membrana plasmática y el potencial adopta una forma de hiperpolarización. Este cambio en el potencial de membrana conduce al cierre de los canales de calcio dependientes de voltaje (Hodgkin et al., 1987; Lledó Riquelme et al., 2010; Nakatani and Yau, 1988). El resultado final es una disminución de la secreción del neurotransmisor glutamato por parte de los fotorreceptores. La sinapsis con las células bipolares es inhibitoria, cuando se deja de inhibir a la célula bipolar, se forma un impulso nervioso que es transmitido a las células ganglionares y de éstas al resto de células (Lledó Riquelme et al., 2010).

1.3. CÉLULAS MADRE Y PROGENITORAS

Por definición, una célula madre es toda aquella célula que no está totalmente diferenciada, tiene capacidad de división ilimitada y cuando se divide, puede permanecer como célula madre o puede iniciar una vía que conduce de forma irreversible a su diferenciación terminal (Alberts et al., 1994). Así pues, las células madre son células indiferenciadas que tienen la capacidad de dividirse asimétricamente, dando lugar a una célula hija con capacidad de autorrenovación y a otra célula hija con capacidad de diferenciación, si las condiciones ambientales son adecuadas. Las células madre pueden clasificarse en cuanto a su potencia y en cuanto a su origen.

En cuanto a su potencia, las células madre pueden ser:

- 1- Totipotentes
- 2- Pluripotentes
- 3- Multipotentes
- 4- Unipotentes

Durante el desarrollo embrionario, las células madre se vuelven cada vez más comprometidas de manera que pasan de ser totipotentes, con capacidad de generar el organismo entero, a ser pluripotentes las cuales sólo son capaces de generar las tres capas embrionarias. Las células pluripotentes, a su vez, se diferencian en células madre multipotentes, comprometidas a ciertos linajes siendo capaces de generar sólo células de dichos linajes. Las células madre unipotentes, también llamadas precursores o células progenitoras o "Progenitors cells" (PCs), son células que tienen la capacidad de diferenciarse en un sólo tipo celular dentro del tejido al que pertenecen. La diferencia más importante entre las células madre y células progenitoras es que las células madre pueden replicarse indefinidamente, mientras que las células progenitoras pueden dividirse sólo un número limitado de veces ([Seaberg and van der Kooy, 2003](#)).

Atendiendo a su origen, las células madre pueden dividirse en:

1- **Células madre embrionarias o fetales:** Son aquellas que forman parte de la masa celular interna de un embrión de 4-5 días de edad, es decir en la fase de su desarrollo llamada blastocisto. Estas son células pluripotentes lo cual significa que pueden dar origen a las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo ([Riveros et al., 2007](#)).

2- **Células madre somáticas:** En la mayoría de los tejidos de individuos adultos existen pequeñas poblaciones de células indiferenciadas. Son células madre adultas multipotentes que poseen la capacidad de diferenciarse para dar lugar a progenitoras indiferenciadas que, por una parte generarán células maduras del tejido en el que se encuentran y a su vez mantienen el balance necesario de células progenitoras indiferenciadas en dicho tejido. Son células madre que permanecen a lo largo de la vida del individuo y que pueden estar en áreas activas o en áreas en reposo en estado mitótico latente ([Fuchs and Segre, 2000](#)).

Por factores exógenos las células en reposo pueden activarse, volver a entrar en el ciclo celular, realizar una división celular característica (autorrenovación) y reexpresar factores de transcripción específicos de células inmaduras. Están encargadas de regenerar los tejidos en continuo desgaste o que han sufrido un daño, por ejemplo, después de una lesión. Estas células desempeñan un papel esencial en el organismo, no sólo por su contribución en la formación de órganos y tejidos, sino sobretodo, por encargarse del mantenimiento y renovación

de los mismos durante todo el proceso del desarrollo ontogénico (Edlund and Jessell, 1999; Firulli and Olson, 1997; Orkin, 1998).

Las células madre somáticas se encuentran reguladas en función del microambiente fisiológico en el que se encuentran, es el denominado nicho (Schofield, 1977). Las características moleculares existentes en estos nichos afectan a las propiedades intrínsecas de las células madre somáticas residentes regulando la proliferación y el destino celular (Eckfeldt et al., 2005). Las células del nicho (Fig. 1.8), células diferenciadas y moléculas de adhesión están en estrecha relación con las células madre somáticas anclándolas durante los periodos de inactividad (Wilson and Trumpp, 2006). Mantienen a las células madre somáticas en un estado quiescente (en la fase de reposo del ciclo celular G_0) y dirigen la división asimétrica seguida de la proliferación y diferenciación de éstas en el momento y lugar que se precise. El papel más importante del nicho celular es detectar la necesidad del reemplazamiento celular y transmitir las señales hacia las células residentes para que éstas puedan alcanzar el destino celular final mediante la proliferación celular (Li and Xie, 2005).

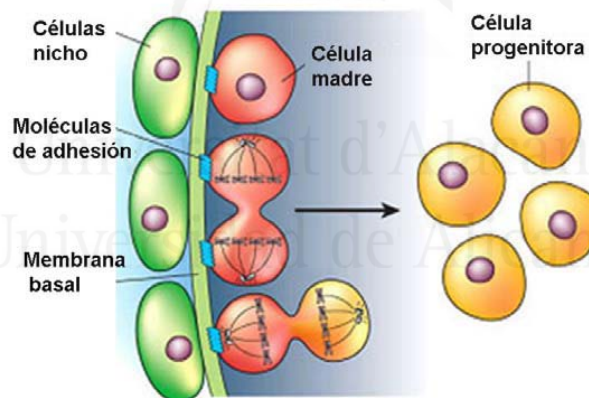


Figura 1.8: Representación del nicho de células madre somáticas. Las células del nicho dirigen vía señalización celular el futuro de las células madre somáticas a través del inicio y/o bloqueo de la diferenciación celular y de la regulación de los ciclos celulares (obtenido de.vroniplag.wikia.com).

Las células madre de vertebrados superiores, durante el desarrollo, pierden progresivamente la capacidad de diferenciación, de modo que, en la edad adulta, sólo una pequeña fracción de células madre/progenitoras se encuentran en determinados tejidos. Esta pequeña población de células madre adultas son similares a las células madre embrionarias, ya que mantienen la capacidad de

diferenciarse en más de un tipo celular pero a diferencia de estas, las células madre adultas se limitan a ciertos linajes tales como linaje hematopoiético, mesenquimal, neural, etc. (Weissman et al., 2001). A pesar de ello, las células madre adultas comprometidas a ciertos linajes tienen la capacidad de convertirse en otro linaje, es lo que se denomina la transdiferenciación que es distinta para cada linaje (Jopling et al., 2011).

1.3.1. Células madre y progenitoras embrionarias de la retina

Las células madre neurales o "*Neural Stem Cells*" (NSCs) del SNC, son células madre multipotentes, ya comprometidas, que dan lugar a las células del linaje neuronal, es decir, dan lugar a células progenitoras neuronales o "*Neural Progenitors Cells*" (NPCs) tales como neuroblastos y glioblastos que posteriormente se diferencian en neuronas y células gliales. En mamíferos, casi todas las neuronas del SNC se forman temprano durante el desarrollo embrionario, a partir de NSCs (Alvarez-Buylla and Temple, 1998; Denham et al., 2005; Okano, 2002; Potten and Loeffler, 1990; Temple, 2001; Temple and Alvarez-Buylla, 1999).

La retina neural como parte del cerebro y con ello del SNC, se origina también a partir de NSCs multipotentes que dan lugar a células madre multipotentes de la retina o "*Retina Stem Cells*" (RSCs) y que a su vez, dan lugar a células progenitoras de la retina o "*Retina Progenitors Cells*" (RPCs), tempranas y tardías (Fig. 1.9). Los astrocitos de la retina derivan de NSCs del cerebro y emigran a la retina a través del nervio óptico. Los macrófagos perivasculares derivan de los progenitoras formados a partir de las células madre hematopoiéticas o "*Hematopoietic Stem Cells*" (HSCs) y migran al cerebro y a la retina durante la vascularización (Wohl et al., 2012). La microglía deriva directamente a partir de progenitores mieloides más inmaduros y migran a los tejidos del SNC en fases tempranas del desarrollo, antes de que comience la vascularización (Fig. 1.9) (Chen et al., 2002; Watanabe and Raff, 1988; Wohl et al., 2012).

La retinogénesis embrionaria es un proceso altamente conservado en mamíferos y no mamíferos, que se produce en una secuencia definida (Fig. 1.10) (Galli-Resta, 2002; Marquardt and Gruss, 2002; Reichenbach and Bringmann, 2010; Reichenbach et al., 1993; Turner and Cepko, 1986). Esta secuencia en la generación de células de la retina se debe a un cambio progresivo de las RPCs per se, es decir por señales intrínsecas, así como a un entorno cambiante, por señales extrínsecas, durante el desarrollo (Livesey and Cepko, 2001; Reh and Kljavin, 1989; Wohl et al., 2012).

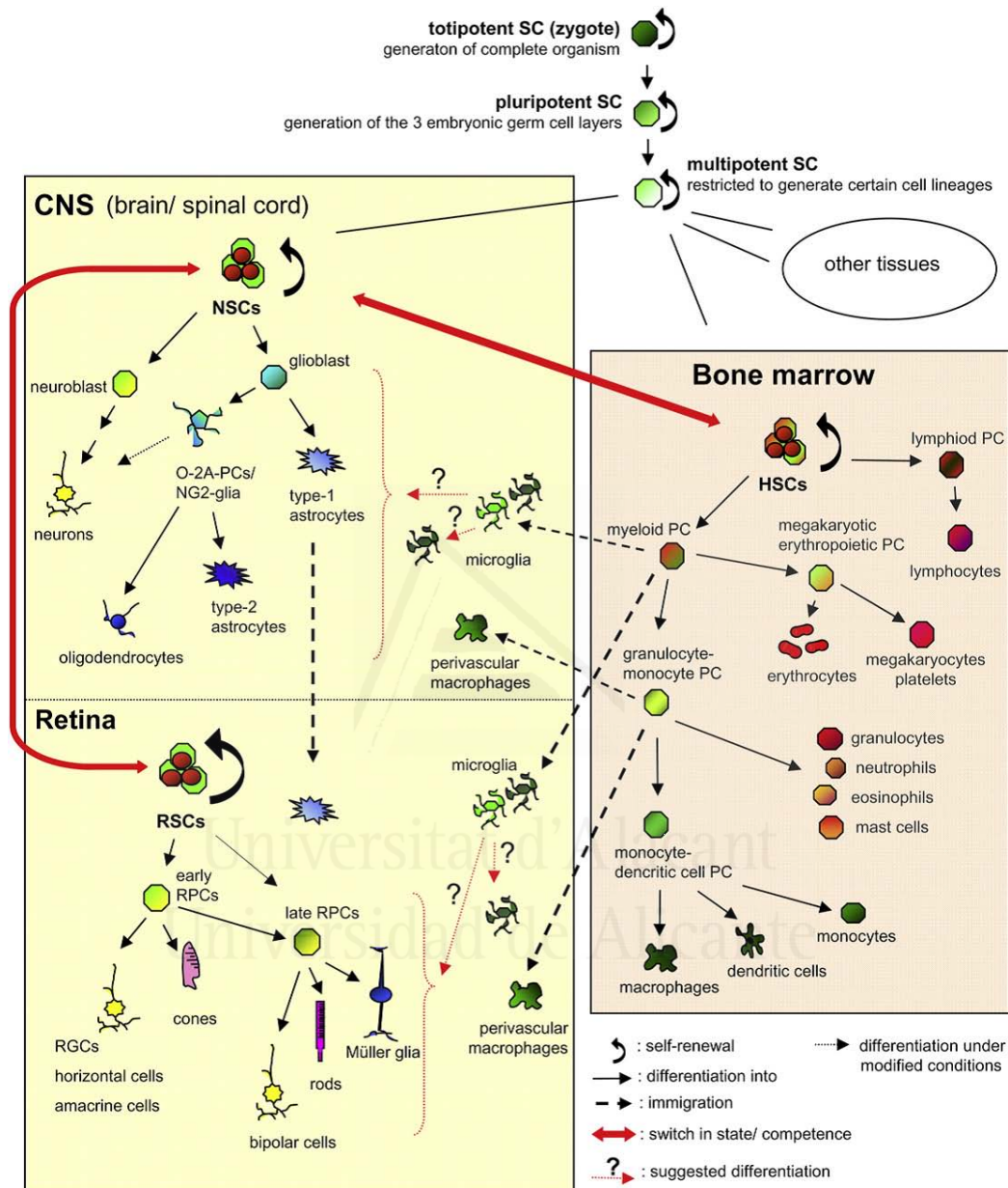


Figura 1.9: *Rutas de diferenciación de las células madre neurales, de la retina y hematopoyéticas. Las neuronas de la retina se forman, primero a partir de progenitoras tempranas y posteriormente aparecen las neuronas formadas a partir de los progenitoras tardíos. Los astrocitos de la retina derivan de células madre neurales. Los macrófagos derivan de progenitores formados a partir de células madre hematopoyéticas. La microglía deriva directamente de progenitores mieloides más inmaduros (Wohl et al., 2012).*

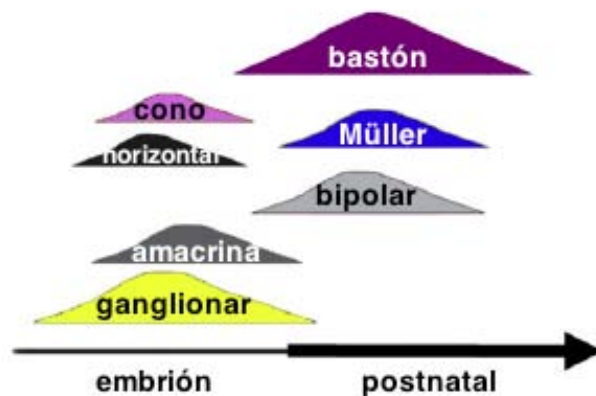


Figura 1.10: Retinogénesis. Etapas de la generación de todos los tipos celulares de la retina (Wohl et al., 2012).

1.3.2. Células madre y progenitoras neurales en la retina adulta

Las células madre y progenitoras neurales en adultos pueden estar en áreas neurogénicas activas o en áreas no neurogénicas donde están en reposo, en estado mitóticamente latente pudiendo activarse por factores exógenos, como por ejemplo después de una lesión (Kernie et al., 2001; Ming and Song, 2005).

En la actualidad se reconoce que en mamíferos adultos persisten nichos especializados de células madre neuronales, donde se generan determinados tipos de neuronas. Se han descrito, NSCs/NPCs en dos áreas neurogénicas del cerebro, la zona subventricular (Alvarez-Buylla and García-Verdugo, 2002; Doetsch et al., 1999; Lois and Alvarez-Buylla, 1993) y el giro dentado del hipocampo (Balu and Lucki, 2009; Eriksson et al., 1998; Kempermann et al., 2004) así como en las regiones no neurogénicas tales como la corteza cerebral (Gould and Tanapat, 1999), la médula espinal (Matsumura et al., 2010) y en varias estructuras del ojo (Ahmad et al., 2000; Haruta et al., 2001; Tropepe et al., 2000).

Algunas de las características comunes de las células madre neurales que se encuentran en sus nichos son las siguientes (Conti and Cattaneo, 2010; Gerhart, 1999):

1. Prominentes uniones adhesivas mediadas por cadherina, una rica matriz extracelular en contacto con una lámina basal especializada a través de uniones mediadas por integrina.

2. Estrecha asociación con los vasos sanguíneos.
3. Marcadores de superficie celular esenciales en el desarrollo embrionario temprano, por ejemplo: antígeno-1 embrionario, SSEA-1, también llamado Lewis X, LeX o CD15).
4. Expresión de proteínas como BLBP (proteína de unión de lípidos del cerebro, expresada durante el desarrollo) y expresión de proteínas de filamentos intermedios como la nestina o vimentina.
5. Capacidad de respuesta a señales extrínsecas por medio de factores tales como IGF (factor de crecimiento similar a la insulina), TGF- β (factor- β transformante de crecimiento) de la familia Wnt, familia de proteínas de señalización altamente conservadas que regulan las interacciones célula-célula durante la embriogénesis. Vías de señalización: Shh (sonic hedgehog) esencial para la formación del tubo neural en humanos y otros vertebrados, Notch (receptor de membrana) y LIF (factor inhibidor de la leucemia). La señalización de Notch promueve la proliferación durante la neurogénesis, y su actividad es inhibida por Numb para promover la diferenciación neural. LIF es una interleucina de clase 6 que afecta al crecimiento celular mediante la inhibición de la diferenciación. La caída de niveles de dicha citocina hace que las células se diferencien.
6. SOX2 es un factor de transcripción que se expresa en niveles altos en el neuroepitelio del SNC en desarrollo y se cree que es de gran importancia para la proliferación de células madre neurales y su diferenciación, esencial para el mantenimiento de la auto-renovación o pluripotencia de las células madre embrionarias no diferenciadas. También son importantes los factores Oct4 y Nanog.

La retina neural, como parte del SNC, presenta también zonas neurogénicas y no neurogénicas en diferentes regiones, con células madre y células progenitoras quiescentes. Durante la última década se han identificado diferentes tipos de RSCs y RPCs que se clasifican como tales en base a la aparición de varias características principales ([Ahmad et al., 2004](#); [Alonso, 2001](#); [Belecky-Adams et al., 1997](#); [Ellis et al., 2005](#); [Hitchcock et al., 1996](#); [Karl and Reh, 2010](#); [Marquardt et al., 2001](#); [Matsushima et al., 2011](#); [Sakakibara et al., 1996](#)):

1 - Capacidad de reentrada en el ciclo celular y en la mitosis, es decir, en la división celular.

2 - Expresión de proteínas y factores de transcripción característicos de NSCs y específicos del desarrollo de la retina que indican un estado inmaduro de la célula, tanto en células inmaduras como en células que han sufrido desdiferenciación (si las células ya estaban diferenciadas), tales como proteínas que controlan una serie de pasos críticos en la formación del ojo: Pax6, SOX2, nestina, vimentina, Musashi, CHX10, también llamado VSX2 (Visual system Homeobox2) o RT-1, Ascl1, Dll1, etc., que se conservan a través de las especies de vertebrados.

3 - Capacidad de expresión posterior de marcadores neuronales o gliales que indican la diferenciación en neuronas, glía o células del RPE de estas células inmaduras ya diferenciadas tales como: β -III-tubulina, GFAP, MAP-II, CRALBP, etc.

1.3.3. Identificación de células madre y progenitoras en la retina de ratón adulto

Las células madre somáticas son células indiferenciadas que se encuentran presentes en órganos y tejidos adultos. Su singularidad, escasez y la falta tanto de características morfológicas distintivas como de marcadores específicos y selectivos hacen que su identificación y localización sean muy complejas en casi todos los tejidos. La mayoría de los marcadores disponibles para la identificación de células madre en la retina se expresan en células inmaduras, en RPCs, pero también en neuronas maduras y algunos tipos de células gliales. Por ejemplo, el factor de transcripción Pax6 se expresa también en células amacrinas maduras (Hitchcock et al., 1996; Karl et al., 2008; Ooto et al., 2004) mientras que el gen homeobox CHX10 se ha encontrado en células horizontales maduras (Belecky-Adams et al., 1997; Liu et al., 1994). SOX2, otro factor de transcripción, se expresa también en las células de Müller y astrocitos maduros de la retina (Fischer et al., 2010). Los filamentos intermedios de vimentina y nestina se expresan en las células gliales y, además, aumentan significativamente su inmunoreactividad después de una lesión (Wohl et al., 2009; Xue and Yuan, 2010). Los filamentos de nestina también se encuentra en otros tipos de células incluyendo las células endoteliales (Mokrý et al., 2008; Nickerson et al., 2007; Suzuki et al., 2010), pericitos (Alliot et al., 1999; Dore-Duffy et al., 2006) y las células tumorales (Ishiwata et al., 2011; Krupkova Jr et al., 2011; Lobo et al., 2004).

A pesar de ello las células madre son pues, células indiferenciadas presentes en tejidos u órganos diferenciados. Muchos de los diferentes tipos de células madre conservan y comparten vías bioquímicas, por lo que a pesar de

todo, podemos utilizar estas características para identificarlas y aislarlas. En consecuencia podremos identificar las células de forma segura, a través de la colocalización de más de uno de estos marcadores, mediante la unión de un conjunto de anticuerpos específicos, o por otras propiedades características de células inmaduras. Otro medio de identificación consiste en utilizar un modelo de ratón transgénico en el que las células madre estén endógenamente marcadas por una proteína fluorescente tal como la nestina-GFP (Yamaguchi et al., 2000).

Una de las características universales de células madre o progenitoras, es la expresión de ABCG2, un transportador perteneciente a la superfamilia de proteínas transmembrana ATP-binding cassette (ABC) (Doyle and Ross, 2003). Estos transportadores median el flujo de salida de un amplio espectro de sustratos que incluyen fármacos citotóxicos, péptidos, esteroides, iones y fosfolípidos (Krishnamurthy and Schuetz, 2006). La capacidad de este transportador para extraer rápidamente diversos compuestos endógenos y xenobióticos al exterior de la célula, así como colorantes fluorescentes *in vitro*, sirve como base para detectar células con el fenotipo SP. Una vez teñidas con el colorante intercalante del ADN Hoechst 33342, las células diferenciadas retienen el colorante en su interior dando una señal alta de fluorescencia mientras que las células madre/progenitoras extraen activamente el colorante por medio de dicha bomba.

Si analizamos la fluorescencia en un citometro de flujo, enfrentando la emisión dual del colorante Hoechst (azul y roja) en un histograma biparamétrico, aparece una pequeña subpoblación lateral en forma de cola que sale de la población mayoritaria compuesta por células que están perdiendo colorante y en consecuencia fluorescencia. Esta cola es la denominada población "Side Population" (SP) y se identificó por primera vez en células de médula ósea de ratón (Fig.1.11) (Goodell et al., 1996), aunque actualmente constituye una técnica muy valiosa para el aislamiento de células madre/progenitoras de diversos tejidos, sobre todo en ausencia de marcadores específicos de superficie (Abbott, 2003; Bunting, 2002; Doyle and Ross, 2003; Goodell et al., 1996).

La expresión de ABCG2 y el fenotipo celular SP son también características de las células madre neurales, derivadas de diferentes regiones del cerebro, incluida la retina (Ahmad et al., 2004; Bhattacharya et al., 2003; Hulspar and Quesenberry, 2000; Mouthon et al., 2006). Además, se ha descrito también que la expresión de ABCG2 está regulada por el gen Notch, que participa en el mantenimiento de las células madre (Bhattacharya et al., 2007). Por lo tan-

INTRODUCCIÓN

to, existe una expresión de ABCG2 regulada durante la histogénesis de retina, de manera que los niveles de ABCG2 disminuyen conforme las células adquieren mayor compromiso respecto al linaje. Esta disminución en la expresión de ABCG2 se correlaciona con el agotamiento progresivo en la población de células SP según avanza la histogénesis de la retina (Bhattacharya et al., 2007).

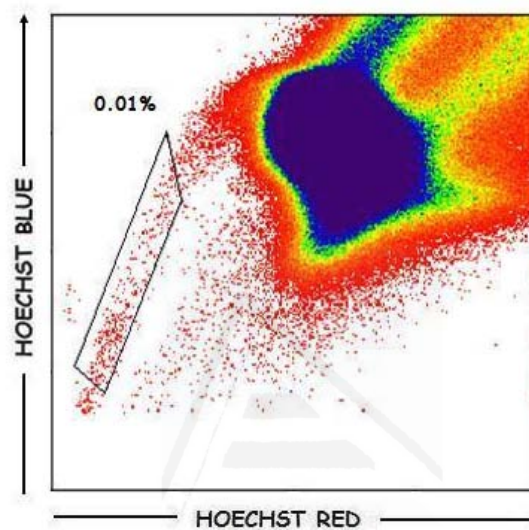


Figura 1.11: Representación de la emisión dual del colorante Hoechst (azul y roja) en un histograma biparamétrico de células de médula ósea de ratón analizadas por citometría de flujo. Se puede observar, dentro de la región, la subpoblación lateral en forma de cola que sale de la población mayoritaria compuesta por células que están perdiendo colorante y en consecuencia fluorescencia. Esta cola es la denominada población “Side Population” (SP).

El marcador Stem-cell-antigen-1 (Sca-1 o Ly6A) es una phosphatidylinositol glicosil (GPI) proteína de 18 kDa anclada en la superficie celular, miembro de la familia 6 de antígenos de linfocitos (Ly-6). Parece que Sca-1 podría estar involucrado en la regulación tanto de células B como en la activación de células T. Su expresión en las HSCs se ha utilizado como un marcador de las HSCs en ratones, de manera que es ampliamente utilizado para enriquecer células madre hematopoyéticas murinas. Sin embargo, Sca-1 también se ha descubierto en varios tejidos no hematopoyéticos y se puede utilizar para enriquecer otras poblaciones, tanto de células madre como de progenitoras de otros tejidos (Batts et al., 2011). En la retina de ratón recién nacido, se ha visto que existen células multipotentes Sca-1⁺ (Liu et al., 2009).

1.3.3.1. Células madre y progenitoras en peces y anfibios

Los primeros estudios sobre la neurogénesis y la reparación celular se realizaron en peces y anfibios. La retinogénesis en estos vertebrados se produce durante toda la vida. Las nuevas neuronas que se generan se integran funcionalmente en los circuitos ya existentes, de manera que crecen como una ampliación de la retina ya formada. (Amato et al., 2004; Hitchcock and Raymond, 2004; Moshiri et al., 2004; Perron and Harris, 2000).

RSCs multipotentes altamente proliferativas se encuentran en una zona especializada, una zona neurogénica activa, en la periferia de la retina neural. Es un neuroepitelio en perpetua autorenovación situado en el límite entre la retina neural y el epitelio ciliar, es una cuña semicircular llamada zona marginal ciliar (CMZ) (Fig. 1.12) (Amato et al., 2004; Fischer et al., 2010; Perron and Harris, 2000; Perron et al., 1998; Raymond et al., 2006).

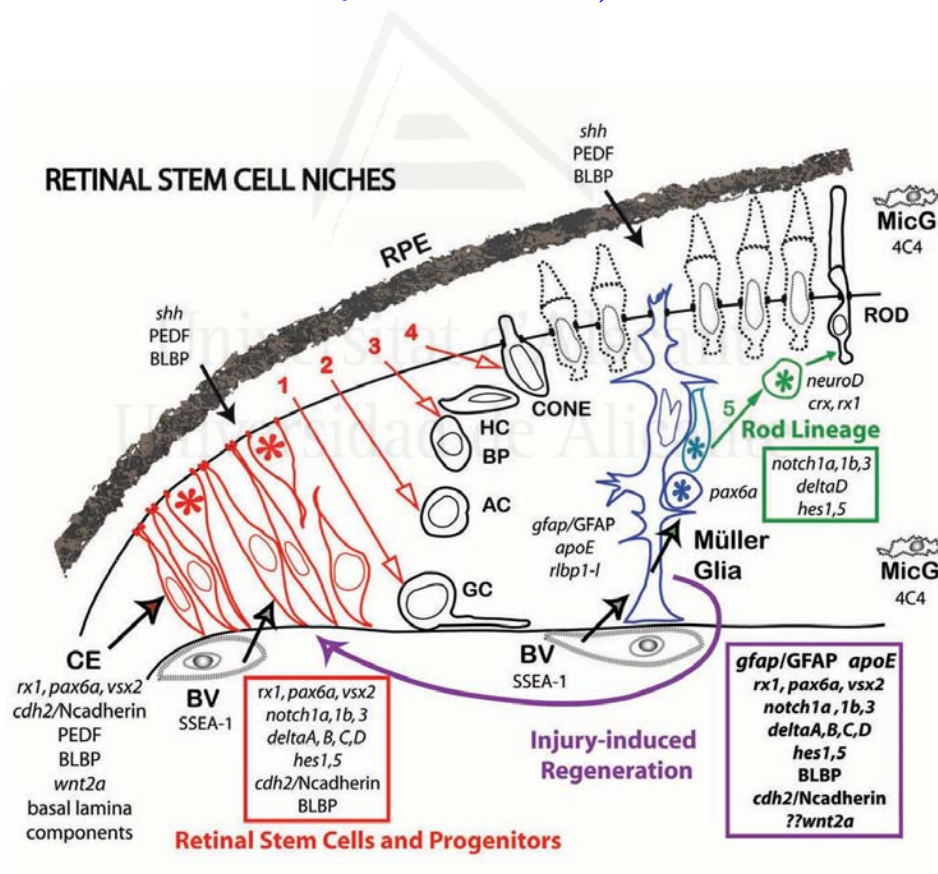


Figura 1.12: Nicho de células madre en la retina del pez zebra (Raymond et al., 2006).

Posteriormente se demostró que, en peces, además, existían células progenitoras endógenas en la zona central de la retina. A partir de células de Müller, se lleva a cabo una producción continua de nuevos bastones que se insertan en el circuito de la retina madura. Las células de Müller diferenciadas, se desdiferencian y se vuelven a diferenciar para dar origen a células progenitoras de fotorreceptores. Por lo tanto, en peces, las células de Müller juegan un doble papel: como células gliales y como células progenitoras con una gran capacidad regenerativa (Bernardos et al., 2007; Karl and Reh, 2010; Raymond et al., 2006) (Fig. 1.12). También es posible que en la retina central se encuentre una población de células madre quiescente (Bernardos et al., 2007).

En anfibios, las células madre situadas en el CMZ también contribuyen a la regeneración celular después de una lesión en la retina (Araki, 2007; Mityashov, 2001). Sin embargo, la capacidad de regeneración de estas células en anfibios disminuye con la edad (Moshiri et al., 2004). Además, los precursores de bastones no están presentes. Las células de Müller carecen de la capacidad de regeneración que se observa en peces. Aunque la respuesta en anfibios de las células de Müller a una lesión en la retina no está tan bien estudiada, no parece que estas células de manera espontánea vuelvan a entrar en el ciclo celular. Las progenitoras de la retina, en este caso, derivan de las células del epitelio pigmentario (Karl and Reh, 2010; Reh, 1987; Sakami et al., 2008).

1.3.3.2. Células madre y progenitoras en aves

En las aves, la retinogénesis está completa, con todas las neuronas integradas y funcionales, en el momento de la eclosión. La expansión normal postnatal del ojo aviar se debe principalmente al estiramiento del tejido y no como resultado del crecimiento celular o de la adición de nuevas neuronas (Amato et al., 2004), ya que al menos el 90 % de las células de la retina se han generado ya una semana antes de la eclosión (Prada et al., 1991).

Sin embargo, se ha identificado una zona marginal de proliferación como la zona CMZ en el ojo de pollo (Fischer and Reh, 2000) y de codorniz (Kubota et al., 2002). El potencial neurogénico de estas células marginales está bastante restringido en comparación con las células de peces y anfibios. La proliferación celular notable se limita a un período de 2-3 semanas de duración después de la eclosión, donde sólo se generan unas pocas interneuronas, excepto las células ganglionares, aunque esta restricción puede cambiar con factores extrínsecos (factores de crecimiento) (Fischer and Reh, 2000). Las células de la CMZ aviar, en contraste con los peces y anfibios, no contribuyen en los procesos de rege-

neración celular después de una lesión de la retina ([Amato et al., 2004](#); [Fischer and Reh, 2000](#); [Moshiri et al., 2004](#); [Reh and Fischer, 2006](#)).

[Fischer and Reh \(2001\)](#) demostraron que, aunque en la retina sana de aves las células de Müller no proliferan, después de un daño en la retina estas células llevan a cabo una extensa proliferación. Las células de Müller de pollo tras la eclosión, responden a un daño neurotóxico en la retina volviendo a entrar en el ciclo celular mitótico y expresando una variedad de genes de progenitores; homeobox, CHX10 y Pax6, cash1/ascl1a, FoxN4, Notch1, Dll1 y Hes5. La reexpresión de estos genes, muchos de los cuales se expresan también en peces después de una lesión, parece indicar que las células de Müller tiene capacidad progenitora. Sin embargo, una cantidad limitada de células de Müller en aves demostró tener capacidad de regeneración neuronal. Es cierto que un alto porcentaje de las células de Müller vuelven a entrar en el ciclo celular después de un daño, pero sólo un subconjunto de éstas expresan los marcadores de células progenitoras y un número de ellas se diferencian en células que expresan marcadores neuronales ([Fischer and Reh, 2001,0](#); [Hayes et al., 2007](#)).

Una lesión en la retina tanto en aves como en peces hace que las células de Müller proliferen y expresen genes de células progenitoras neurales. Aunque algunos de los pasos iniciales parecen ser muy similares, hay por lo menos tres diferencias importantes entre peces y aves con respecto a la respuesta de las células de Müller: primero, en aves, las células de Müller pasan a través de sólo una única ronda de la división celular, mientras que en los peces estas células pasan a través de múltiples rondas de división y de producción de progenie que forman pequeños grupos neurogénicos. La segunda diferencia es que sólo un pequeño porcentaje de la progenie de las células de Müller en aves se diferencian a neuronas, mientras que en el pez la mayoría parece hacerlo. La tercera es que las células de Müller en aves, ante una lesión de retina, se desdiferencian y proliferan regenerando la retina parcialmente, es decir, sólo se regeneran algunos tipos de neuronas. ([Karl and Reh, 2010](#); [Kassen et al., 2009](#); [Raymond et al., 2006](#)).

1.3.3.3. Células madre y progenitoras en mamíferos

Se ha visto que *in vivo*, el ojo normal de mamífero adulto, incluyendo la retina neural, tiene una capacidad deficiente de regeneración y carece de una zona proliferativa en la zona periférica de la retina ([Kubota et al., 2002](#)). En el año 2000, dos grupos identificaron de forma independiente células progenitoras quiescentes en la retina de mamífero adulto ([Ahmad et al., 2000](#); [Tropepe](#)

INTRODUCCIÓN

et al., 2000). Bajo condiciones adecuadas de cultivo, estas células madre de mamífero adulto proliferaban, mostraban signos de autorenovación y generaban nuevas neuronas retinianas tanto en presencia como en ausencia de factores de crecimiento endógenos. Sin embargo, estas células madre no se encuentran en la retina neural, sino en el epitelio ciliar (cuerpo ciliar). Es una estructura que se ha descrito como homóloga a la CMZ en peces, anfibios y aves (Ahmad et al., 2000; Tropepe et al., 2000). Son células epiteliales pigmentadas que están completamente diferenciadas (Cicero et al., 2009) en contraste con la células inmaduras, indiferenciadas (no pigmentadas) de la CMZ de vertebrados inferiores o en mamíferos adultos en regiones neurogénicas cerebrales. Los mamíferos también tienen una verdadera CMZ con RSCs cuyas células proliferan y se diferencian en tipos de células gliales o neuronales tardías. Sin embargo esta propiedad sólo se puede observar durante las primeras semanas después del parto (Moshiri et al., 2004; Nishiguchi et al., 2008; Wohl et al., 2012; Zhao et al., 2005). Un estudio *in vitro* demostró que células disociadas de esta región de la retina de rata de entre 1 y 3 semanas postnatales, proliferan, aumentan en número, y expresan marcadores neuronales y gliales con la excepción de los marcadores de oligodendrocitos (Engelhardt et al., 2004). La capacidad de proliferación de estas células disminuye entre las semanas 8 y 14 postnatales, de modo que las células del tejido de la retina obtenidas después de la semana 14, ya no proliferan ni se diferencian (Ahmad et al., 2000; Engelhardt et al., 2004; Tropepe et al., 2000). En la semana 14 posnatal, la retinogénesis en ratones ya está concluida (Young, 1985), sin embargo se ha demostrado que ciertas patologías pueden promover la activación de RSCs en el margen de la retina. En ratas utilizadas como modelo de estudio de la retinosis pigmentaria, se encontraron en la CMZ, células con una capacidad mayor de proliferación que en ratas de tipo silvestre (Jian et al., 2009).

En quistes de retina de primates (*Macaco nemestrina* de hasta 15 años de edad) formados en la *pars plana*, se detectaron diferentes tipos de células de la retina, lo que sugiere que la neurogénesis puede ocurrir en el tejido ocular del primate adulto (Fischer et al., 2001). Al analizar el margen de la retina y la *pars plana* de humano adulto *post mortem*, se observa formación de RPCs en presencia de factor de crecimiento de fibroblastos (Mayer et al., 2005) o de factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Coles et al., 2004). Estas células progenitoras aisladas formaron esferas, mostrando así capacidad de desdiferenciación, que se manifestó en un 100 % de capacidad de autorrenovación y multipotencia, ya que se produjo la regeneración de todos los tipos de células retinianas (Coles et al., 2004). Después del trasplante de estas células en ojos de ratón de

una semana de edad, sobrevivieron, migraron, se integraron y se diferenciaron en el retina neural, especialmente en fotorreceptores (Coles et al., 2004). Por otra parte, en los explantes de retina de humanos (entre 14 y 80 años de edad), se ha observado una zona semejante a la CMZ con células con capacidad alta de proliferación después del tratamiento con EGF *in vitro*, lo que sugiere que la retina humana adulta sí posee potencial regenerativo (Bhatia et al., 2009). Existe cada vez más evidencia para sugerir que la retina periférica y la *pars plana* de monos adultos, así como de humanos, contienen células madre de la retina neural (Bhatia et al., 2009; Coles et al., 2004; Martínez-Navarrete et al., 2008; Mayer et al., 2005). Sin embargo, actualmente se carece de evidencias definitivas que sugieran la neurogénesis en la retina de primates y humanos.

En ratón se han descrito, además de las células progenitoras del epitelio ciliar y de la CMZ, otras células que son capaces de transdiferenciarse en células neuronales, pasando primero a un estado primario de desdiferenciación, a una célula más inmadura y una posterior diferenciación al linaje neuronal (Asami et al., 2007; Engelhardt et al., 2005; Wohl et al., 2012).

Los estudios en peces y aves, como hemos visto, han demostrado que lesiones en la retina hacen que las células de Müller se desdiferencien y expresen genes de células madre y progenitoras. Además, la capacidad de las células de Müller para adoptar un patrón de expresión génica de RPCs se correlaciona con su capacidad para regenerar neuronas después del daño. Por ello, varios grupos han llevado a cabo estudios sobre la retina dañada en ratas y ratones para determinar si también se produce el mismo desarrollo de células progenitoras a partir de células de Müller después de una lesión.

Se ha visto que las células de Müller así como los astrocitos de la retina de ratón, tanto *in vitro* como *in vivo*, adquieren características de células progenitoras. Karl et al. (2008) y Osakada et al. (2007) encontraron que sí se expresan marcadores de células progenitoras en células de Müller después de una lesión, tales como Pax6 así como componentes de la vía Notch y nestina.

A pesar de la evidencia de que después de una lesión se produce una estimulación mitótica y muchos genes de células progenitoras se vuelven a activar en las células de Müller de mamíferos, muchos de estos genes críticos en células progenitoras no parece que se reexpresen (Fig. 1.13). Esta parcial desdiferenciación de las células de Müller de mamífero contrasta con la reversión completa al fenotipo progenitor observado en vertebrados no mamíferos, y puede expli-

INTRODUCCIÓN

car en parte la regeneración muy limitada observada en mamíferos de sólo un subconjunto de neuronas de la retina. Los estudios en la retina humana indican que al menos una parte del perfil de expresión génica de las RPCs, por ejemplo SOX2 y Pax6, aparecen en células de Müller humanas (Karl and Reh, 2010).

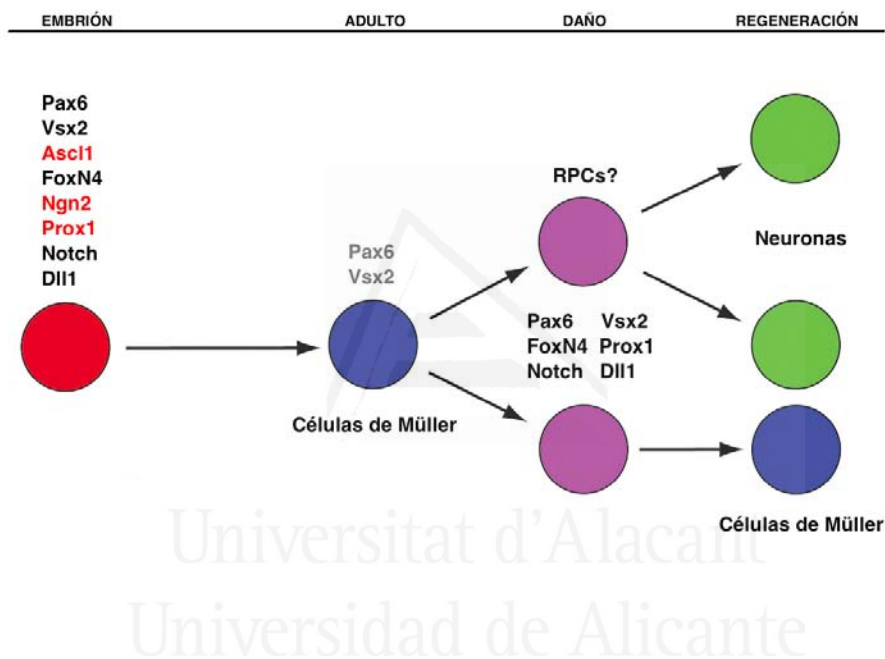


Figura 1.13: Esquema del proceso de desdiferenciación de la célula de Müller y posterior diferenciación a neurona o célula de Müller para la regeneración como respuesta a un daño causado en la retina adulta. Las células de Müller están mitóticamente en reposo y ya no expresan la mayoría de los genes de RPCs; sin embargo, después de una lesión, algunos de estos genes se reexpresan. Modificado de Karl and Reh (2010).

En la figura 1.14 A y B, podemos ver un resumen de todas las células madre y progenitoras neuronales identificados actualmente en las diferentes regiones del ojo de ratón, descritas por Wohl et al. (2012), células epiteliales pigmentadas de la retina, células del iris y cuerpo ciliar, ambas situadas en estructuras del tracto uveal, células del CMZ, así como células gliales de Müller, astrocitos, RSCs situadas en el nervio óptico y las células identificadas más recientemente, la microglía de la retina.

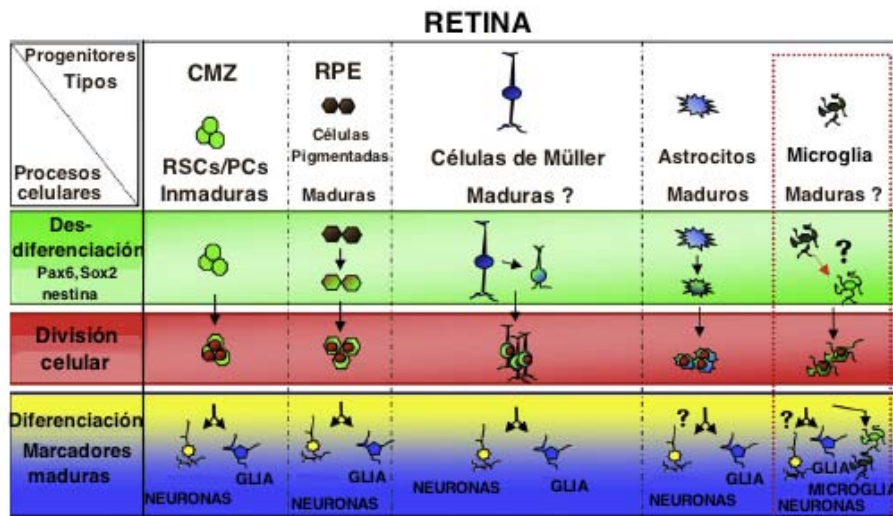


Figura 1.14 A: Células madre y progenitoras neurales en la retina de ratón adulto. Los colores indican los procesos analizados: desdiferenciación (cuadro verde), división celular (cuadro rojo), diferenciación en neuronas (cuadro amarillo) o glía (cuadro azul), o ambos (cuadro amarillo/azul). Modificada de Wohl et al. (2012).

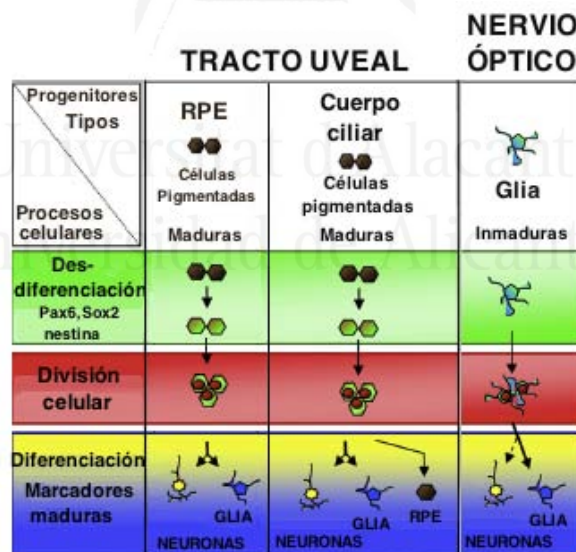


Figura 1.14 B: Células madre y progenitoras neurales en el tracto uveal y nervio óptico de ratón adulto. Los colores indican los procesos analizados: desdiferenciación (cuadro verde), división celular (cuadro rojo), diferenciación en neuronas (cuadro amarillo) o glía (cuadro azul), o ambos (cuadro amarillo/azul). Modificada de Wohl et al. (2012).

A éstas habría que añadir una población de células madre que se describen en el apartado siguiente.

1.3.3.4. Células VSELS

Además de las células madre multipotentes ya comprometidas al linaje de un tejido que hemos visto hasta ahora, en los órganos adultos pueden residir poblaciones de células madre más primitivas pluripotentes/multipotentes que expresan marcadores embrionarios de las primeras etapas del desarrollo, y algunas de estas células pueden incluso poseer el potencial de línea germinal ([Anjos-Afonso and Bonnet, 2007](#); [Atari et al., 2011](#); [Dyce et al., 2011](#); [McGuckin et al., 2005](#); [Roy et al., 2013](#); [Shirazi et al., 2012](#); [Suszynska et al., 2013](#)).

Se han aislado varios tipos de células primitivas no hematopoyéticas en médula osea (MO) adulta y se han descrito de varias maneras en la literatura como MAPCs, células Miami, MASCs, OmniCytes y VSELS. Es posible que todas estas células primitivas descritas y aisladas por diferentes técnicas experimentales sean las mismas, pero que dependiendo de la estrategia de aislamiento, el protocolo de expansión *ex vivo*, y de los marcadores empleados para su identificación, se les hayan dado diferentes nombres ([Suszynska et al., 2013](#)). La presencia de múltiples poblaciones de células madre en la MO podría ser el resultado de la migración de células madre durante la ontogénesis, propiciado por el ambiente permisivo de la MO que atrae a estas células ([Zuba-Surma et al., 2008b](#)).

El concepto propuesto hasta ahora de la plasticidad de las células madre, basado en el supuesto de que las células madre multipotentes comprometidas en los tejidos adultos (por ejemplo, las HSCs) podían trans-desdiferenciarse a células de otras capas germinales (por ejemplo, células neuronales), ha cambiado. Actualmente este concepto es rechazado por la mayoría de la comunidad científica, y se proponen explicaciones alternativas a este fenómeno de la plasticidad celular tales como la fusión celular o la presencia de poblaciones de células madre heterogéneas, aisladas en médula ósea, sangre de cordón umbilical y sangre periférica, células madre en muy pequeña cantidad, dotadas de más amplio potencial de diferenciación ([Howell et al., 2003](#); [Kassmer and Krause, 2013](#); [Kucia et al., 2006](#); [McGuckin et al., 2005](#); [Ratajczak et al., 2011](#)).

Mediante análisis por citometría de flujo, apoyado por otras técnicas, se ha demostrado que los tejidos murinos adultos pueden albergar una población

extremadamente pequeña que corresponde a células pluripotentes VSELs (del inglés *very small embryonic/epiblastic-like cells*) (Suszynska et al., 2013). Inicialmente fueron aisladas en MO murina (Kucia et al., 2008) pero posteriormente se ha comprobado la presencia de células que fenotípicamente corresponden a VSELs en múltiples órganos murinos (Zuba-Surma et al., 2008b). Tanto en humanos (HuVSELs) como en ratón (MuVSELs) las células VSELs se han identificado en la mayoría de los tejidos examinados, se han encontrado en la sangre del cordón umbilical (UCB), en sangre periférica movilizada (MPB) en gónadas, y en otros órganos sólidos, (Havens et al., 2013). Se trata de células muy pequeñas que no expresan CD45 ni tampoco marcadores de linaje hematopoyético (Lin), y expresan el antígeno Sca-1 (Havens et al., 2013; Suszynska et al., 2013). Las células VSELs Lin⁻ Sca-1⁺ CD45⁻ representan una población muy escasa en la MO (menos de 0,02 % de las células nucleadas) y expresan genes de células embrionarias o "Embryonic Stem Cells" (ESCs), incluyendo Oct4, Nanog, y el antígeno embrionario SSEA-1. Las células MuVSELs presentan un tamaño de 3 a 5 µm, mientras que las células humanas VSELs son ligeramente más grandes (4-10 µm). Muestran una morfología primitiva con una alta relación núcleo/citoplasma y presencia de eucromatina en los núcleos. Además, las células VSELs de humanos aisladas de UCB y MPB presentan el marcador CD133⁺, y las aisladas de gónadas fueron clasificadas como SSEA-4⁺. Las MuVSELs aisladas de MO presentan marcadores característicos de ESCs (Havens et al., 2013; Kucia et al., 2006; Suszynska et al., 2013; Zuba-Surma et al., 2008a).

Las células VSELs pueden dar lugar a los derivados de las tres capas germinales. Por lo tanto, las células VSELs pueden ser los principales candidatos para regenerar muchas estructuras diferentes. Estas células primitivas podrían ser una fuente potencial de copias de seguridad para las células madre comprometidas de los tejidos. Residen en los tejidos adultos y probablemente se activan o reclutan cuando se produce estrés o lesiones en los tejidos como intento de regenerar los órganos dañados (Havens et al., 2013).

En retina de ratón recién nacido, se ha aislado por separación celular, una población de células pequeñas semejantes a las VSELs, Lin⁻ Sca-1⁺ CD45⁻, que corresponden a un 1,5 % de la población celular de la retina. Son células madre que en cultivo, por medio de protocolos específicos, pueden diferenciarse a diferentes tipos celulares. Cuando se cultivan en condiciones análogas a las utilizadas para la formación de neuroesferas en RPCs, las VSELs se reprograman, silencian los genes de ESCs e inducen genes específicos de RPCs. Si

comparamos las VSELs derivadas de la médula ósea y las de la retina de ratón recién nacido, se observa que las células de la retina tienen inducidos los genes *Pax6* y *Otx2*, necesarios para el establecimiento temprano del campo del ojo, lo que implica que las células de la retina pueden estar más diferenciadas hacia linajes más comprometidos del ojo antes de la formación de esferas. Otro factor importante que induce la reprogramación hacia el linaje de retina es la presencia de suero fetal bovino en el medio de cultivo que lleva, de forma espontánea, a la diferenciación de las VSELs en células RPCs. Estas células, parece ser que permanecen en reposo durante la diferenciación de la retina, y por lo tanto no contribuyen al desarrollo normal de la misma. Sin embargo, muestran en cultivo un potencial de diferenciación alto ya que son pluripotentes, pudiendo dar lugar a células representativas de las tres capas embrionarias (Liu et al., 2009).

El hallazgo de VSELs pluripotenciales en la médula ósea y su presencia junto con las células madre adultas en distintos órganos, plantea la posibilidad que las VSELs embrionarias sean un reservorio para la generación de una mayor cantidad de progenitoras más comprometidas. Si en la retina de ratones recién nacidos se han encontrado células multipotentes VSELs, células que pueden diferenciarse en cultivo a células que presentan la morfología neuronal y que expresan marcadores de linajes de retina, podrían generar RPEs reparadoras de lesiones en este órgano (Liu et al., 2009).

Hay que resaltar que últimamente se ha planteado cierta controversia sobre la capacidad pluripotencial de estas células (Szade et al., 2014), principalmente en tejidos humanos, de forma que algunos autores han cuestionado su capacidad de regeneración (Danova-Alt et al., 2012; Miyanishi et al., 2013; Ratajczak et al., 2014; Suszynska et al., 2013; Szade et al., 2013). Por todo ello, se requieren más estudios para demostrar que las células identificadas como VSELs en múltiples tejidos son similares a las células de MO en su pluripotencia y si las células similares también están presentes en retina de adultos (Suszynska et al., 2013).

1.4. RECEPTORES TIPO TOLL

Los receptores tipo Toll (TLRs, del inglés *Toll-like receptors*), conforman una familia de receptores transmembrana de reconocimiento de patrones muy conservados evolutivamente. Reconocen estructuras denominadas patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs) como bacterias, virus, hongos

y parásitos (Mogensen, 2009).

Los MAMPs son moléculas muy conservadas en los microorganismos y ausentes en la célula de mamífero, de esta manera un número reducido de TLRs pueden reconocer una amplia variedad de microorganismos.

1.4.1. Receptores tipo Toll en la respuesta inmunitaria

La proteína Toll, fue identificada originalmente en *Drosophila melanogaster* como una molécula esencial en la determinación de la polaridad dorso-ventral durante la embriogénesis de la mosca (Hashimoto et al., 1988). Posteriormente, se describió la función de Toll en la respuesta inmunitaria en *D. melanogaster*, organismo que, sin presentar respuesta inmunitaria adquirida, es muy resistente a las infecciones microbianas debido a la capacidad de síntesis de péptidos antimicrobianos muy potentes. La deleción de Toll provoca en *D. melanogaster* un fenotipo inmunodeficiente caracterizado por la falta de expresión de diversos genes, incluyendo el gen que codifica para el péptido antifúngico drosomicina, y por una marcada susceptibilidad a infecciones por hongos y bacterias Gram positivas (Lemaitre and Hoffmann, 2007). El hallazgo de proteínas homólogas a la proteína Toll en mamífero planteó el estudio de su posible función en la respuesta inmunitaria innata (Medzhitov and Janeway, 1997). En 1990 se descubrió la primera proteína humana relacionada con los receptores Toll de *D. melanogaster* a la que se denominó TLR1 (Taguchi et al., 1996). En 1997 se caracterizó otra proteína de la familia TLRs en humanos (TLR4), a la que se implicó en la respuesta inmunitaria innata, ya que causaba la inducción de genes relacionados con citocinas y otras moléculas coestimuladoras (Medzhitov and Janeway Jr, 1997). Posteriormente se implicó al receptor TLR4 en la respuesta frente al lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas (Hoshino et al., 1999; Poltorak et al., 1998; Qureshi et al., 1999).

El descubrimiento de los TLRs marcó el comienzo de una nueva etapa en el estudio de la regulación de la respuesta inmunitaria frente a microorganismos patógenos. Las funciones de los TLRs como mediadores de la detección y la respuesta de las células inmunológicas a los patógenos invasores son bien conocidas (Takeda and Akira, 2004). La activación de los TLRs en las células del sistema inmunitario por patógenos o sus productos (MAMPs) inicia la respuesta innata caracterizada por la expresión de mediadores proinflamatorios y moléculas efectoras antimicrobianas (Kumar et al., 2009). Los TLRs también reconocen ligandos endógenos denominados patrones moleculares asociados a una lesión (DAMPs), y median la respuesta inflamatoria del huésped a las le-

siones y al estrés (Piccinini and Midwood, 2010). Las respuestas inflamatorias mediadas por TLRs iniciales son necesarias para la defensa del huésped contra los patógenos invasores y la reparación del tejido dañado. En la actualidad se han identificado 13 TLRs, aunque no todos son funcionales: del 1 al 9 son comunes en ratón y en humanos, TLR10 se ha encontrado sólo en humanos, y los TLRs del 11 al 13 están sólo en ratón (Takeda and Akira, 2004).

Los TLRs se expresan en células inmunitarias inmaduras, como los fagocitos profesionales, neutrófilos y macrófagos, así como linfocitos NK y otros tipos celulares (células endoteliales, células epiteliales, queratinocitos, mastocitos, etc.). Más recientemente se ha descrito que los TLRs también se expresan en las células madre y progenitoras hematopoyéticas, donde pueden tener una función moduladora de la hematopoyesis (Yáñez et al., 2009).

Aunque los TLRs participan principalmente en el reconocimiento de diferentes patógenos, como receptores inmunitarios, y en la inducción de una respuesta inmunitaria innata frente a ellos (Takeda and Akira, 2004), también están implicados en el desarrollo de la respuesta específica y en otras funciones no relacionadas con la respuesta frente a microorganismos patógenos, como enfermedades inflamatorias y autoinmunes (Barton and Medzhitov, 2002; Kawai and Akira, 2010; Kumagai et al., 2008; Zhang et al., 2004). Debido a que los TLRs reconocen patrones en lugar de moléculas específicas y que poseen capacidad para reconocer compuestos fisiológicos (Johnson et al., 2003; Ohashi et al., 2000; Okamura et al., 2001), están dotados de una capacidad innata para mediar una respuesta rápida a una amplia gama de señales en el microambiente y no sólo a los patógenos.

1.4.2. Receptores tipo Toll en las células madre hematopoyéticas (HSCs)

Los TLRs se han relacionado con los procesos de proliferación y diferenciación en distintos tipos de células madre y progenitoras, en concreto con las HSCs (Megías et al., 2012; Rolls et al., 2007; Yáñez et al., 2010). Desde el año 2006 se sabe que las HSCs y las células progenitoras expresan TLRs y sus ligandos pueden conducir a su diferenciación hacia progenitores mieloides, produciendo una repoblación rápida del sistema de inmunidad innata Nagai et al. (2006). Durante una infección es necesario repoblar las células del sistema inmunitario innato que se están consumiendo durante la respuesta a dicha infección. Este mecanismo es conocido como "mielopoyesis de emergencia", la cual puede resultar ser una monopoyesis (producción de monocitos o

macrófagos), granulopoyesis (producción principalmente de neutrófilos) o ambos, dependiendo de las características del microorganismo y de la severidad de la infección. Por otra parte nuestro grupo ha demostrado que *C albicans*, tanto levadura como hifas inactivas, estimulan directamente la proliferación y diferenciación de las HSCs hacia linajes mieloides *in vitro*, a través de la vía TLR2/MyD88 (Yáñez et al., 2010). La diferenciación de los fagocitos es funcional, internalizando las levaduras y secretando citocinas proinflamatorias (Yáñez et al., 2009).

1.4.3. Receptores tipo Toll en las células madre mesenquimales (MSCs)

Las MSCs están muy extendidas en organismos adultos y pueden estar implicadas en el mantenimiento y reparación de los tejidos, así como en la regulación de la hematopoyesis y la respuesta inmunológica. Los factores que controlan la renovación y la diferenciación de MSCs están relacionados con los TLRs (Waterman et al., 2010). Las MSCs adultas expresan receptores TLRs funcionales (Bunnell et al., 2010), cuya presencia se confirma por su respuesta a ligandos como Pam₃CSK₄, un ligando específico de TLR2, que aumenta la secreción de interleucina-6 por las MSCs, induce la traslocación del factor nuclear NF-κB, reduce la motilidad basal y aumenta la proliferación de las MSCs. El sello distintivo de la función de las MSCs es la capacidad de diferenciarse en varios linajes mesodérmicos. Pam₃CSK₄ inhibe la diferenciación de las MSCs en células osteogénicas, adipogénicas y condrogénicas. Por tanto, un ligando de TLRs puede antagonizar la diferenciación de las MSCs provocada por mediadores exógenos y mantener las células *in vitro*, en un estado no diferenciado y de proliferación. Parece pues, que los TLRs y sus ligandos pueden servir como reguladores de la proliferación y la diferenciación de las MSCs, pudiendo afectar al mantenimiento de la multipotencia de las mismas (Pevsner-Fischer et al., 2007).

1.4.4. Receptores tipo Toll en el sistema nervioso central (SNC)

Se han descrito funciones no inmunitarias de la familia de los TLRs tales como el establecimiento de la polaridad del eje dorso-ventral y el desarrollo axonal durante la embriogénesis de *D. melanogaster* (Anderson et al., 1985; Halfon et al., 1995; Hashimoto et al., 1988; Rose et al., 1997). Los TLRs se expresan en diversos tipos de células del SNC, endoteliales vasculares (Kong and Le, 2011), microglía, astrocitos, neuronas y NSCs (Okun et al., 2010).

Diversos estudios sugieren que las neuronas expresan un subconjunto de TLRs y que su activación promueve la degeneración neuronal en modelos experimentales (Okun et al., 2009). Se ha descrito que los TLRs juegan un papel importante en la infección del cerebro y las lesiones, y están involucrados en la neuropatía autoinmune y trastornos neurodegenerativos (Fischer and Ehlers, 2008; Okun et al., 2009; Rivest, 2009; Stenzel et al., 2008). En el SNC de mamíferos adultos, los TLRs, en concreto TLR4, regula la neurogénesis del hipocampo adulto, mientras que TLR2 aumenta la diferenciación de células progenitoras neuronales *in vitro* (Rolls et al., 2007). En el desarrollo del cerebro de los mamíferos, miembros de la familia de los TLRs, TLR3 y TLR8, se identificaron como reguladores negativos del crecimiento axonal (Cameron et al., 2007; Ma et al., 2006). Por el contrario, se encontró que TLR4 estaba ausente en las neuronas durante las etapas de desarrollo de la formación del SNC (Lehnardt et al., 2003), sin embargo, con la edad, sus niveles de expresión aumentaban (Wadachi and Hargreaves, 2006). También se ha descrito el papel de TLR3 como un regulador negativo de las células progenitoras neurales cultivadas en el cerebro en desarrollo (Lathia et al., 2008).

Aunque su función en el sistema ocular se ha atribuido comúnmente a la respuesta inmunitaria (Chang et al., 2006; Kumar et al., 2004), puesto que la retina es una parte de SNC, es lógico suponer un papel similar de los TLRs al que desempeñan en el cerebro. En la retina, la expresión de TLRs se ha confirmado en células ganglionares, fotorreceptores, RPCs, y también en las células gliales, como los astrocitos, microglía y, por último, en las células de Müller (Jiang et al., 2009; Kumar and Shamsuddin, 2012; Kumar et al., 2004; Langmann, 2007; Okun et al., 2011; Shamsuddin and Kumar, 2011; Shechter et al., 2008). TLR4 se expresa en células del cuerpo ciliar del ojo de los mamíferos (Brito et al., 2004). También se ha descrito que TLR4 es un regulador negativo de proliferación de RCPs y se ha demostrado que, en el periodo postnatal temprano, TLR4 inhibe la proliferación de células de la retina que expresan marcadores de progenitoras. En el adulto TLR4 también inhibe la proliferación de células progenitoras neurales (Shechter et al., 2008). A pesar de que algunos estudios han descrito la expresión de TLRs en la retina (Ebihara et al., 2007; Kumar et al., 2010; Luo et al., 2010; Shamsuddin and Kumar, 2011), se sabe relativamente poco sobre su papel en este órgano. No se ha realizado una caracterización completa de la expresión de los TLRs y de su capacidad de respuesta a ligandos en células de la retina. En conjunto, las funciones que se han atribuido recientemente a los TLRs en el SNC de los mamíferos, los cambios en el patrón de expresión de TLRs con el desarrollo

y las pruebas de expresión de TLR4 en el cuerpo ciliar de la retina, un lugar conocido por albergar RPCs, plantean la posibilidad de que los TLRs puedan desempeñar un papel en la retina de mamíferos en la determinación del destino de RPCs (Shechter et al., 2008). Por lo tanto, los TLRs están implicados en la proliferación de células madre y progenitoras, desempeñando una función en la regulación de los procesos de neurogénesis y crecimiento de neuronas, es decir en la plasticidad neuronal (Okun et al., 2011).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Capítulo 2

OBJETIVOS

De acuerdo con los antecedentes expuestos en la introducción, los objetivos generales de esta tesis doctoral son los siguientes:

1. Estudio de la expresión y funcionalidad de receptores tipo Toll en células madre y progenitoras de retina de ratón adulto:
 - a) Identificación y cultivo de células retina de mamíferos adultos con características de células progenitoras.
 - b) Estudio de la expresión de TLRs en las células progenitoras analizadas.
 - c) Estudio de la funcionalidad de TLRs en estos tipos celulares.
2. Obtención de una línea celular con características de células progenitoras a partir de retinas de ratón adulto:
 - a) Obtención de una línea celular estable con características de células progenitoras.
 - b) Caracterización de la línea celular obtenida.
 - c) Estudio de la expresión y funcionalidad de distintos receptores de tipo Toll en la línea celular.
 - d) Análisis de la utilidad de la línea celular como modelo de estudio de sustancias neuroprotectoras.

Capítulo 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Animales utilizados

Los experimentos se realizaron utilizando ratones C57BL/6J machos, de 2-4 meses de edad, adquiridos a Harlan Ibérica (Barcelona, España). Se utilizaron también retinas de ratones TLR2^{-/-} con base genética de ratones C57BL/6J, cedidos por el doctor Akira (Universidad de Osaka, Osaka, Japón). Los animales fueron cuidados y mantenidos en condiciones libres de patógenos en los Servicios Centrales de la Universidad de Valencia.

El cuidado y la utilización de los animales se llevó a cabo en estricta conformidad con las recomendaciones contenidas en el "Real Decreto 1201/2005, BOE 252" para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Ministerio de la Presidencia, España. Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales. Se utilizaron retinas de dichos ratones siguiendo el procedimiento A1264596506468 aprobado por el comité de experimentación y bienestar animal de la Universitat de València.

3.2. Extracción de retinas

Para la extracción de las retinas, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Tras rociar el animal con etanol al 70 %, se extrajeron los ojos y se colocaron en un eppendorf con solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril (Tabla 6, pag. 69). A continuación, se utilizó una placa de Petri con una superficie de color que nos aporta contraste donde se colocó cada ojo, dentro de una gota pequeña de PBS estéril.

MATERIALES Y MÉTODOS

Utilizando instrumental quirúrgico estéril y una lupa para observar mejor la estructura del ojo, se realizó una incisión en el globo ocular y se seccionó la parte anterior, eliminando la córnea, el iris, el cristalino y el vítreo, dejando expuesta la retina. A continuación se extrajo la retina utilizando una pinzas evitando en la medida de lo posible su rotura y se colocaron en un nuevo ependof con PBS estéril o medio de cultivo, según su uso posterior.



Figura 3.1: Esquema de la extracción de la retina de ratones adultos.

3.3. Obtención de células linaje negativo a partir de retinas adultas

La purificación de células Lin^- se realizó partiendo de retinas procesadas como se indica en el apartado 3.2. A continuación, las células de las retinas se disgregaron con ayuda de una pipeta y se incubaron con un cóctel de anticuerpos monoclonales anti-linaje (Miltenyi Biotec, Madrid, Spain) conjugados con biotina y específicos de diferentes poblaciones de células hematopoyéticas maduras: CD5, CD45R(B220), CD11b, Gr-1 (Ly-6C/G), 7-4 y Ter-119. Se incubó con $1 \mu\text{L}$ de dicho cóctel durante 15 minutos a 4°C . Seguidamente se incubaron con un anticuerpo anti-biotina conjugado con microesferas magnéticas, también a 4°C durante 15 minutos. Tras el marcaje, las células se lavaron y se pasaron a través de una columna acoplada a un sistema magnético. Las células se separaron mediante selección inmunomagnética negativa: las células marcadas Lin^+ quedaron retenidas en la columna, mientras que las no marcadas Lin^- pasaron a través de ella y fueron recuperadas en tampón de purificación (Tabla 6, pag. 69).

3.4. Análisis mediante citometría de flujo

3.4.1. Preparación de las células y marcaje con anticuerpos

Las retinas extraídas se disgregaron con suavidad con una pipeta y se filtraron a través de un filtro de 30 μm (BD Biosciences) para evitar los agregados de células. A continuación, las células filtradas se centrifugaron a 2000 rpm durante 4 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en PBS (Tabla 6, pag. 69), en una cantidad de 90 μL por cada 6 retinas aisladas. Seguidamente se añadió agente bloqueante al 10 % (FcR blocking solution, Milteny Biotec) y se incubó durante 10 minutos a 4^o C. Entonces las células se marcaron durante 20 minutos a 4^o C con los anticuerpos adecuados en cada caso, tal y como se indica en la Tabla 1, pag. 56. Tras el marcaje, las células se lavaron con 800 μL de PBS, se centrifugaron y se resuspendieron de nuevo en 400 μL de PBS para su análisis mediante citometría de flujo. A las células que tras la extracción y disgregación de las retinas se cultivaron con estímulos, se les cambió el medio cada 10 días y trascurrido el tiempo estimado, se despegaron de sus respectivos pocillos suavemente con la punta de una pipeta, se centrifugaron a 2000 rpm durante 4 minutos y se procedió a su marcaje de igual manera.

3.4.2. Análisis de células con fenotipo "Side Population" (SP)

Las células totales disgregadas de la retina, se tiñeron con el colorante vital Hoechts 33342 (Molecular probes, Life technologies) a una concentración final de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubaron en un baño con agitación a 37^o C durante una hora. A continuación las células se analizaron por citometría de flujo y se localizó la población SP en el histograma biparamétrico obtenido.

3.4.3. Separación celular mediante citometría de flujo

Las células obtenidas como se ha descrito en los apartados anteriores (3.2 y 3.3) fueron doblemente marcadas con el anticuerpo anti-Sca-1 conjugado con el fluorocromo APC y el anticuerpo anti-CD45 conjugado con FITC (Tabla 1, pag. 56). Las células positivas para el marcador Sca-1 y negativas para el marcador CD45 ($\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{CD45}^-$) fueron seleccionadas en una región, separadas y recogidas utilizando un separador celular MoFlo Legacy y el programa de adquisición Summit (Beckman Coulter). Las células se recogieron en medio Lin^- (Tabla 6, pag. 69) y se incubaron a 37 ^oC, con un 5 % de CO_2 .

3.4.4. Anticuerpos utilizados en citometría de flujo

En los análisis por citometría de flujo se utilizaron los anticuerpos que se indican en la Tabla 1, pag. 56 y sus respectivos controles isotípicos. Los anticuerpos se adquirieron en eBioscience (San Diego, CA, EE.UU.) y en Milteny Biotec (Madrid, Spain) según se indica. En algunas ocasiones para observar mejor la población de células se marcaron con el colorante vital intercalante del ADN, Hoechst 33342 (Molecular Probes, Life technologies), para identificar la población celular del resto del debrís, el cuál, al no tener ADN, no aparece marcado.

CITOMETRÍA DE FLUJO			
ANTICUERPO	ISOTIPO	FLUOROCROMO	CASA COMERCIAL
Anti-Sca-1 (Stem cell antigen-1) clon D7	IgG _{2a} de rata	APC Alofococianina	Miltenyi Biotec
Anti-CD45 Panleucocitario	IgG _{2a} de ratón	FITC Isocianato de Fluoresceína	Miltenyi Biotec
Anti-TLR2 (CD282) Clon T2.5	IgG ₁ de ratón	PE Ficoeritrina	eBiosciencie
Anti-TLR4 (CD284) Clon MTS510	IgG _{2a} K de rata	PE Ficoeritrina	eBiosciencie
Anti-CD11b Integrina α_M Mac-1 α Clon M1/70	IgG _{2b} K de rata	FITC Isocianato de Fluoresceína	eBiosciencie

Tabla 1: Anticuerpos utilizados en los ensayos de citometría de flujo.

3.4.5. Equipos y programas utilizados para el análisis de células mediante citometría de flujo

La adquisición de las muestras se realizó utilizando los citómetros FACS-Canto equipado con los láseres: Azul (488nm) y rojo (647 nm) (BD Biosciences) y LSRFortessa equipado con los láseres: Azul (488 nm), yellow-green (561 nm),

rojo (633 nm) y UV (375 nm) (BD Biosciences). Los datos se adquirieron con el software FACSDiva 6 y FACSDiva 7, respectivamente de cada equipo de análisis. Posteriormente se utilizó el programa de análisis FlowJo (FlowJo LLC, Data Analysis Software, Ashland, Oregon).

3.5. Ligandos de los TLRs

Como estímulo de los TLRs, se utilizaron los siguientes agonistas: el ligando puro de TLR2, Pam₃CSK₄ (0,125 µg/mL; Invivogen, San Diego, CA, USA) y el ligando puro de TLR4, Lipopolisacárido ultra puro de *Echerichia coli* (LPS) (1 µg/mL; Invivogen).

También se utilizó la especie fúngica *Candida albicans* inactivada, cepa ATCC 26555 en forma de levadura o de hifas (proporción 5/1, levaduras/células murinas). Las cepas inactivadas de *C. albicans* se obtuvieron con el método descrito por nuestro grupo de investigación (Murciano et al., 2007). En primer lugar se crecieron levaduras hasta fase exponencial tardía de crecimiento (DO_{600nm} 0,6-0,8) en medio YPD líquido estéril y libre de endotoxina (Tabla 7, pag. 70), a 28° C con agitación. El crecimiento celular se valoró midiendo la densidad óptica (DO) a 600 nm en un espectrofotómetro Helios (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Tras el cultivo, las células fueron recogidas por centrifugación, lavadas con PBS estéril, resuspendidas en el mismo volumen de agua estéril, libre de endotoxina, y mantenidas durante 3 horas a 28° C con agitación (periodo de ayuno metabólico o estrés nutricional) y a continuación durante 48 horas a 4° C en reposo. Posteriormente, estas células se recogieron por centrifugación y se inocularon en medio Lee (en un volumen 5 veces superior al utilizado en la incubación con agua) libre de endotoxina, estéril y precalentado (Tabla 7, pag. 70). Los cultivos fueron incubados durante 3 horas con agitación a 28° C, para obtener levaduras, o a 37° C, para obtener hifas. Tras la incubación, las células se lavaron dos veces con PBS estéril y se determinó el número de células para realizar el tratamiento de inactivación por fijación. Para ello, las células se resuspendieron a una concentración de 20 × 10⁶ células/mL en tampón de fijación ("IC Fixation Buffer", eBioscience), que contiene paraformaldehído al 4% y se mantuvieron en agitación durante 30 minutos. Por último, tras el tratamiento de inactivación las células se lavaron dos veces con PBS estéril para eliminar el agente inactivante y se determinó la concentración celular. Las células se guardaron en alícuotas en forma de sedimento seco a -80° C hasta su utilización. En los experimentos con células viables de la misma cepa, se utilizaron levaduras en ayuno metabólico, obteni-

das tal y como se ha descrito anteriormente, lavadas con PBS estéril, libre de endotoxina y resuspendidas a la concentración adecuada.

3.6. Medida de la proliferación celular

Para analizar la proliferación de las células tras la incubación en presencia de distintos estímulos, se utilizaron dos técnicas:

1. Recuento microscópico. Se cuantificó el número de células mediante recuento en cámara Neubauer. A partir del número de células contadas, conociendo el volumen de líquido que admite el campo de la cuadrícula, se calculó la concentración de células de la muestra: $\text{partículas} / \mu\text{L} = (\text{partículas contadas}) / [(\text{superficie contada (mm}^2) \cdot \text{profundidad de la cámara (mm)}) \cdot \text{dilución}]$.
2. Medida indirecta mediante el ensayo de XTT. La técnica permite analizar de una forma directa la viabilidad celular y de una manera indirecta, medir la proliferación celular. Se trata de un ensayo colorimétrico, de cuantificación espectrofotométrica que se basa en la degradación de las sales de tetrazolio XTT {2,3-bis (2-methoxy - 4 - nitro - 5 - sulfophenyl) - 5 - [(phenylamino)carbonyl] - 2H - tetrazoliumhydroxide} a sales de formazán, mediante la acción de las deshidrogenadas mitocondriales, que se producen de forma natural cuando las células son viables. El método permite pues cuantificar la proliferación celular durante 24 horas por medio de una medida espectrofotométrica directa en un lector de placas. El número de células presente en cada pocillo correlaciona con la capacidad de reducir la sal de tetrazolio (XTT) a un producto coloreado y soluble por la actividad enzimática mitocondrial de las células vivas ([Meshulam et al., 1995](#)).

3.7. Obtención de una línea celular a partir de retinas de ratón adulto

Para obtener un cultivo de células progenitoras de retina a partir de ratones C57BL/6J adultos, se siguió el método descrito por [Hicks y Courtois \(1990\)](#) y modificado por [Florian et al \(2008\)](#) para la purificación y cultivo de células de Müller, ya que está descrito que estas células en cultivo pueden inmortalizar de forma espontánea y dar lugar a líneas celulares estables con características

de células progenitoras.

Se utilizaron animales macho de 2 meses de edad. Se extrajeron los ojos y se mantuvieron durante toda la noche a 4° C en oscuridad, en DMEM (GlutaMAXTM 4,5 g/L de glucosa) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor y con penicilina/estreptomicina al 1% (Gibco, Life technologies). Las retinas se extrajeron según se ha descrito en el apartado 3.2. y se diseccionaron con cuidado, cortándolas en pequeños fragmentos no mayores de 1 mm². A continuación se cultivaron en DMEM suplementado, en un incubador al 5% de CO₂ y a 37° C (Fig 3.2). Las células se cultivaron en estas condiciones, cambiando el medio cada tres días. Se realizaron pases cuando las células alcanzaron la semiconfluencia.

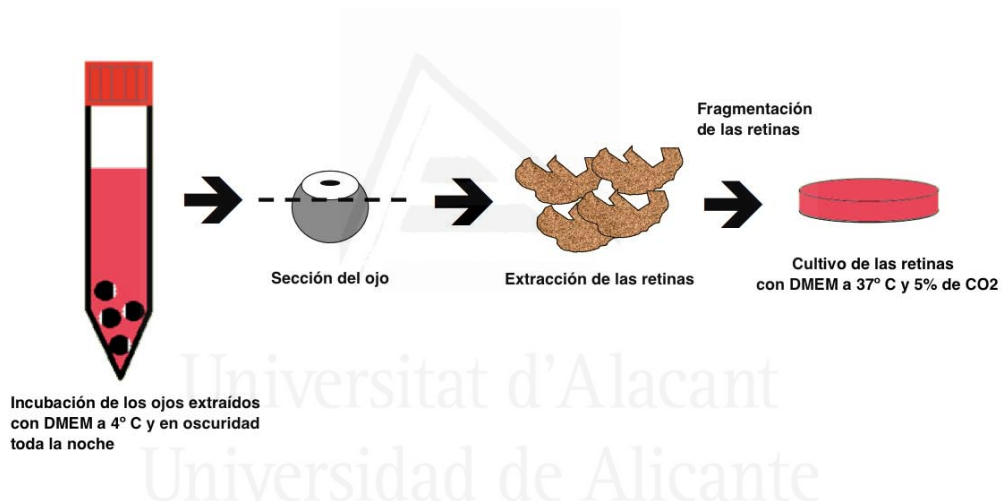


Figura 3.2: Pasos para la obtención de un cultivo celular de células progenitoras a partir de retinas de ratón.

3.8. Obtención de neuroesferas

Para evaluar la capacidad de formación de neuroesferas por las células se siguió el método descrito en la bibliografía, expuesto inicialmente por Florian et al. (2008) con ligeras modificaciones.

Se cultivaron células de Müller murinas aisladas previamente, en medio sin suero fetal bovino (DMEM/F-12 que contenía penicilina/estreptomicina; Gibco, Life Technologies), suplementado con factor de crecimiento epidérmico 30

MATERIALES Y MÉTODOS

ng/mL (EGF; Sigma-Aldrich). La densidad inicial fue de 50.000 células/cm². Las células se cultivaron en placas de cultivo celular recubiertas de laminina y poli-L-ornitina (Sigma-Aldrich). El medio de cultivo se cambió cada tres días. Las neuroesferas aparecieron a partir del quinto día de cultivo y el número se incrementó durante tres semanas. El recuento de neuroesferas se realizó en pocillos de placas de 12 pocillos, contando un mínimo de dos pocillos en cada experimento y en un total de tres experimentos independientes.

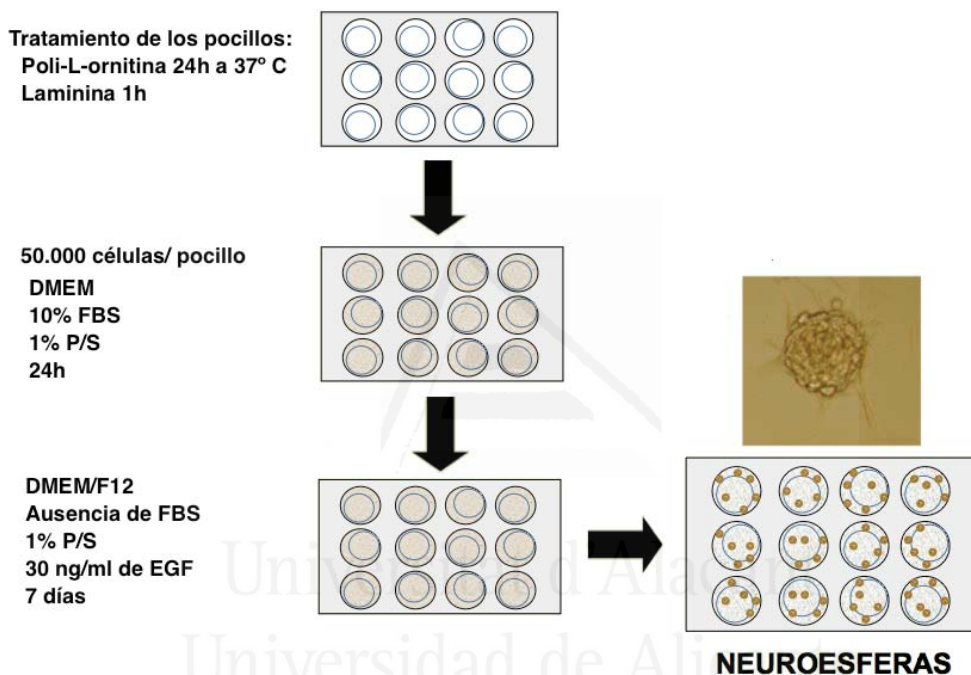


Figura 3.3: Esquema del proceso seguido para la obtención de neuroesferas a partir de la línea celular procedente del cultivo celular.

3.9. Aislamiento de ARNm y PCR

El ARNm de las células se aisló utilizando el Kit MicroPoly (A) Purist™ (Ambion) según las instrucciones del fabricante. Los posibles restos de ADN se eliminaron utilizando ADNasa I (Invitrogen).

La transcripción inversa se realizó con 1 µg de ARN total en presencia de oligo dT (Fermentas, Glen Burnie, MD), 1 mM de dNTPs (Fermentas), 20 U de inhibidor de ribonucleasa (Fermentas), 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM

KCl, 4 mM MgCl₂, 10 mM ditioneitol y 200 U de transcriptasa inversa (RT; RevertAid™ M-MuLV transcriptasa inversa, Fermentas), a 42° C durante 60 minutos. Se añadieron controles negativos sin retrotranscriptasa. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada gen estudiado en la reacción de PCR (Tabla 2, pag 62 y Tabla 3, pag 63). El ADNc se amplificó mediante PCR bajo condiciones estandarizadas: un primer paso de desnaturalización a 94° C durante 2 minutos, seguido por 35 ciclos de tres pasos: un paso de desnaturalización a 94° C durante 30 segundos cada uno; 1 minuto a la temperatura de hibridación adecuada según los oligonucleótidos empleados y 1 minuto a 72° C, seguidos de un paso de elongación final a 72° C durante 15 minutos. En todas las amplificaciones se añadió un control negativo sin ADNc. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%. Todos los cebadores se probaron utilizando ADNc de retina total como control positivo.

Para realizar las PCRs semicuantitativas, se optimizaron las condiciones de amplificación y el número de ciclos para cada par de oligonucleótidos empleados (25 ciclos para β -actina, 35 ciclos para TLR2 y TLR6). Para cada gen, se realizaron tres amplificaciones de PCR independientes y los datos de cada amplificación se relativizaron a la señal de β -actina, la cual se amplificó también por triplicado. Cada experimento independiente se realizó al menos dos veces. El análisis y cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó mediante el programa informático Adobe Photoshop®.

3.10. Oligonucleótidos

Se utilizaron oligonucleótidos que amplifican de forma específica marcadores de células neurales y progenitoras: Nestina, Abcg-2, α -tubulina, β -III-tubulina, Ascl1 y Notch1, así como característicos de células gliales: Vimentina, glutamín sintetasa, S-100. Además, se analizó la expresión de otros marcadores característicos de diferentes tipos celulares, para descartar la contaminación del cultivo con otros tipos de células como astrocitos (GFAP), microglía (CD11b), células bipolares (CHX10), células amacrinas (Pax6), células endoteliales (CD31) o epitelio pigmentario de la retina (CRALBP) (Tabla 2, pag. 62). Como control se utilizaron oligonucleótidos específicos de la β -actina. Con el fin de analizar la expresión de los receptores de sodio dependientes de voltaje, así como de los TLRs, se utilizaron oligonucleótidos específicos que se indican en la Tabla 3, pag. 63.

MATERIALES Y MÉTODOS

OLIGONUCLEÓTIDOS I		
GEN	SECUENCIA	REFERENCIA
Abcg2	F:CCATAGCCACAGGCCAAAGT R:RGGGCCACATGATTCTTCCAC	Florian et al. (2008)
Ascl1	F:GAGAGCTCTGGCAAGATG R:AAGCCGCTGAAGTTGAGC	Este trabajo
α-tubulina	F:GCGTGAGTGCATCTCCATC R:CTGGAGACCTGTGCACTG	Gomez-Vicente et al. (2013)
α-actina	F:CCTAAGGCCAACCGTGAAAAG R:TCTTCATGGTGCTAGGAGCCA	Nagai et al. (2006)
β-III-tubulina	F:TGAGGCCTCCTCTCACAAGT R:CGCACGACATCTAGGACTGA	Florian et al. (2008)
CD31	F:ACTAGCTGAGTGCTTCAGTCTA R:CCCATTTCATCACCTCCCATGAT	Este trabajo
Chx10	F:CGGCCAGTGAGTTGTTGATTT R:ACAGAAAACAGGACAGAAATTATGC	Este trabajo
CRALBP	F:TACCCTGGTGTCTTTCCAG R:GGTTTCCTCATTTTCCAGCA	Florian et al. (2008)
GFAP	F:CACGAACGAGTCCCTAGAGC R:ATGGTGATGCGGTTTTCTTC	Florian et al. (2008)
Nestina	F:AACTGGCACACCTCAAGATGT R:TCAAGGGTATTAGGCAAGGGG	Zahir et al. (2006)
Notch1	F:TGTGCACACCATCCTGC R:CAATCAGAGATGTTGGAATGC	Florian et al. (2008)
Pax6	F:AGTTCTTCGCAACCTGGCTA R:TGAAGCTGCTGCTGATAGGA	Florian et al. (2008)
Recoverina	F:ATGGGGAACAGCAAGAGCGG R:GAGTCCGGGAAAACTTGAATA	Florian et al. (2008)
Rhodopsina	F:TCA CCACCACCCTCTACACA R:TGATCCAGGTGAAGACCACA	Florian et al. (2008)
Vimentina	F:ATGCTTCTCTGGCACGTCTT R:AGCCACGCTTTCATACTGCT	Florian et al. (2008)
β-actina	F:CCTAAGGCCAACCGTGAAAAG R:TCTTCATGGTGCTAGGAGCCA	Nagai et al. (2006)

Tabla 2 : *Oligonucleótidos utilizados para la caracterización de la línea celular.*

OLIGONUCLEÓTIDOS II		
TLRs	SECUENCIA	REFERENCIA
TLR1	F:CAATGTGGAAACAACGTGGA R:TGTAAC TTTGGGGGAAGCTG	Renshaw et al. (2002)
TLR2	F:AAGAGGAAGCCCAAGAAAGC R:CGATGGAATCGATGATGTTG	Renshaw et al. (2002)
TLR4	F:ACCTGGCTGGTTTACACGTC R:CTGCCAGAGACATTGCAGAA	Renshaw et al. (2002)
TLR6	F:TTCCCAATACCACCGTTCTC R:CTATGTGCTGGAGGGTCACA	Renshaw et al. (2002)
Nav 1.1	F:AAGTTGAGTTCGAAGAGTGC R:TACTGTTGCGTCGCT-CTC	Este trabajo
Nav 1.2	F:GGCTTCCGGTTTTCCCTAG R:ATTCATGGG-TAGAGTGGGTATC	Este trabajo
Nav 1.6	F:AGGAGCTCATCTGAGCTG R:CCTCACTTTC-CTCCACTG	Este trabajo
Nav 1.9	F:GGAACAGCGATAGCGCC R:ACCCGGAACATGGC-GAG	Este trabajo

Tabla 3: *Oligonucleótidos utilizados en este trabajo, específicos de TLRs y canales de Na⁺ dependientes de voltaje.*

En las Tablas 2 y 3 se indican las referencias en las que se basó el diseño de los oligonucleótidos.

3.11. Análisis de expresión de proteínas mediante Western blot.

El análisis de la expresión de proteínas de interés mediante Western blot se realizó siguiendo las técnicas estándar que se describen a continuación: Las células se despegaron de los frascos de cultivos mediante un raspador y fueron resuspendidas en tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % NonidetP-40 (NP40), 0.25 % sodium deoxycholate) con inhibidores de proteasa (complete EDTA-free; Roche, Mannheim, Germany) y fosfatasa (PhoStop; Roche) según las instrucciones del fabricante. Tras incubar en hielo 15 minutos, las células se centrifugaron durante 10 minutos a 10.000 g y 4° C. La concentración de las proteínas se calculó mediante el kit Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, USA), utilizando albúmina bovina como patrón. Las proteínas se diluyeron con el tampón de Laemmli (4 % SDS, 100 mM dithiothreitol, 20 %

MATERIALES Y MÉTODOS

glycerol, 0.004 % bromophenol blue, 125 mM Tris-HCl, pH 6.8) y se separaron en geles SDS-PAGE al 8-10 %. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Roche) a 200 mA durante 4 horas. Las muestras transferidas se bloquearon con leche desnatada en polvo al 5 % en Tris-buffered saline, 0.1 % Tween-20 (TBS/T, pH 7.6), durante 1 hora a temperatura ambiente.

WESTERN BLOT			
ANTICUERPO	ISOTIPO	CASA COMERCIAL	CANTIDAD
Anti-nestina	IgG de ratón Primario	MAB 353, Chemicon, Millipore, Temecula, CA, EE.UU	1:100
Anti-β-III-tubulina	IgG de ratón Primario	MMS-435P Covance, Emeryville, CA, EE.UU	1:100
Anti-ABCG2	IgG de rata Primario	Ab24115, Abcam, Cambridge, Reino Unido	1:25
Anti-vimentina	IgG de ratón Primario	M0725, Dako, Glostrup, Dinamarca	1:100
Anti-CRALBP	IgG de ratón Primario	Ab15051, 330 Abcam, Cambridge, Reino Unido	1:100
Anti-ratón	IgG Secundario	Santa Cruz Biotechinc	1:1000
Anti-rata	IgG Secundario	Santa Cruz Biotechinc	1:1000

Tabla 4: *Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en los ensayos de Western blot.*

Las membranas se incubaron a 4° C durante toda la noche con la concentración adecuada de anticuerpo primario. Tras tres lavados de 5 minutos cada una con TBS/T las membranas se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa (dilución 1:1000, Santa Cruz Biotechinc) durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente se lavaron de nuevo tres veces con TBS/T y se sumergieron brevemente en PBS. A continuación se revelaron las membranas con el kit Lumi-light western blotting substrate (Roche). Como control de carga se utilizó la proteína de gliceraldehido-3-fosfato

deshidrogenasas (GAPDH 1:20000, Sigma). En todos los ensayos se incluyeron controles negativos sin anticuerpo primario. Los anticuerpos utilizados se indican en la Tabla 4, pag 64.

3.12. Ensayos de inmunocitoquímica

INMUNOFLUORESCENCIA			
ANTICUERPO	ISOTIPO FLUOROCROMO	CASA COMERCIAL	CANTIDAD
Anti-nestina	IgG de ratón Primario	MAB 353, Chemicon, Millipore, Temecula, CA, EE.UU	1:100
Anti-β-III-tubulina	IgG de ratón Primario	MMS-435P Covance, Emeryville, CA, EE.UU	1:100
Anti-Abcg2	IgG de rata Primario	Ab24115, Abcam, Cambridge, Reino Unido	1:25
Anti-vimentina	IgG de ratón Primario	M0725, Dako, Glostrup, Dinamarca	1:100
Anti-GFAP	IgG de conejo Primario	N1506, Dako	1:100
Anti-opsina azul	IgG de conejo Primario	AB5407 Chemicon	1:100
Anti-opsina rojo/verde	IgG de conejo Primario	AB5405 Chemicon	1:100
Anti-melanopsina	IgG de conejo Primario	PAI-780 Afinidad BioReagents, Golde, Co, EE.UU	1:100
Anti-ratón	IgG Secundario Alexa Fluor 488	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, EE.UU	1:100
Anti-rata	IgG Secundario Alexa Fluor 488	Jackson ImmunoResearch Laboratories	1:100
Anti-conejo	IgG Secundario Alexa Fluor 488	Jackson ImmunoResearch Laboratories	1:100

Tabla 5: *Anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunofluorescencia.*

Para realizar los experimentos de inmunocitoquímica, primero se cultivaron las células en cubreobjetos hasta llegar a semiconfluencia. A continuación se

lavaron con PBS y se fijaron durante 20 minutos con 4 % (w/v) de paraformaldehído en PBS a 4° C. Las células se permeabilizaron con 0,1 % (v/v) de Triton X-100 en PBS durante 20 minutos. La unión no específica se bloqueó por medio de la incubación con 1 % (w/v) de albúmina de suero fetal bovino en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras el bloqueo las células se incubaron con anticuerpos primarios, en la misma solución de bloqueo, durante la noche a 4° C en una cámara húmeda. Tras realizar tres lavados de 5 minutos en PBS, se incubó con el anticuerpo secundario, durante 2 horas a temperatura ambiente.

Las células se observaron en un microscopio confocal (Leica TCS SP2, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). En todos los casos se incluyeron controles negativos que carecían de anticuerpos primarios, secundarios o de ambos. Los anticuerpos utilizados se indican en la Tabla 5, pag. 65.

3.13. Medida del calcio intracelular

La sensibilidad a la luz de las células MU-PH1 se analizó midiendo el incremento de Ca^{2+} libre intracelular como respuesta a un estímulo luminoso, en células previamente marcadas con la sonda fluorescente Fluo-4. Esta sonda se une al Ca^{2+} de forma selectiva y reversible, cambiando el espectro de emisión y la señal de fluorescencia, permitiendo así su cuantificación mediante el sistema de detección adecuado.

Las células se incubaron en medio de cultivo en presencia del marcador Fluo-4 acetoxi metil ester (Fluo-4 AM; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) a una concentración de 10 μM durante 45 minutos en oscuridad. Después de un lavado exhaustivo con medio de cultivo, las células se estimularon con luz de 480 nm durante un periodo de 10 minutos. La emisión de fluorescencia se monitorizó a 510 nm. El nivel de concentración libre de Ca^{2+} intracelular se midió como la relación entre el cambio de fluorescencia con el tiempo y la fluorescencia medida al comienzo de la estimulación con la luz ($\Delta F/F_0$). Como blancos de estímulo se utilizaron células sin cargar con la sonda fluorescente.

Las determinaciones de fluorescencia se realizaron utilizando un sistema de microscopía de fluorescencia convencional (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) acoplado a un ordenador, utilizando el programa Leica MM AF (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

3.14. Estudio del efecto de toxinas de los canales de sodio dependientes de voltaje sobre la viabilidad celular

La funcionalidad de los canales de Na^+ dependientes de voltaje se analizó mediante el estudio del efecto de la incubación con veratridina (Sigma Aldrich). La veratridina es un alcaloide que se obtiene a partir de extractos de las plantas *Schoenocaulon officinale* y de *Veratrum album*. La veratridina bloquea los canales de Na^+ en su estado abierto, impidiendo su inactivación, y causando una despolarización sostenida. Como consecuencia de ello aumentan los niveles intracelulares de Na^+ y Ca^{2+} . Esta sobrecarga catiónica termina produciendo la muerte celular ([Maroto et al., 1994](#)).

Los experimentos se realizaron con células de la línea MU-PH1 en los pases 14 a 29, en placas de 96 pocillos, con 8 pocillos para cada condición experimental, en cada uno de los ensayos. La veratridina se aplicó a distintas concentraciones (entre 5 y 100 μM), y se mantuvo durante 24 horas en medio DMEM-GlutamaxTM, 4,5 g de glucosa, sin suero fetal bovino, basándonos en datos de la bibliografía ([Nicolau et al., 2009,1](#)). La viabilidad celular se midió mediante el ensayo de XTT (Cell proliferation kit Roche, ref 11465015001). Dado que la veratridina es soluble en DMSO, se comprobó que las concentraciones de DMSO utilizadas no produjeran daño a las células añadiendo un control conteniendo únicamente el disolvente.

Se estudió también el efecto de la administración conjunta de veratridina más ouabaína (Sigma Aldrich). La ouabaína es un glucósido cardíaco, derivado de las semillas de la planta *Strophanthus gratus*. La ouabaína bloquea la bomba Na^+/K^+ , impidiendo la salida activa de Na^+ . Administrada junto con la veratridina esperamos aumentara la sobrecarga de Na^+ intracelular provocada por esta última. La ouabaína se probó a las concentraciones de 100 y 200 μM , basándonos en datos bibliográficos previos ([Milla et al., 2011](#)).

3.15. Determinación de la producción de $\text{TNF-}\alpha$ *in vitro*

La producción de la citocina proinflamatoria $\text{TNF-}\alpha$ por las células MU-PH1 se determinó mediante el ensayo de enzoinmunoanálisis (ELISA), utilizando

un kit comercial adquirido a eBioscience, siguiendo las instrucciones del fabricante. El nivel de TNF- α se cuantificó en el sobrenadante libre de células de los cultivos de células MU-PH1 en presencia de diferentes ligandos de TLRs: LPS ultrapuro de *E. coli*, (250 ng/mL; InvivoGen, San Diego, CA, EE.UU.), Pam₃CSK₄ (1mg/mL; Invivogen) y dos formas inactivadas de *C. albicans* ATCC 26555, levadura e hifa, obtenidos como se ha descrito previamente por nuestro grupo de investigación (Murciano et al., 2007; Villamón et al., 2004), a un ratio de 5/1 y 10/1 levaduras o hifas/células murinas. Los estímulos se mantuvieron distintos tiempos: 12 horas, 1, 2 y 7 días. Las muestras se analizaron por duplicado en cada ensayo.

3.16. Ensayo de la actividad de agentes antioxidantes y antiapoptóticos sobre la viabilidad de células MU-PH1 sometidas a estrés oxidativo

Para analizar la validez de la línea celular MU-PH1 como modelo de cribado de fármacos se utilizaron los reactivos que se indican a continuación adquiridos a Sigma Aldrich. Como agentes oxidantes se utilizaron oligomicina (bloqueante de la ATP sintasa), rotenona (bloqueante del complejo I de la cadena respiratoria) y el donador de óxido nítrico, inductor de apoptosis y muerte celular nitroprusiato sódico.

Según los numerosos trabajos bibliográficos que utilizan estos compuestos, las concentraciones utilizadas fueron: oligomicina (0,3-10 μ M), rotenona (1-30 μ M), nitroprusiato sódico (0,3 mM). Como agentes con posible efecto neuroprotector se analizaron las sustancias antioxidantes: vitamina E (200 μ M), N-acetilcisteína (2 mM) y melatonina (1 mM) y los agentes antiapoptóticos ácido Tauroursodeoxicólico (TUDCA) (500 μ M) y ácido valproico (1 mM).

Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos sembradas el día anterior al ensayo con una densidad celular de 5000 células/pocillo. Los estímulos se mantuvieron durante 24 horas, en medio sin suero fetal bovino, previamente a la medida de la viabilidad celular. La viabilidad celular se cuantificó mediante el ensayo de XTT (Cell proliferation Kit, Roche). Cada condición se analizó en 8 pocillos, cada experimento se repitió por triplicado.

3.17. Análisis estadístico de los resultados

Los datos se analizaron utilizando el test t-Student de dos colas. Los datos mostrados en las gráficas están expresados como la media \pm la desviación estándar de la muestra. Los niveles de significación utilizados fueron: $P \leq 0,05$ (*) y $P \leq 0,01$ (**).

3.18. Medios de cultivo y soluciones

Los medios de cultivo y las soluciones utilizados fueron:

MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES	
MEDIO DMEM COMPLETO	Concentración final
DMEM con Glutamax TM (Gibco)	-
Suero fetal bovino inactivado (Gibco)	10 %
Penicilina/estreptomicina (Gibco)	1 %
pH 7,4	
PBS	Concentración final
Fosfato potásico monobásico (KH ₂ PO ₄)	144,0 mg/L – 10,588 mM
Cloruro sódico (NaCl)	90000,0 mg/L – 1551,724 mM
Fosfato sódico dibásico (Na ₂ HPO ₄ -H ₂ O)	7950,0 mg/L – 29,664 mM
pH 7,4	
MEDIO LIN⁻	Concentración final
RPMI con Glutamax TM (Gibco)	-
Suero fetal bovino inactivado (Gibco)	5 %
Penicilina/estreptomicina (Gibco)	1 %
Stem cell factor (Peprotech)	20 ng/mL
TAMPÓN DE PURIFICACIÓN	Concentración final
PBS (Gibco)	-
EDTA (Gibco)	2 mM
Albumina sérica bovina (BSA, sigma-Aldrich)	0,5 %
pH 7.2	Esterilizado por filtración

Tabla 6: Medios de cultivo de levaduras utilizados en este trabajo.

MEDIOS DE CULTIVO DE LEVADURAS	
MEDIO LÍQUIDO YPD	Cantidad
Extracto de levadura	10 g
Triptona (Digerido pancreático de caseína)	20 g
Glucosa	20 g
Agua destilada c.s.p. (Gibco)	1 litro
pH 6-7	
MEDIO LÍQUIDO SINTÉTICO DE LEE SIMPLIFICADO (Lee et al., 1975)	Cantidad
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g
HK ₂ PO ₄ anhidro	2,5 g
NaCl	5 g
Glucosa	12,5 g
Prolina	0,5 g
Biotina	0,5 g
Agua destilada c.s.p. (Gibco)	1 litro
pH 5,4 - 5,8	

Tabla 7: Medios de cultivo y soluciones utilizados en este trabajo.

Capítulo 4

RESULTADOS

Aunque la neurogénesis en la retina de mamíferos adultos termina en el periodo postnatal temprano (Reh and Fischer, 2006), un pequeño número de células madre y progenitoras persisten en reposo en la retina madura cuya diferenciación neuronal ya no es evidente, pero siguen conservando el potencial neurogénico (Ahmad et al., 2000; Liu et al., 2009; Tropepe et al., 2000; Wohl et al., 2012). Comprender los mecanismos celulares y moleculares implicados en la proliferación, diferenciación y función de estas células progenitoras es esencial con el fin de determinar su capacidad neuroregenerativa y por tanto, su posible potencial terapéutico en enfermedades neurodegenerativas de la retina.

Los TLRs, receptores clave en la activación de la respuesta inmunológica, parecen estar implicados en la proliferación de las células progenitoras, y cada vez más estudios los implican en procesos de regulación de la neurogénesis y el crecimiento (Okun et al., 2011). En la retina, la expresión de TLRs se ha confirmado en células ganglionares, fotorreceptores, epitelio pigmentario y también en células gliales, astrocitos, microglía y células de Müller (Jiang et al., 2009; Kumar et al., 2004; Langmann, 2007; Okun et al., 2011; Shamsuddin and Kumar, 2011; Shechter et al., 2008). Dados estos antecedentes, consideramos de gran interés estudiar la expresión de TLRs en células de la retina adulta que presenten características de progenitoras y estudiar la posible relación de los TLRs en los mecanismos celulares y moleculares implicados en la diferenciación y función de estas células. Los TLRs podrían ser mediadores de la diferenciación y de la capacidad de transformación de las células de la retina, con lo que resultarían relevantes en los procesos de neuroregeneración retiniana.

4.1. IDENTIFICACIÓN DE POBLACIONES DE CÉLULAS MADRE EN RETINA DE RATONES ADULTOS

En primer lugar se intentó identificar células progenitoras en la retina de ratones adultos. Para ello se utilizaron retinas de ratones C57BL/6J de edad comprendida entre 4 y 8 semanas, y se intentó localizar en ellas células que expresaran marcadores de células madre y progenitoras, tales como el transportador *Abcg2* y el antígeno *Sca-1*, mediante citometría de flujo.

4.1.1. Identificación de células madre con el fenotipo "Side Population"

La expresión de la proteína *Abcg2* se considera un marcador útil para la identificación de células madre. Diversos tipos de células madre con gran potencial neuroregenerador de diferentes tejidos expresan el transportador *Abcg2*, el cual les confiere una capacidad elevada de expulsar sustratos, xenobióticos, tóxicos, etc. ([Ahmad et al., 2004](#); [Bhattacharya et al., 2003](#); [Hulspas and Quesenberry, 2000](#); [Mouthon et al., 2006](#)). El fenotipo "Side Population" es característico de células que expresan este transportador las cuales pueden ser identificadas debido a la mayor capacidad para excluir la sonda fluorescente intercalante del DNA, Hoechst 33342, en comparación con el resto de células presentes en un tejido.

La emisión dual de fluorescencia de esta sonda nos permite obtener, tras el análisis por citometría de flujo, un diagrama de puntos de toda la población de células marcadas con Hoechst 33342. Las células que expresan la proteína *Abcg2* deben aparecer como una pequeña población desplazada hacia un lateral (población SP), ya que el colorante es rápidamente expulsado al exterior por la acción del transportador, presentando una baja acumulación de colorante que sitúa a estas células en canales de fluorescencia menores, en comparación con el resto de células de la población. En estudios previos se ha detectado el fenotipo "Side Population" en células de retina de ratones neonatos ([Bhattacharya et al., 2003](#)), pero no se ha encontrado esta población en retinas de animales adultos.

Para identificar esta población SP en la retina de nuestro modelo de estudio, se incubaron las células obtenidas de la retina de cuatro ratones adultos de 8 semanas de edad con la sonda fluorescente intercalante del DNA, Hoechst 33342 y se analizaron en un citómetro de flujo. Siguiendo este método no se

observó la población esperada situada en canales más bajos de fluorescencia para ambas emisiones (ver figura 1.11), ya que en esta región se obtuvo una población por debajo del 0,001 % (Fig. 4.1.). Estos resultados indican que las muestras analizadas carecen de esta población inmadura.

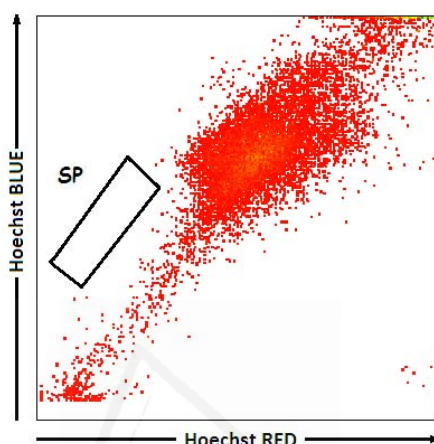


Figura 4.1: Análisis de la expresión del fenotipo "Side Population" en la retina de ratón adulto por citometría de flujo. Las células de las retinas de cuatro ratones C57BL/6J fueron teñidas con el fluorocromo Hoechst 33342. En el gráfico se enfrentan la emisión dual de fluorescencia del fluorocromo Hoechst 33342, a 405 nm (BLUE) y a 620 nm (RED). Se muestra la región donde deberían aparecer las células SP, que expulsan el colorante más rápidamente que el resto de células de la retina, como una pequeña población lateral situada en canales más bajos de fluorescencia para ambas emisiones. Se muestran los resultados de un experimento representativo de dos.

4.1.2. Identificación de células madre mediante la detección del antígeno Sca-1

El antígeno Sca-1 está presente en células madre de diversos tejidos (Kawamoto et al., 1997; Morrison et al., 1995,9; Spangrude and Brooks, 1993; Spangrude et al., 1988; Van De Rijn et al., 1989; Yamamoto et al., 1996). Este marcador también se encuentra presente en células madre de la retina de mamíferos en edad neonatal (Liu et al., 2009), pero no se ha descrito su expresión en retinas de animales adultos. Por este motivo en primer lugar decidimos comprobar, mediante citometría de flujo, la existencia de células Sca-1⁺ en la retina de ratón adulto. Para ello en cada experimento se extrajeron las retinas de cuatro ratones de entre 4 y 8 semanas de edad y se marcaron las células con un anticuerpo frente al antígeno Sca-1, conjugado con un fluorocromo. Como

RESULTADOS

control de fluorescencia se utilizaron células sin marcar.

Tras detectar la población de células de la retina por su tamaño FSC y complejidad SSC, tanto para la muestra sin marcar (Fig. 4.2 A1) como para la muestra marcada con el anticuerpo anti-Sca-1 conjugado con el fluorocromo APC (Fig. 4,2 B1), se analizó la fluorescencia de ambas poblaciones.

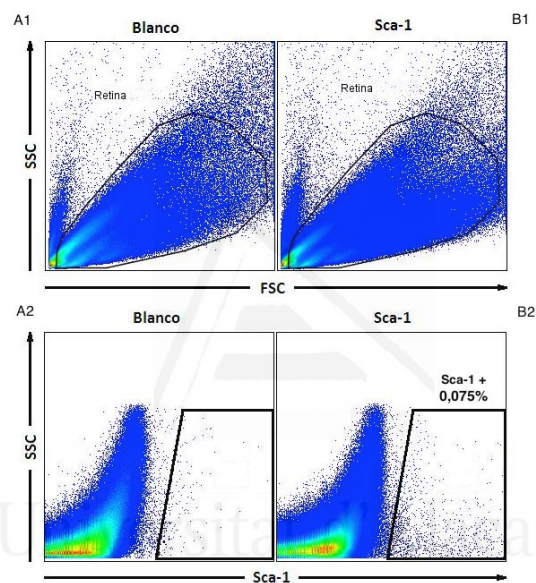


Figura 4.2: Análisis de la expresión del antígeno *Sca-1* en células de retina de ratón adulto mediante citometría de flujo. En los histogramas biparamétricos A1 y B1 podemos observar las células de la retina teniendo en cuenta su tamaño (FSC) y complejidad (SSC), tanto de la población no marcada (blanco) A1, como de la población marcada con el anticuerpo fluorescente frente al antígeno *Sca-1*, B1. En los histogramas biparamétricos A2 y B2 podemos observar la fluorescencia de las células *Sca-1*⁺, tanto del blanco (población no marcada con anti-*Sca-1*) A2, como de la población marcada, B2. Se muestran los resultados de un experimento representativo de cuatro.

Los resultados muestran una pequeña población positiva de células *Sca-1* que superan los canales en los que habíamos acotado la autofluorescencia de la población (Fig 4.2 B2), correspondiente al $0,076\% \pm 0,027$ de la población de las células de la retina total. Estos resultados confirman la existencia de células inmaduras en la retina de ratón adulto que expresan el antígeno *Sca-1*.

Tras haber comprobado la presencia de células Sca-1⁺ en la retina de ratón adulto, el siguiente paso fue comprobar la presencia de células Sca-1⁺ de origen no hematopoyético, descartando otras células Sca-1⁺ que pudieran estar presentes en la retina, las cuales expresarían marcadores de linaje hematopoyético (Lin⁺) y la proteína CD45.

Para ello se procedió en primer lugar a eliminar las células linaje positivas (Lin⁺) de la población total de células de la retina y recoger las células linaje negativas (Lin⁻), mediante selección inmunomagnética negativa con un cóctel de anticuerpos que reconocen marcadores de linaje. Entre estos se encuentra un anticuerpo que reconoce al receptor de membrana CD11b perteneciente a una superfamilia de glicoproteínas, las integrinas, expresado también por las células de microglía de la retina, con lo cual también eliminamos todas las células de este tipo. Estas células son linaje positivas (Lin⁺), ya que son parte del sistema inmunitario y expresan estos receptores característicos del linaje hematopoyético.

La población obtenida de células Lin⁻ se marcó con un anticuerpo anti-Sca-1 y también con el anticuerpo anti-CD45. Con esta aproximación intentamos detectar la presencia de una población Lin⁻ Sca-1⁺ CD45⁻ similar a la pequeña población descrita por otros grupos en retinas neonatales murinas con características de células madre y capacidad de diferenciación en distintos tejidos. Se ha descrito que esta población resultante Lin⁻ Sca-1⁺ CD45⁻ tiene una gran capacidad regenerativa, con lo que podría reparar tejidos dañados y resultar de interés en procesos neurodegenerativos.

4.2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y FUNCIONALIDAD DE RECEPTORES TIPO TOLL EN LAS POBLACIONES DE CÉLULAS Sca-1⁺ CD45⁻ IDENTIFICADAS

Como hemos comentado, diversos estudios relacionan el TLR2 con procesos de proliferación y diferenciación de células madre y progenitoras de distinto origen (Megías et al., 2012; Rolls et al., 2007; Yáñez et al., 2010). Así pues, decidimos investigar la expresión de TLR2 en la población identificada de células Lin⁻ Sca-1⁺ CD45⁻.

4.2.1. Estudio de la expresión de TLR2 en las células Lin⁻ Sca-1⁺ CD45⁻ en retina de ratón adulto

Para comprobar la expresión del receptor TLR2 en las células Lin⁻ Sca-1⁺ CD45⁻ de retina de ratón adulto, realizamos en las células Lin⁻ purificadas un marcaje triple con anticuerpos monoclonales, anti-Sca-1, anti-CD45 y anti-TLR2 conjugados con tres fluorocromos APC, FITC y PE respectivamente. Incluimos también una muestra en la que sustituimos el anticuerpo anti-TLR2 por su isotipo control, conjugado con el fluorocromo PE. Se analizó la expresión del receptor TLR2 en células Lin⁻ Sca-1⁺ CD45⁻ (Fig. 4.3).

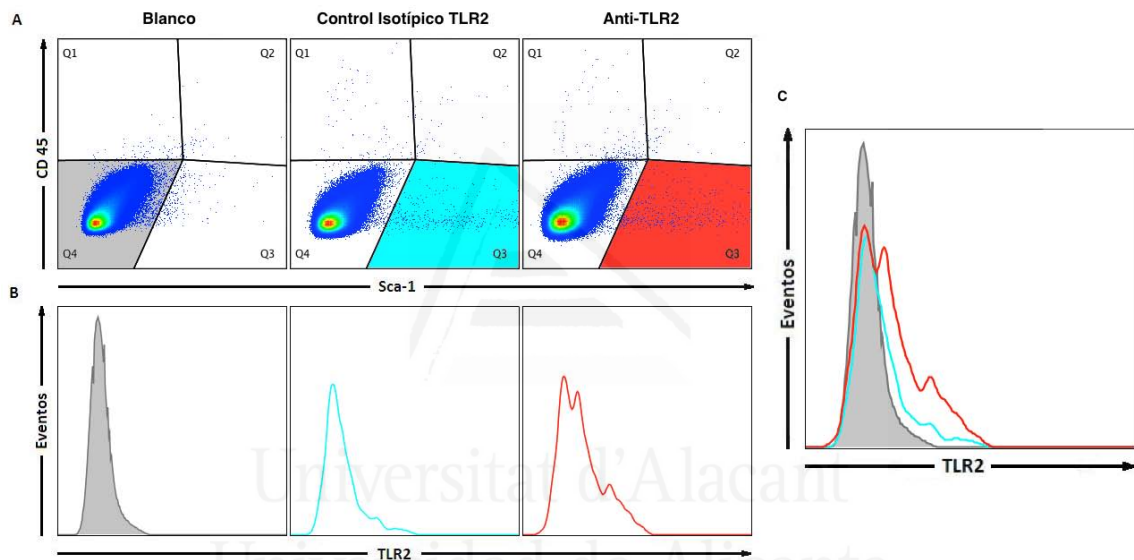


Figura 4.3: Análisis de la expresión del receptor TLR2 en las células Lin⁻ Sca-1⁺ CD45⁻ de retina de ratón adulto analizadas por citometría de flujo. (A) Histogramas biparamétricos que muestran en el eje de ordenadas la fluorescencia del marcador CD45 conjugado con el fluorocromo FITC y en el eje de abcisas la fluorescencia del marcador Sca-1 conjugado con el fluorocromo APC. Se muestran los resultados de la población sin marcar con ningún anticuerpo (blanco) y las marcas triples con anticuerpos anti-Sca-1 y anti-CD45 junto con el anticuerpo anti-TLR2 o con su isotipo control. (B) Histogramas monoparamétricos que muestran la expresión del receptor TLR2 para las regiones Q4, Q3 y Q3 respectivamente para las tres condiciones. (C) Histograma monoparamétrico en el que se muestra la superposición de los tres picos obtenidos en las tres regiones estudiadas. En los tres casos se parte de 1.250.000 eventos totales para cada condición. Se muestran los resultados de un experimento representativo de cuatro.

En la figura 4.3 A se muestran los tres histogramas biparamétricos en los cuales se analiza la señal fluorescente de los anticuerpos anti-CD45 y anti-Sca-1. A partir de estas poblaciones se analizó la fluorescencia del anticuerpo

anti-TLR2 conjugado con PE, que es el tercer fluorocromo utilizado y nos permite medir la expresión del receptor TLR2, para cada población (Fig. 4.3 B). La autofluorescencia de la población para las tres señales (FITC, APC y PE) se delimitó teniendo en cuenta la región Q4 (región coloreada en gris) que representa la población sin marcar con ningún anticuerpo. Las células marcadas las obtuvimos en la región Q3 para las otras dos poblaciones, región azul (Sca-1⁺, CD45⁻ e isotipo control TLR2) y región roja (Sca-1⁺, CD45⁻ y anti-TLR2) (Fig. 4,3 A).

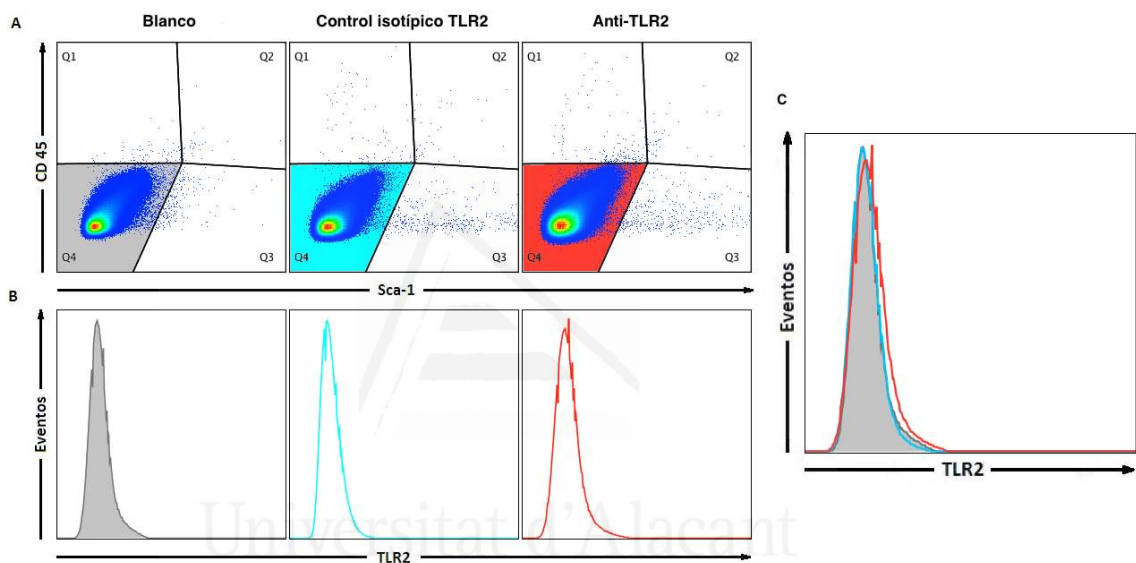


Figura 4.4: Análisis de la expresión del receptor TLR2 en la población de células Sca-1⁺ CD45⁻ en células Lin⁻ de retina de ratón adulto, analizadas por citometría de flujo. (A) Histogramas biparamétricos que muestran en el eje de ordenadas la fluorescencia del marcador CD45 conjugado con el fluorocromo FITC y en el eje de abcisas la fluorescencia del marcador Sca-1 conjugado con el fluorocromo APC para las tres condiciones, población sin marcar con ningún anticuerpo (blanco) y las marcas triples con anticuerpos anti-Sca-1 y anti-CD45 junto con el anticuerpo anti-TLR2 o con su isotipo control. (B) Histogramas monoparamétricos que muestran la expresión del receptor TLR2 para las regiones Q4 respectivamente para cada una de las tres condiciones. (C) Histograma monoparamétrico en el que se muestra la superposición de los tres picos obtenidos en las tres regiones estudiadas. En los tres casos se parte de 1.250.000 eventos totales para cada condición. Se muestran los resultados de un experimento representativo de cuatro.

La marca TLR2 se muestra en los histogramas monoparamétricos como un pico de color gris, azul y rojo respectivamente para cada población (Fig 4.3 B). Los tres picos se superpusieron en un nuevo histograma monoparamétrico para valorar el desplazamiento de la señal con respecto al control negativo (pico

RESULTADOS

gris) (Fig 4.3 C). Los resultados muestran que las células de la región Q3 roja (pico rojo) que representan células $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{CD45}^-$ presentan un mayor avance con respecto al negativo y al marcaje inespecífico. Esto demuestra que las células $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{CD45}^-$ de retinas de ratones adultos expresan receptores TLR2.

Se analizó también la expresión del receptor TLR2 en células $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^- \text{CD45}^-$ (Fig. 4.4). Las células $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^- \text{CD45}^-$ son las células que no expresan el antígeno Sca-1 y por tanto no tienen la característica de célula madre inmadura. Para analizar la expresión de TLR2 en estas células, se utilizaron los mismos histogramas analizando la región Q4 en vez de la Q3 para los tres histograma biparamétricos (Fig 4.4 A). La marca del anticuerpo anti-TLR2 se analizó para cada una de las tres poblaciones por separado y se mostró en los tres histogramas monoparamétricos (Fig. 4.4 B), así como la superposición de los tres picos (Fig. 4.4 C).

A continuación se muestran los valores obtenidos de células TLR2^+ , tanto para la población Sca-1^+ (regiones Q3) como para la población Sca-1^- (regiones Q4), frente a su respectivo control isotípico (Fig. 4.5).

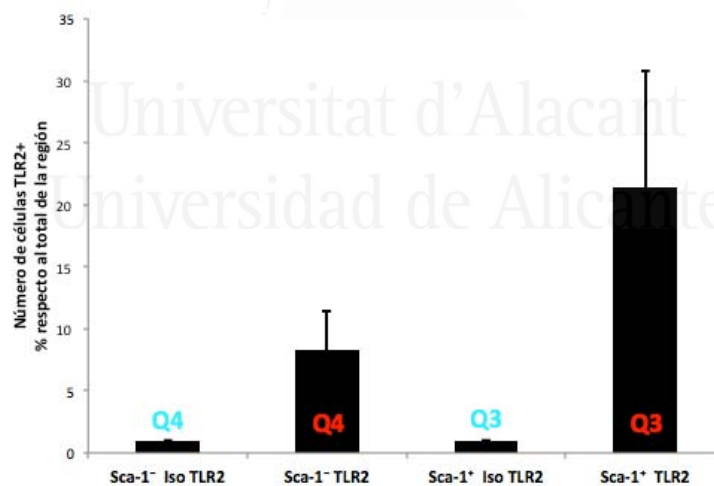


Figura 4.5: Histograma que muestra el porcentaje de células TLR2^+ a partir de la población de células Sca-1^+ (región Q3 roja de la figura 4.3) frente a su isotipo control (región Q3 azul de la figura 4.3) y el porcentaje de las células TLR2^+ de la población de células Sca-1^- (región Q4 roja de la figura 4.4) frente a su isotipo control (región Q4 azul de la figura 4.4). Se muestra la media de cuatro experimentos más la desviación estándar. Los datos están normalizados respecto al isotipo control.

Los resultados muestran que las células de la región Q4 roja (pico rojo) que representan células $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^- \text{CD45}^-$ presentan un pequeño avance con respecto al negativo y al marcaje inespecífico. Esto demuestra que las células $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{CD45}^-$ de retinas de ratones adultos expresan proporcionalmente más receptores TLR2 que las células $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^- \text{CD45}^-$ (Fig. 4,5).

4.2.2. Estudio de la funcionalidad de TLR2 en células $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{CD45}^-$ en retina de ratón adulto

Una vez demostrada la expresión de TLR2 en la población de células $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{CD45}^-$ decidimos estudiar su funcionalidad. Para ello, como una primera aproximación, se realizaron cultivos de las células linaje negativo Lin^- . Las células Lin^- obtenidas, se cultivaron en medio apropiado junto con ligandos de los TLRs para valorar la posible participación de estos receptores en la proliferación y/o diferenciación de las células inmaduras. Como ligando puro del heterodímero TLR2/TLR6 utilizamos Pam_3CSK_4 . Incluimos también el ligando de TLR4 LPS. Puesto que, como hemos comentado previamente, estudios anteriores demuestran que *C. albicans* induce la proliferación y diferenciación vía TLR2, decidimos comprobar si en estas células produce el mismo efecto utilizando como estímulo levaduras e hifas de este microorganismo. Las células se mantuvieron en cultivo durante una o dos semanas en presencia cada uno de estos estímulos, administrados por separado.

Posteriormente se valoró, la expresión del antígeno Sca-1, la proliferación celular, la expresión de los receptores TLR2 y TLR4 y la posible diferenciación a células de defensa estudiando la expresión de la proteína CD11b, dado que las células Lin^- son CD11b^- . Se escogió este último marcador, característico de linaje hematopoyético (integrina Mac-1), ya que se expresa en células maduras de defensa, tales como monocitos/macrófagos. Dado que está descrito que TLR2 induce diferenciación hacia linaje mieloide y que las células linaje negativo que obtuvimos carecían de este marcador, su expresión apuntaría a una diferenciación celular inducida por los ligandos.

4.2.2.1. Estudio en células en cultivo durante una semana

Tras mantener las células Lin^- en cultivo durante una semana con los distintos estímulos, se analizó la expresión de los marcadores Sca-1, TLR2, TLR4 y CD11b para cada una de las condiciones (Fig. 4.6).

RESULTADOS

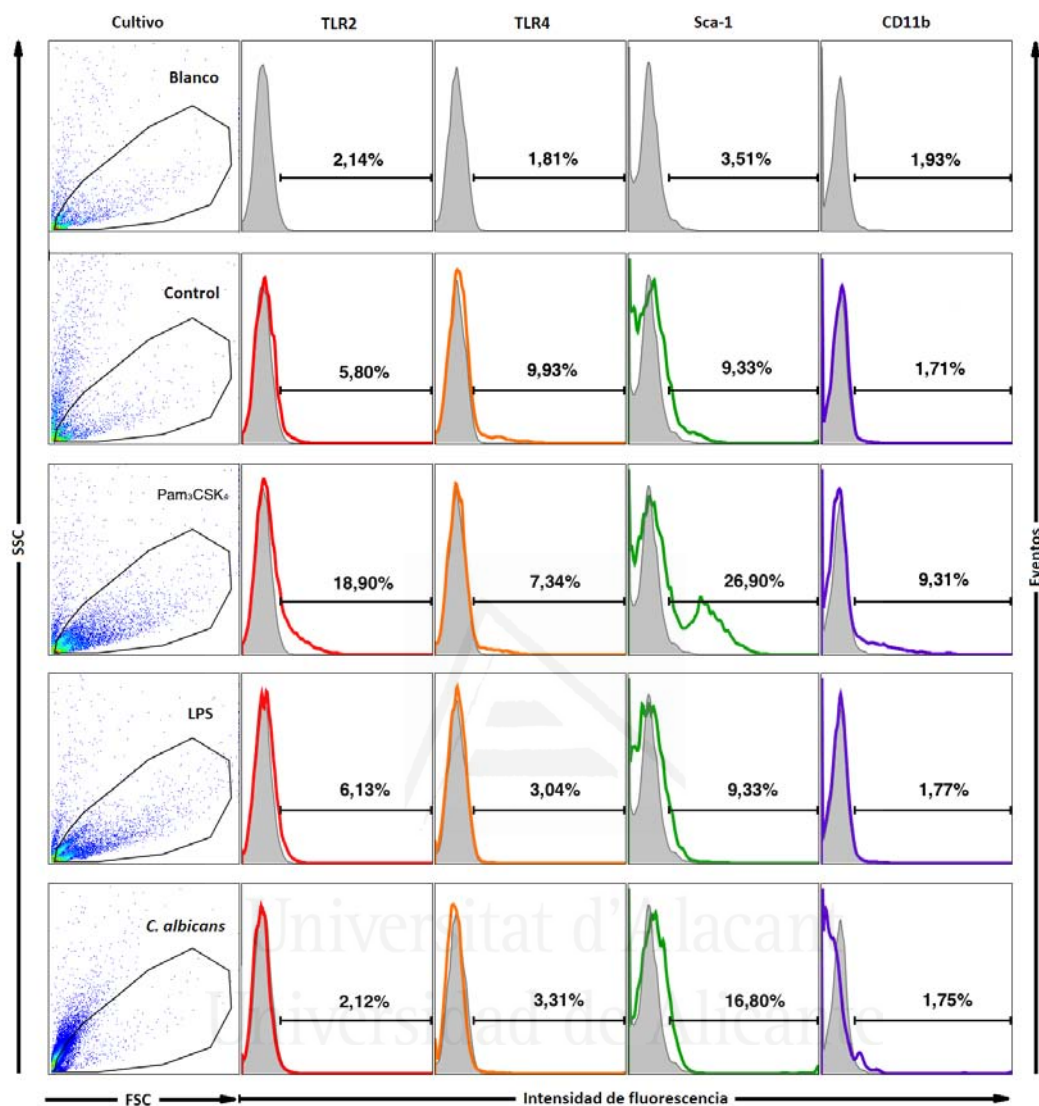


Figura 4.6: Estudio de la expresión de los marcadores: TLR2, TLR4, Sca-1 y CD11b en células Lin⁻ de retina de ratón adulto por citometría de flujo. Las células se cultivaron durante una semana sin ningún estímulo (control) y con tres ligandos de los TLRs de forma independiente: Pam₃CSK₄ (0,125 µg/mL), LPS (1 µg/mL) y levaduras inactivadas (en proporción 5:1, levaduras:células murinas) de la cepa de *C. albicans* ATCC 26555. Se muestran, en un histograma biparamétrico FSC frente a SSC, las tres poblaciones marcadas e incubadas con estímulos, la población marcada e incubada sin estímulo (control) y el blanco (células sin marcar). Cada población es a su vez analizada en cuatro histogramas monoparamétricos correspondientes a la intensidad de fluorescencia de los anticuerpos monoclonales anti-TLR2, anti-TLR4, anti-Sca-1 y anti-CD11b, teniendo como base la población sin marcar (blanco). Se muestran los resultados de un experimento representativo de dos.

Los resultados mostraron un aumento de la expresión de receptores Sca-1 en la población de células estimuladas con el ligando Pam₃CSK₄ (Fig. 4.6). La población de células que expresan este receptor en la muestra control (n=2 experimentos) fue de un 6,40±2,92 % y la muestra de células estimuladas con dicho ligando alcanzó un valor de 18,60±8,30 %. Se observó también un aumento en la expresión de los receptores TLR2 de dicha población, ya que pasaron de un 4,18±1,62 % en la población control a un 12,64±6,26 % estimuladas con el ligando Pam₃CSK₄ (Fig. 4.6). En estas condiciones la expresión del receptor CD11b aumenta levemente pasando de un 2,71±1,00 % en la población control a un 6,91±2,18 % respectivamente (Fig 4.6). Por otra parte, el ligando LPS no aumentó apenas la expresión del receptor Sca-1 ya que pasó a un 8,06±1,27 %, siendo el control 6,40±2,92 %, así como tampoco se apreció un aumento en la intensidad de fluorescencia para los receptores TLR4 (3,04 %) ni CD11b (1,60±0,17 %).

En la población estimulada con *C. albicans*, aparece un aumento de la expresión de receptores Sca-1 de hasta un 18,75±1,95 %. En cuanto al receptor CD11b, aparece un pico mayoritario con menor fluorescencia que el blanco, este pico corresponde a la autofluorescencia de dicho hongo, pero el pico de células no sobrepasa los niveles de fluorescencia del control. En cuanto a la expresión de TLR4, no se apreció aumento en su expresión en ninguna de las poblaciones por encima de los valores obtenidos en la muestra control (Fig. 4.6). Todos los valores corresponden al valor medio de los resultados obtenidos de dos experimentos.

4.2.2.2. Estudio en células en cultivo durante dos semanas

Tras mantener las células Lin⁻ en cultivo durante dos semanas con los mismos estímulos, se analizó la expresión de los receptores Sca-1, TLR2, TLR4 y CD11b para cada una de las poblaciones incubadas con un solo estímulo. Los resultados confirmaron la tendencia al aumento de la expresión de receptores Sca-1 en la población de células estimuladas con el ligando Pam₃CSK₄ pasando de un 8,35±0,02 % en el control a un 13,50±1,49 % (Fig. 4.7), así como también un ligero aumento en la expresión de TLR2 pasando de un 3,26 % en el control a un 5,00 %, en la expresión de TLR4 pasando de un 1,85 % en el control a un 5,57 % y un aumento casi inapreciable en la expresión de CD11b pasando de un 2,68±0,015 % a un 3,82±0,01 %. Las células incubadas con LPS continuaron sin mostrar un aumento en la señal de fluorescencia con ninguno de los anticuerpos analizados. En la población de células incubadas con *C. albicans*, también hubo un aumento considerable de la expresión de recep-

RESULTADOS

tores Sca-1, pasando de un $8,35\% \pm 0,02$ a un $46,35 \pm 7,35\%$ (Fig. 4.7). No se apreció ningún aumento en la expresión de los receptores TLR4 (Fig. 4.7) en ninguna de las demás condiciones estudiadas. Todos los valores corresponden al valor medio de los resultados obtenidos de dos experimentos.

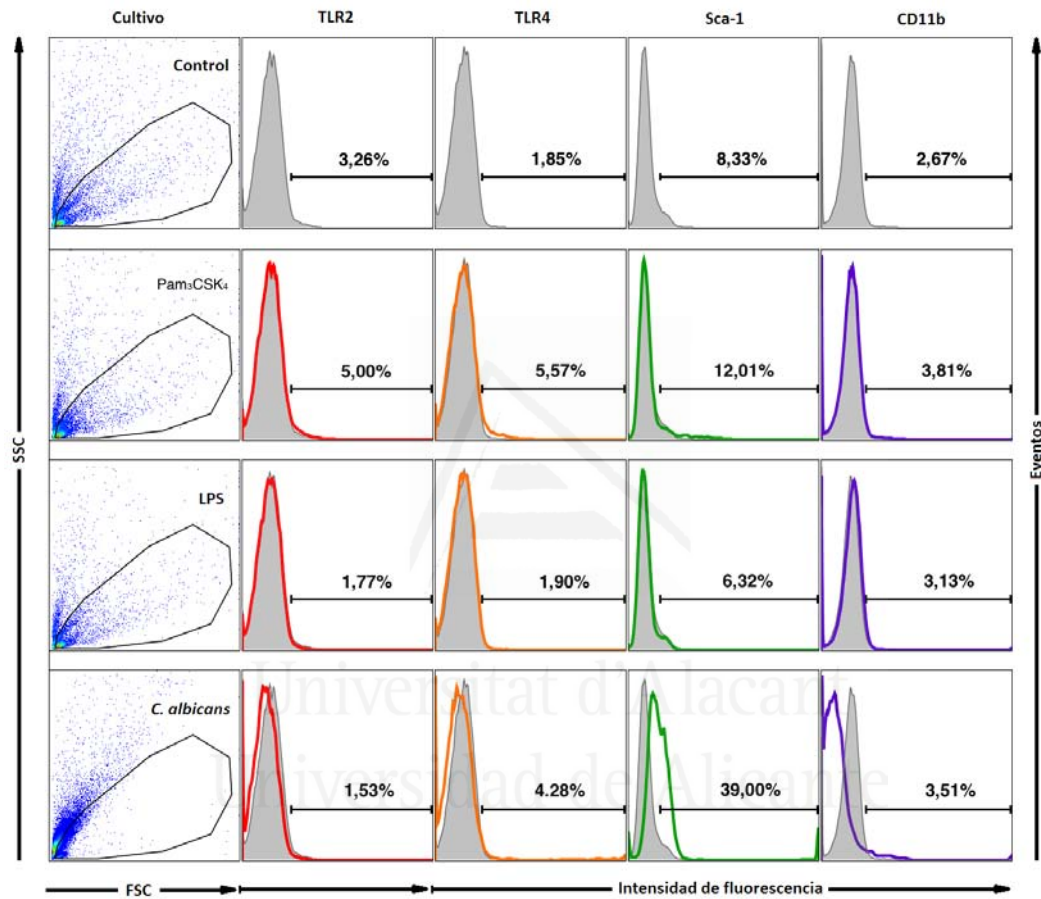


Figura 4.7: Estudio de la expresión de los marcadores: TLR2, TLR4, Sca-1 Y CD11b en células Lin^- de retina de ratón adulto por citometría de flujo. Las células se cultivaron durante dos semanas sin ningún estímulo (control) y con tres ligandos de los TLRs de forma independiente: Pam₃CSK₄ (0,125 μ g/mL), LPS (1 μ g/mL) y levaduras inactivadas (en proporción 5:1, levaduras:células murinas) de la cepa de *C. albicans* ATCC 26555. Se muestra, en un histograma biparamétrico FSC frente a SSC, las tres poblaciones marcadas e incubadas con estímulos y el control (células sin estímulo). Cada población es a su vez analizada en cuatro histogramas monoparamétricos correspondientes a la intensidad de fluorescencia de los anticuerpos monoclonales anti-TLR2, anti-TLR4, anti-Sca-1 y anti-CD11b, teniendo como base la población sin estimular (control). Se muestran los resultados de un experimento representativo de dos. Los valores de TLR2 y TLR4 corresponden a experimentos únicos.

Estos datos indican que los TLR2 de las células de la retina Lin⁻ son funcionales, pues responden al estímulo producido por sus ligandos. El hecho de que aumente la población Sca-1⁺ puede resultar de la proliferación de la población Sca-1⁺ con respecto a la población negativa o bien deberse a un aumento en la expresión del marcador en células que no lo expresaban, debido a la presencia de los estímulos. Se ha descrito que en respuesta a la infección o inflamación, progenitores comunes mieloides o "*Common Myeloid Progenitors*" (CMPs) que ya han perdido la expresión de Sca-1 pueden volver a expresarlo, es decir la expresión de dicho marcador puede verse aumentada por la infección y/o inflamación (Megías et al., 2013).

A continuación, analizamos las células Sca-1⁺ obtenidas tras la estimulación y medimos, sólo en ellas, la expresión de TLR2 para cada uno de los estímulos. Los resultados mostraron que en el caso de la población celular estimulada con Pam₃CSK₄, había un aumento de la expresión del receptor TLR2 con respecto al control y con respecto al resto de poblaciones (Fig. 4.8).

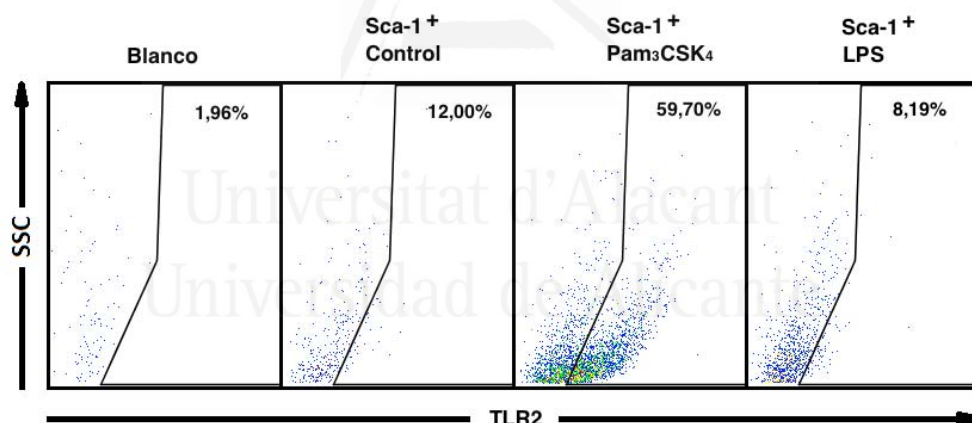


Figura 4.8: Estudio de la expresión de TLR2 en células Sca-1⁺ de retina de ratón adulto por citometría de flujo, a partir de las poblaciones de células obtenidas de los cultivos de una semana, sin ningún estímulo (control) y con dos ligandos de los TLRs de forma independiente: Pam₃CSK₄ (0,125 µg/mL) y LPS (1 µg/mL). Se muestra, en un histograma biparamétrico el SSC frente a la intensidad de fluorescencia del anticuerpo monoclonal anti-TLR2, teniendo como base la población sin marcar (blanco). Se muestran los resultados de un experimento representativo de dos.

Como un control adicional, se realizó el mismo experimento pero en este caso se utilizaron ratones *Knockout* (KO) para el receptor TLR2. Se obtuvieron células Lin⁻ y se cultivaron durante una semana con el estímulo Pam₃CSK₄.

RESULTADOS

Los resultados no mostraron cambios relevantes de la población estimulada con respecto al control.

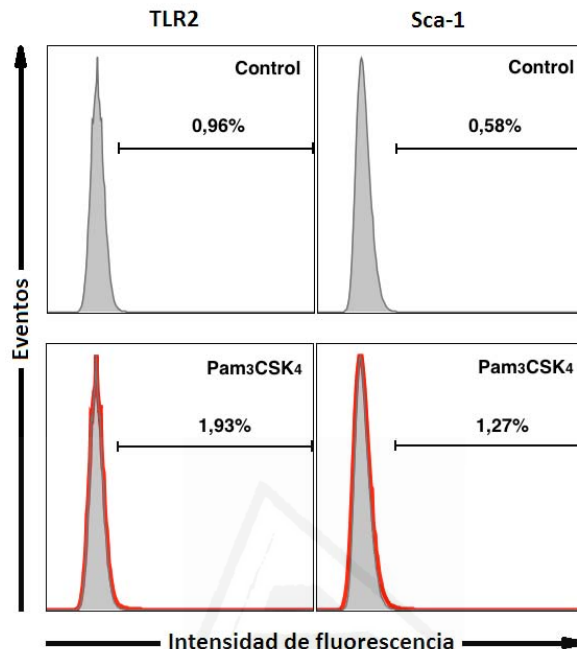


Figura 4.9: Estudio de la expresión de TLR2 y Sca-1 en células de retina de ratón KO TLR2 adulto por citometría de flujo. Las células se cultivaron durante una semana sin ningún estímulo (control) y con el estímulo Pam₃CSK₄ (0,125 µg/mL). Se muestran histogramas monoparamétricos con la intensidad de fluorescencia de los anticuerpos monoclonales anti-TLR2 y anti-Sca-1, teniendo como base la población sin estimular (control). Se muestran los resultados de un experimento.

Este resultado confirmó que el aumento en la expresión del antígeno Sca-1 se debe a la estimulación de los TLR2 (Fig 4.9).

4.3. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS Lin⁻ Sca-1⁺ CD45⁻

Para confirmar si los resultados mostrados en el apartado anterior se debían a la población de células Lin⁻ Sca-1⁺ CD45⁻ nos planteamos estudiar a continuación el efecto de la estimulación de TLR2 en la población de células Lin⁻ Sca-1⁺ CD45⁻, aisladas del resto de las células de la retina.

Para ello, las células Lin⁻ de la retina de ratón adulto marcadas con los anticuerpos anti Sca-1 y anti-CD45 se analizaron en un histograma biparamétrico

enfrentando la fluorescencia de ambos anticuerpos (APC y FITC respectivamente) y utilizando un separador celular, se aislaron las células situadas en la región positiva para el marcador Sca-1 y negativa para CD45. El porcentaje de esta población fue de un $0,033 \pm 0,004\%$ (media de seis experimentos) y uno representativo se muestra en la figura 4.10. Estos datos coinciden con los publicados en la bibliografía (Havens et al., 2013; Liu et al., 2009), ya que en retina de ratones neonatos aparecen estas células en un porcentaje del 1,5 %, disminuyendo considerablemente en la retina de ratón adulto (Liu et al., 2009).

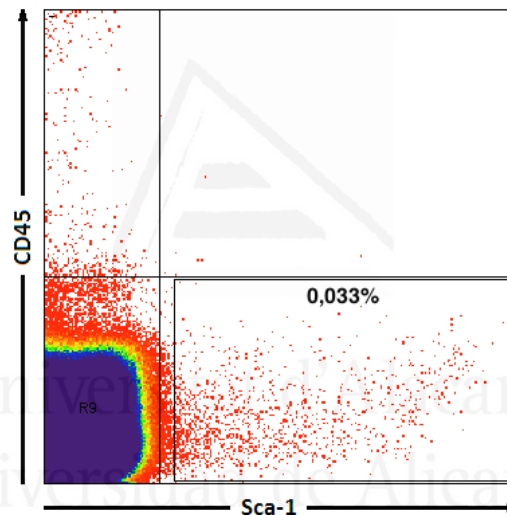


Figura 4.10: Purificación de células $Lin^- Sca-1^+ CD45^-$ de retina de ratón adulto. Histograma biparamétrico donde se representa la intensidad de fluorescencia del doble marcaje de los anticuerpos anti-Sca-1 y anti-CD45. Las células positivas para la señal de Sca-1 y negativas para la señal CD45 que están situadas dentro de la región mostrada se aislaron y recogieron mediante separación celular. Se muestran los resultados de un experimento representativo de seis.

Las células separadas $Lin^- Sca-1^+ CD45^-$ una vez obtenidas se cultivaron inmediatamente en medio Lin^- , un medio que, manteniendo la viabilidad de las células, induce muy poco la diferenciación.

4.4. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD DE LOS RECEPTORES TIPO TOLL EN LAS CÉLULAS AISLADAS $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{CD45}^-$

4.4.1. Estudio del efecto de la activación de TLRs sobre la proliferación celular

Para comprobar si los TLRs pueden estar implicados en la proliferación de las células de nuestro estudio al igual que se ha descrito para otros tipos celulares, estudiamos el efecto de la activación de TLR2 en la proliferación de la población $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{CD45}^-$ separada. Las células se cultivaron inmediatamente después de su purificación, en ausencia de estímulos (control negativo) y en presencia de Pam_3CSK_4 . Estudiamos también el efecto de la incubación con LPS a modo comparativo. A los 12 días de la incubación a 37°C y con un 5% de CO_2 , se observaron las células al microscopio de campo claro. Se observó un aumento claro del número de células en el cultivo con Pam_3CSK_4 respecto al control negativo. El número de células en el cultivo con LPS también fue mayor (Fig 4.12). La cuantificación del número de células confirmó estos resultados, mostrando un aumento significativo del número de células incubadas con Pam_3CSK_4 respecto al control negativo ($3,87 \pm 0.32$ veces, $n=4$ experimentos) (Fig. 4,11). El número de células en el cultivo con LPS también fue mayor ($4,10 \pm 0.84$ veces, $n=2$ experimentos) (Fig 4.11).

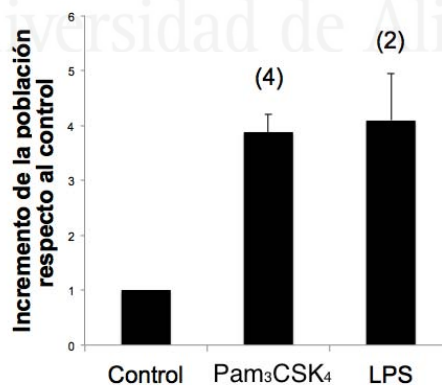


Figura 4.11: Histograma que muestra la proliferación de células $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{CD45}^-$ purificadas e incubadas durante 12 días, sin estímulos (control) y con los estímulos Pam_3CSK_4 ($0,125 \mu\text{g}/\text{mL}$) y LPS ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$). Se muestran los valores medios y la desviación estándar. Entre paréntesis se indica el número de experimentos realizados. Los datos están normalizados respecto a la población control.

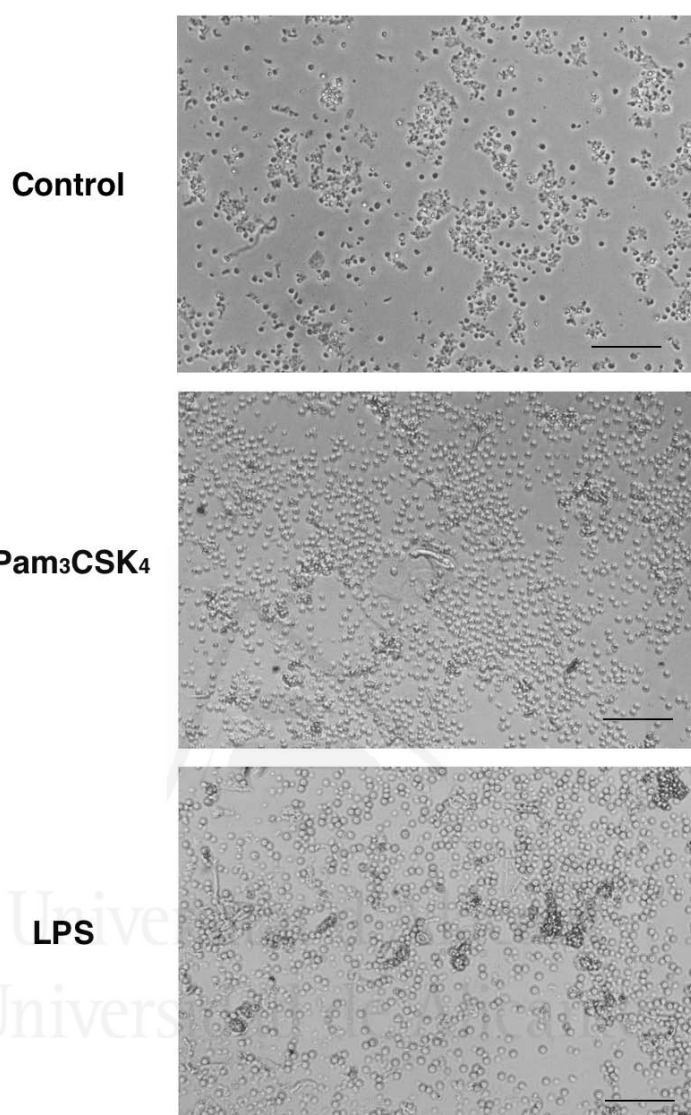


Figura 4.12: Imagen de células $Lin^- Sca-1^+ CD45^-$ purificadas mediante separador celular y mantenidas 12 días en cultivo en ausencia (control) o presencia del ligando puro del receptor TLR2, Pam₃CSK₄ (0,125 µg/mL) y del ligando de TLR4, LPS. Las imágenes están tomadas con un microscopio de campo claro con 40 aumentos. Las barras de escala representa 50 µm.

4.4.2. Estudio del efecto de la activación de TLRs en la expresión de Sca-1, TLR2 y CD11b

Para comprobar si la activación de los TLR2 inducía, además de un aumento en la proliferación celular, un cambio en la expresión de los marcadores

RESULTADOS

Sca-1 y TLR2, nos propusimos analizar su expresión. Quisimos también evaluar un posible aumento en la diferenciación de las células y para ello, como hemos comentado anteriormente, analizamos la expresión de la proteína CD11b. Las células obtenidas tras la purificación se sembraron a razón de 2.000 células por pocillo y se incubaron en medio Lin⁻ a 37° C con un 5 % de CO₂, en presencia y en ausencia (control) del ligando Pam₃CSK₄. Dada la implicación descrita por otros autores del TLR4 en procesos de diferenciación celular, incluimos también el ligando del TLR4, LPS. A los 12 días de incubación, se analizó la expresión de los marcadores, marcando la población con los anticuerpos anti-Sca-1, anti-TLR2 y anti-CD11b, añadiendo además el fluorocromo intercalante del ADN Hoechst 33342, para poder identificar mejor la población de células, ya que su pequeño tamaño impedía separarlas claramente del debrís y del ruido de fondo del equipo. Los resultados obtenidos tras el análisis por citometría de flujo se muestran en la figura 4.13.

En el diagrama de puntos de las células control apreciamos una única población celular, más homogénea, mientras que en las muestras incubadas con Pam₃CSK₄ y LPS observamos la aparición de una segunda población con mayor complejidad (SSC alto). Esto nos permite sospechar que la población con un mayor valor de SSC podría corresponder a células con un distinto grado de diferenciación. Cuando analizamos la expresión de los marcadores en las dos subpoblaciones (SSC bajo y SSC alto) tomando como referencia la intensidad media de fluorescencia de la población control en las regiones de bajo y alto SSC, cuyos valores son para el marcador Sca-1 de 57,5±29,5 y 321,5±208,5 respectivamente, comprobamos que la incubación con Pam₃CSK₄ produjo un ligero aumento de la expresión del marcador Sca-1 en la población con alto SSC, pasando a 683±429 y a 147,5±79,5 para la de bajo SSC. Comprobamos también que se produjo un aumento de la intensidad media de fluorescencia del marcador TLR2, tanto en la población de bajo SSC (510±315) como en la de alto SSC, siendo este último mayor (2204±350), partiendo de un valor de fluorescencia control de 126±52 y de 370±48 respectivamente. En cuanto a la expresión de CD11b, se observó también un aumento de dicha señal de fluorescencia en la población de bajo SSC, 301,5±161,5 con respecto a su control (152,5±63,5) y más elevado en la población de alto SSC, 1213,5±787,5 frente a su control (431±53). Estos datos apoyan un incremento en la diferenciación de las células en presencia del ligando Pam₃CSK₄.

Al analizar los datos de fluorescencia obtenidos en las células incubadas con LPS, obtuvimos aumentos en la señal de fluorescencia también perceptibles,

aunque menos intensos. En este caso, la intensidad de fluorescencia del marcador Sca-1 aumentó en la población de alto SSC hasta un 576 ± 295 , partiendo de un control de $57,5 \pm 29,5$. La intensidad de fluorescencia para el marcador TLR2 de la población de bajo SSC fue de un 297 ± 113 y de un 1314 ± 69 para la población de alto SSC, cuyos controles fueron, 126 ± 52 y 370 ± 48 respectivamente. También en este caso observamos un incremento de la fluorescencia del marcador CD11b en la población de alto SSC, con un valor de 1009 ± 460 frente a su control de 431 ± 53 . Todos los valores corresponden al valor medio de los resultados obtenidos de dos experimentos.

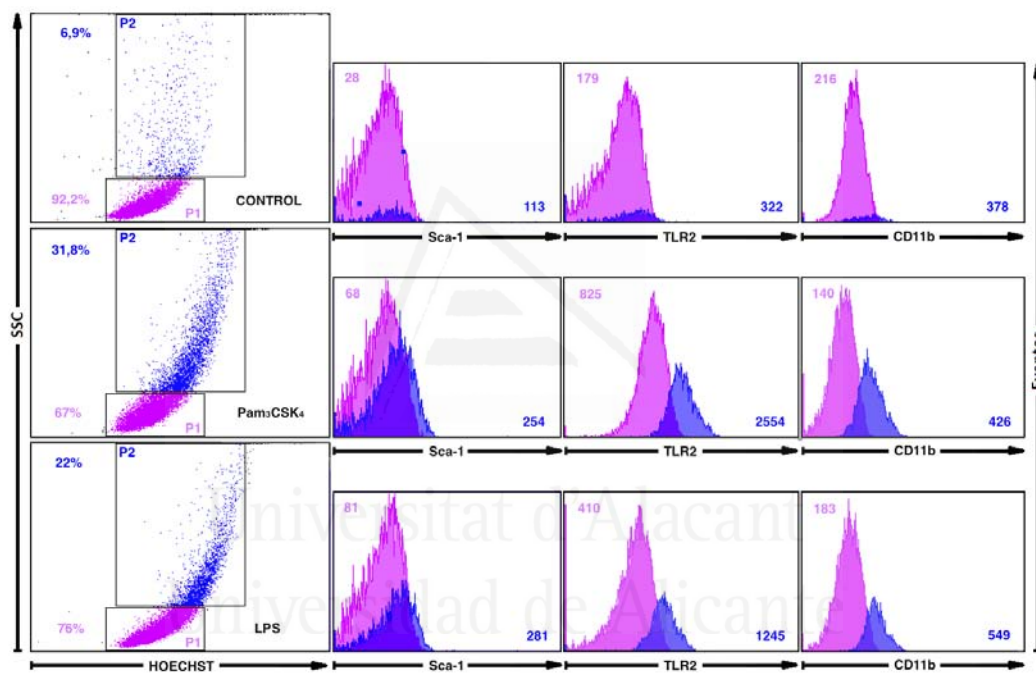


Figura 4.13: Análisis mediante citometría de flujo de la intensidad de fluorescencia de los marcadores CD11b, TLR2 y Sca-1 en células $Lin^- Sca-1^+ CD45^-$ de retina de ratón adulto. Las células fueron purificadas mediante un separador celular e incubadas inmediatamente después de la separación durante 12 días bajo tres condiciones: sin estímulos en el medio de cultivo (control) y en presencia de los ligandos Pam₃CSK₄ (0,125 μ g/mL) y LPS (1 μ g/mL). Se muestra, en un histograma biparamétrico SSC frente a la fluorescencia de la sonda Hoechst, las 3 poblaciones, control y estimuladas con Pam₃CSK₄ (0,125 μ g/mL) y LPS (1 μ g/mL). Cada población es a su vez analizada en tres histogramas monoparamétricos correspondientes a la intensidad de fluorescencia de los anticuerpos monoclonales anti-TLR2, anti-Sca-1 y anti-CD11b en las dos poblaciones obtenidas: SSC Bajo (P1 magenta) y con SSC alto (P2 azul). Los valores mostrados representan el tanto por cien de cada población en los histogramas biparamétricos y el valor medio de fluorescencia para cada pico (población) en los histogramas monoparamétricos. Se muestran los resultados de un experimento representativo de dos.

RESULTADOS

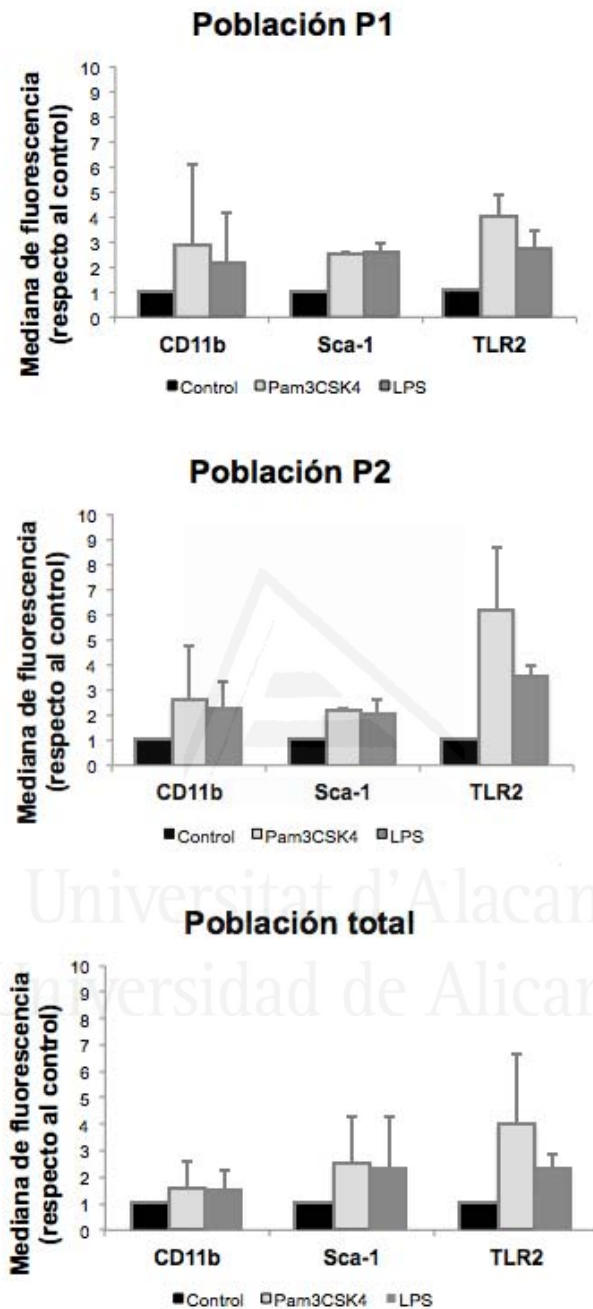


Figura 4.14: Histograma que muestra la media de fluorescencia de los marcadores CD11b, TLR2 y Sca-1 en células $Lin^- Sca-1^+ CD45^-$ purificadas e incubadas durante 12 días, sin estímulos (control) y con los estímulos Pam₃CSK₄ (0,125 μ g/mL) y LPS (1 μ g/mL) para P1, P2 y de la población total, analizadas por citometría de flujo en dos experimentos independientes. Los datos están normalizados respecto a la población control.

Si tenemos en cuenta las medias de fluorescencia obtenidas para cada condición y para las dos poblaciones por separado P1 (población magenta de bajo SSC) y P2 (población azul de alto SSC) de la figura anterior, podemos confirmar el aumento en la expresión del marcador TLR2 frente a los otros marcadores en la población estimulada con el ligando Pam₃CSK₄ (Fig 4.14).

A la vista de los resultados expuestos podemos concluir que la incubación de la población Lin⁻ Sca-1⁺ CD45⁻ con los ligandos Pam₃CSK₄ y LPS induce una proliferación de las células y un aumento en la expresión de TLR2. Aparece también una subpoblación de células que expresan la proteína CD11b, lo que parece indicar un aumento en la diferenciación de las células. Estos datos implicarían a los TLR2 y TLR4 en los procesos de proliferación y diferenciación celular en las células Lin⁻ Sca-1⁺ CD45⁻ de la retina de ratón adulto.

4.5. OBTENCIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR A PARTIR DE CÉLULAS PROGENITORAS DE RETINA ADULTA

Las líneas celulares inmortales, proporcionan una herramienta muy útil para el estudio de procesos básicos celulares. Se obtienen habitualmente mediante la sobreexpresión de oncogenes exógenos introducidos en las células nativas o bien mediante inmortalización espontánea. La inmortalización de las células altera las características innatas de las células e incrementa el riesgo de formación de tumores cuando se utilizan para trasplantes *in vivo*.

Hasta la fecha se han obtenido varias líneas celulares inmortalizadas a partir de células de la retina, procedentes de las células de Müller (Giannelli et al., 2011; Limb et al., 2002; Otteson and Phillips, 2010; Sarthy et al., 1998; Tomi et al., 2003), de células ganglionares (Krishnamoorthy et al., 2001), de fotorreceptores (Al-Ubaidi et al., 1992; Seigel, 1996), de células endoteliales (Hosoya et al., 2001; Su et al., 2003), de pericitos (Kondo et al., 2003) y de astrocitos (Scheef et al., 2005).

Debido al interés que suponen las líneas celulares que hemos comentado, decidimos intentar obtener una línea celular estable a partir de células de retina, que nos sirviera como modelo de estudio de los mecanismos celulares básicos en la retina y que pudiera servir también como modelo en estudios de neuroto-

RESULTADOS

xicidad y neuroprotección. En etapas posteriores se podrá evaluar también su utilidad en estudios de neuroregeneración. Para ello decidimos seguir el método descrito inicialmente por Hicks y Courtois (*Hicks and Courtois, 1990*) y modificado por Florian (*Florian et al., 2008*) para la obtención de líneas celulares inmortalizadas espontáneamente a partir de cultivos de células de Müller. Decidimos realizar los cultivos a partir de retinas de animales adultos para comprobar su potencial en procesos de neuroregeneración, puesto que hasta la fecha sólo se han realizado estudios con animales en edad perinatal. Siguiendo el método descrito, y partiendo de las retinas de cuatro ratones C57BL/6J de 8 semanas de edad, se obtuvo una línea celular inmortalizada de forma espontánea. Nombramos esta línea celular como MU-PH1 ya que proceden de un cultivo de células de Müller (MU) y expresan marcadores de fotorreceptores (PH). Bajo condiciones de cultivo *in vitro*, estas células han demostrado tener una morfología elongada, similar a las células gliales (Fig. 4.15). Hasta la fecha, las células han sido objeto de más de 80 pases y se han congelado y descongelado varias veces sin perder sus características morfológicas.

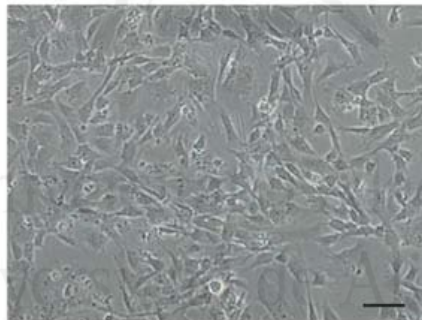


Figura 4.15: Imagen de la línea celular MU-PH1 en condiciones estándar de cultivo *in vitro*. Se muestra la imagen obtenida mediante microscopio óptico, con 10 aumentos. La barra de escala representa 50 μm .

4.6. CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR MU-PH1

A continuación pasamos a caracterizar la línea celular obtenida, su genotipo y fenotipo.

4.6.1. Estudio de la pérdida de diferenciación: formación de neuroesferas

Se ha descrito que las células de Müller de mamíferos poseen propiedades de células progenitoras de la retina y generan nuevas neuronas después de una lesión (Bringmann et al., 2009; Fischer and Bongini, 2010; Fischer and Reh, 2001; Kohno et al., 2006; Wohl et al., 2009). Como está bien descrito, las células de Müller murinas, bajo condiciones *in vitro* son capaces de volverse a diferenciar a distintos tipos celulares bajo los estímulos adecuados (Florian et al., 2008; Hicks and Courtois, 1990). Para estudiar su capacidad de desdiferenciación, las células se transfirieron a medio sin suero fetal bovino (SRM) y con factor de crecimiento EGF. Tras varios días en cultivo en estas condiciones se formaron neuroesferas, con características similares a las descritas en la bibliografía (Florian et al., 2008; Hicks and Courtois, 1990). Las neuroesferas aparecieron a partir del quinto día de cultivo y permanecieron durante varias semanas, incrementándose su tamaño y su número (Fig. 4.16).

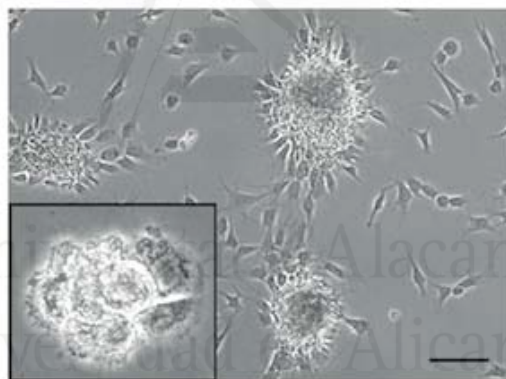


Figura 4.16: Imagen de neuroesferas formadas por las células de la línea celular MU-PH1 tras 10 días de cultivo en SRM suplementado con 30ng/mL de EGF. Imagen obtenida mediante microscopio óptico con 10 aumentos. Ampliación de una neuroesfera observada por microscopio óptico. La barra de escala representa 50 μm .

Al cultivar las células en las mismas condiciones anteriores y sobre sustrato de laminina/ornitina algunas células se diferenciaron en células con morfología similar a la de las neuronas, como también se había descrito previamente por otros autores (Florian et al., 2008) (Fig 4.17).

Estos resultados confirman que la línea celular MU-PH1 tiene características de células progenitoras, con capacidad de desdiferenciación y de posterior diferenciación hacia células de morfología neuronal.

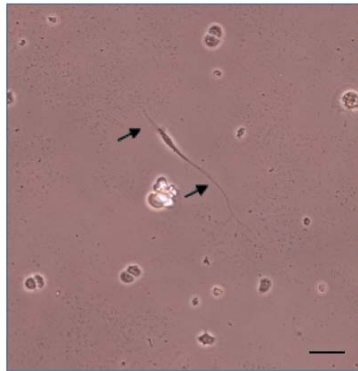


Figura 4.17: *Imagen de células de morfología neuronal formadas por las células de la línea celular MU-PH1 in vitro en condiciones de SRM. Las flechas señalan ramificaciones con aspecto de neuritas. Imagen obtenida mediante microscopio óptico con 10 aumentos. La barra de escala representa 50 μ m.*

4.6.2. Estudio de la expresión de marcadores celulares y proteínas relacionadas con la visión

Para caracterizar la línea celular MU-PH1, estudiamos la expresión de diversos marcadores celulares, tanto a nivel de expresión de ARNm (mediante RT-PCR), como de proteínas (utilizando las técnicas de Western blot e inmunofluorescencia).

4.6.2.1. Estudio de la expresión de marcadores celulares mediante RT-PCR

Los análisis por RT-PCR mostraron que las células MU-PH1 expresan ARNm que codifica para los marcadores de células gliales: vimentina, S-100 y glutamina sintetasa, si bien no expresan CRALBP, otro marcador de células de Müller. Esto puede deberse a la adaptación a las condiciones de cultivo, como se ha descrito por otros grupos para este y otros marcadores (Guidry, 1996; Hauck et al., 2003) (Fig. 4.18). Comprobamos también que las células de la línea MU-PH1 expresan marcadores de células madre neurales, incluyendo nestina, Abcg2, α -tubulina, β -III-tubulina y Ascl1, mientras que no se observó expresión de Notch1 (Fig. 4.18). Por otra parte, no se detectó la expresión de marcadores correspondientes a otros tipos celulares, como astrocitos (GFAP), células bipolares (CHX10), células amacrinas (Pax6) o endotelio (CD35), por lo que descartamos su presencia a modo de contaminante en el cultivo (Fig. 4.18). Se descartó también la posibilidad de contaminación con EPR puesto que no se detectaron células pigmentadas desde el primer pase del cultivo.

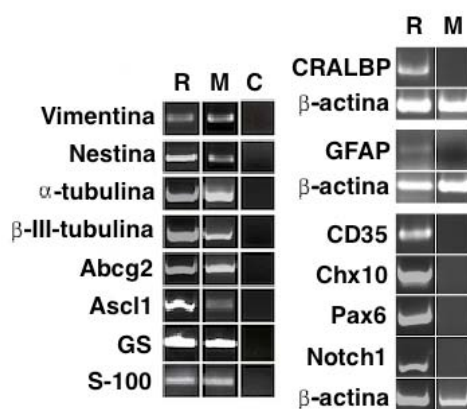


Figura 4.18: Amplificación por RT-PCR a partir de ADNc de la línea celular MU-PH1, utilizando oligonucleótidos específicos anti-vimentina, anti-nestina, anti- α -tubulina, anti- β -III-tubulina, anti-Abcg2, anti-Ascl1, anti-glutamina sintetasa (GS) y anti-S-100; se utilizó como control positivo ADNc de retina de ratón adulto C57BL/6J. Se incluyó un control negativo sin ADNc en cada amplificación (R: retina, M: línea celular MU-PH1, C: control negativo).

4.6.2.2. Estudio de la expresión de marcadores celulares mediante Western blot

El análisis mediante Western blot confirmó la expresión de los marcadores vimentina, nestina, β -III-tubulina y Abcg2. Se descartó la expresión de CRALBP. Como control positivo se utilizó la expresión de GAPDH (Fig. 4.19).

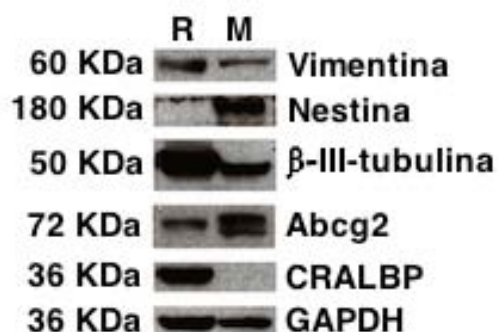


Figura 4.19: Estudio de la expresión proteica mediante Western blot en la línea MU-PH1 utilizando anticuerpos específicos para vimentina, nestina, β -III-tubulina, Abcg2, CRALBP y GAPDH.

4.6.2.3. Estudio de la expresión de marcadores celulares mediante inmunofluorescencia

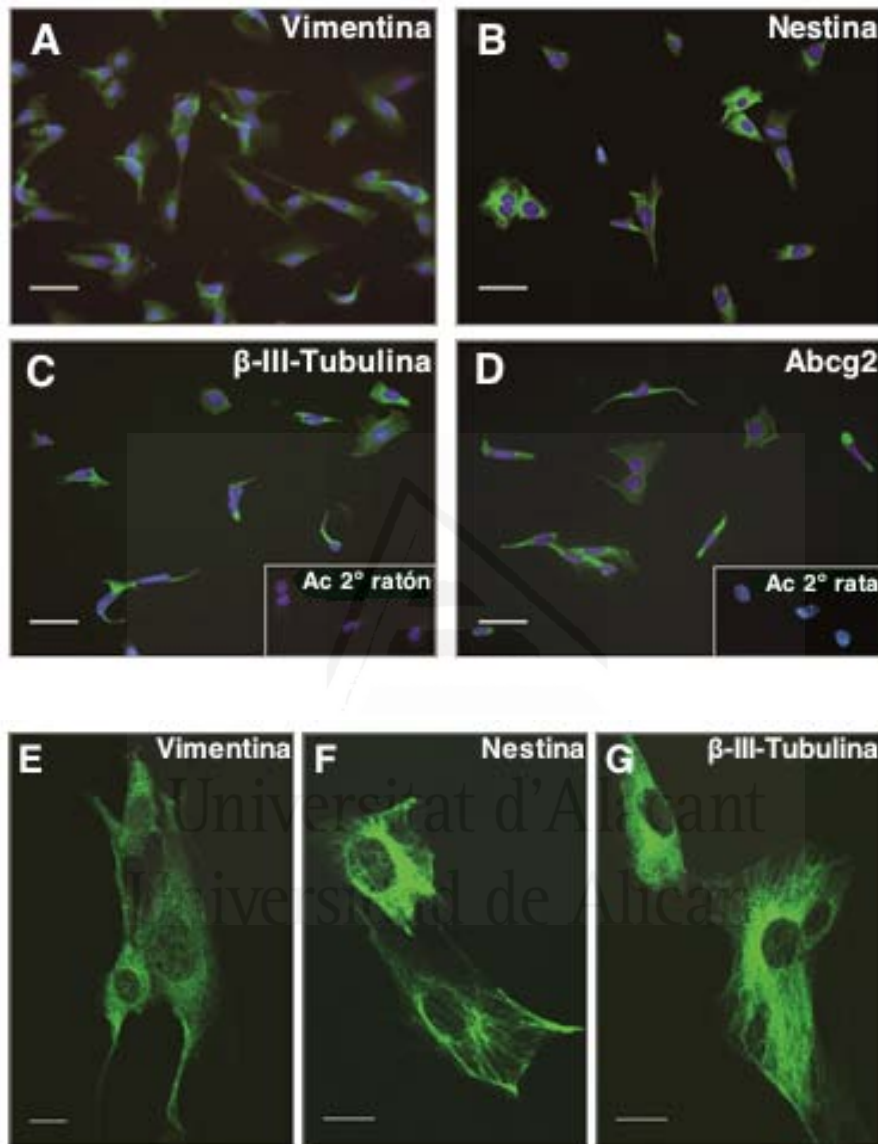


Figura 4.20: *Expresión de marcadores de células madre y neuronales por la línea celular MU-PH1. Se muestra la señal obtenida por inmunofluorescencia de células MU-PH1 teñidas con anticuerpos específicos para vimentina (A), nestina (B), β -III tubulina (C), y Abcg2 (D). Los insertos en C y D muestran los controles negativos sin anticuerpo primario. Se muestran imágenes a gran aumento obtenidas en el microscopio confocal de células MU-PH1 teñidas con anticuerpos frente a vimentina (E), nestina (F) y β -III-tubulina (G), donde los microtúbulos y los filamentos intermedios se pueden observar en detalle. Las barras de escala representan, 50 μ m en A, B, C, D y 20 μ m en E, F, G.*

Mediante inmunofluorescencia se confirmó la expresión de vimentina (Fig. 4.20 A), nestina (Fig. 4.21 B), β -III-tubulina (Fig. 4.20 C) y Abcg2 (Fig. 4.20 D). Los anticuerpos frente a la vimentina, proteína formadora de los filamentos intermedios de la célula, tiñe la red típica de filamentos que se extiende a través de todo el citoplasma (Fig. 4.20 E).

Como en el caso de la vimentina, las imágenes de alta resolución de las células inmunomarcadas con anticuerpos frente a nestina y β -III-tubulina revelaron la red característica de filamentos y microtúbulos en todo el citoplasma, sobre todo en la zona perinuclear (Fig. 4.20 F, G).

El análisis mediante inmunofluorescencia de la línea celular MU-PH1 también mostró la expresión de los marcadores de fotorreceptores: opsinas rojo/verde (Fig. 4.21 A) y azul (Fig. 4.21 B), ambos fotorreceptores específicos de conos y transducina (Fig. 4.21 C) proteína fundamental para la transducción presente en conos y bastones. Como era de esperar, los controles que carecían de anticuerpo primario, secundario o ambos anticuerpos, no dieron un marcaje detectable (Fig. 4.21 D,E,F).

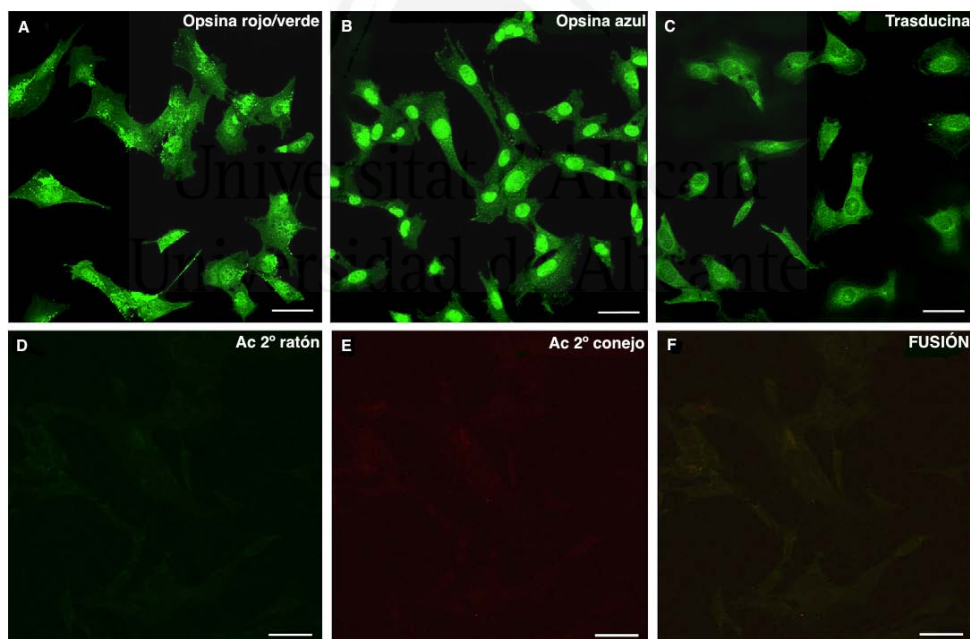


Figura 4.21: Estudio de la expresión de opsinas por la línea celular MU-PH1. Imágenes de las células MU-PH1 cultivadas bajo condiciones *in vitro* estándar, marcadas con anticuerpos frente a la opsina rojo/verde (A), a la opsina azul (B), a la transducina (C) y observadas mediante microscopio confocal. Controles negativos que carecen de anticuerpos primarios (D, E, F). Las barras de escala representan 50 μ m.

4.6.3. Estudio de la expresión de otras proteínas no relacionados con la visión

Resulta imprescindible para realizar una buena caracterización de la línea celular MU-PH1, el estudio de otros marcadores celulares que permitan conocer lo máximo posible las características de las células, lo que permitirá evaluar mejor su potencial utilidad en estudios posteriores de neurotoxicidad, neuroregeneración o neuroreparación.

4.6.3.1. Expresión de receptores de melatonina

Se ha descrito que las células madre neurales expresan receptores funcionales de melatonina MT1 y que estos receptores MT1 se colocan con marcadores neurales y gliales (Niles et al., 2004).

La detección de los receptores de la melatonina en células madre/progenitoras neurales sugiere la participación de esta hormona pleiotrópica en el desarrollo neurológico de los mamíferos. Por otra parte, diversos estudios demuestran la capacidad de la melatonina para inducir la expresión de factores neurotróficos, lo que apoya un papel funcional sobre todo para el receptor MT1 (Niles et al., 2004).

Se analizó la expresión de los receptores MT1 y MT2 por técnicas de inmunofluorescencia en la nueva línea celular MU-PH1.

Los resultados demostraron que las células MU-PH1 también expresan estos receptores (Fig. 4.22). Como se puede observar en la figura 4.22, las células marcadas con el anticuerpo anti-MT1, muestran una alta inmunoreactividad en áreas específicas de la superficie celular, con una fluorescencia muy intensa y localizada. En cambio, las células marcadas con el anticuerpo anti-MT2 muestran una fluorescencia menos intensa y repartida uniformemente por toda la célula.

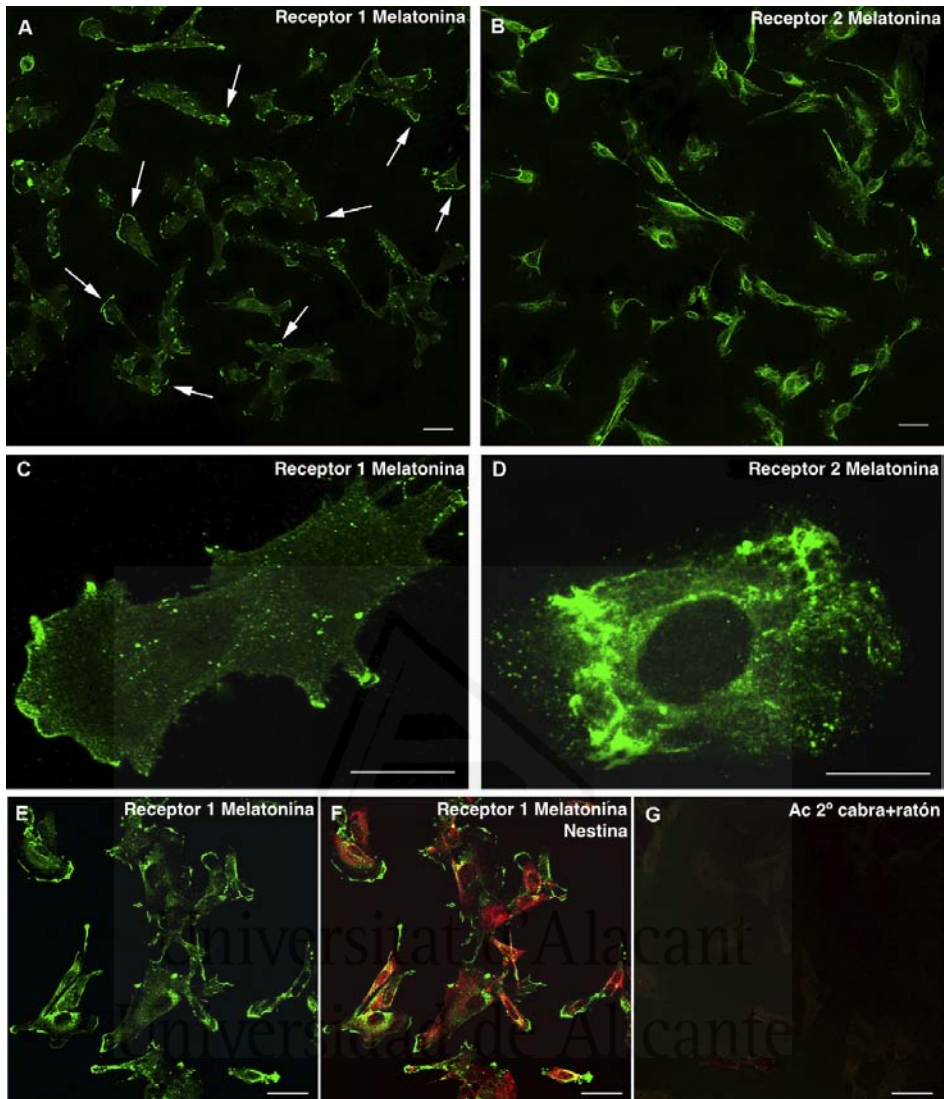


Figura 4.22: *Expresión de los receptores de melatonina MT1 y MT2 por las células MU-PH1. Las imágenes fueron obtenidas por inmunofluorescencia en un microscopio confocal. (A) Las células MU-PH1 marcadas con un anticuerpo policlonal anti-receptor de melatonina MT1, muestran alta inmunoreactividad en áreas específicas de la superficie celular (flechas). (B) En las células MUPH1 marcadas con anticuerpos policlones anti-receptor de melatonina MT2, la inmunofluorescencia aparece distribuida uniformemente a lo largo de la célula. (C) Fotografía de alta resolución de una célula marcada con el anticuerpo anti-MT1 (D) Fotografía de alta resolución de una célula marcada con el anticuerpo anti MT2. (E) Tinción de los receptores MT1 en verde. (F) Doble tinción de los receptores MT1 en verde y nestina en rojo. (G) Control negativo sin anticuerpos primarios. Las barras de escala representan 50 μm (A, B, E, F, G) y 20 μm (C, D).*

4.6.3.2. Expresión de canales de sodio dependientes de voltaje

Se ha descrito que los canales de Na⁺ dependientes de voltaje tienen una gran relevancia en la retina. Están implicados en muchos procesos de la visión y están presentes en las neuronas de la retina. Diversos estudios han demostrado cómo influyen estos canales en el desarrollo y funcionamiento de la visión. Así, se ha demostrado que las células bipolares tienen un papel fundamental para codificar la luz (Saszik and DeVries, 2012), que mutaciones en el canal Nav 1.6 provocan defectos graves en la visión escotópica (Smith and Côté, 2012), o que en las células amacrinas la modulación de la señal depende de los canales de Na⁺ (Tian et al., 2010; Trenholm et al., 2012).

Se han identificado nueve isoformas de canales de Na⁺ en mamíferos (Ertel et al., 2000; Goldin et al., 2000). En nuestro trabajo decidimos seleccionar los receptores de subtipo Nav1.1, Nav1.2 y Nav1.6, por tener *a priori* una mayor relación con el proceso de visión (Duflocq et al., 2008; Waxman, 2006). Por ello, realizamos un estudio de la expresión de dichos canales en cultivos de células MU-PH1 mediante RT-PCR.

Tal y como observamos en la figura 4.23 las células MU-PH1 expresan ARNm de los receptores Nav1.1, Nav1.2 y Nav1.6.



Figura 4.23: Amplificación por RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos para Nav1.1 (1.1), Nav1.2 (1.2) y Nav1.6 (1.6). Como control positivo se utilizó la amplificación específica de β-actina (β). Expresión obtenida apartir de extractos de retina de ratón adultos C57BL/6J (RETINA) y de la línea celular (MU-PH1).

A continuación pasamos a estudiar la posible funcionalidad de los canales de Na⁺ dependientes de voltaje en la línea MU-PH1, estudiando el efecto de la veratridina. Estudiamos la posible toxicidad de dosis crecientes de veratridina (inhibidor de los canales de Na⁺), incubada durante 22 horas, en presencia de medio sin SBF. Como control comparamos con el daño producido por una mezcla de oligomicina/rotenona que produce muerte celular por estrés oxidativo.

En la figura 4.24 se muestra la curva dosis respuesta de veratridina, en la que se observa que sólo se produce muerte celular, medida por XTT, a dosis muy altas de veratridina. Previamente se comprobó que el DMSO utilizado como disolvente no produjo daño en las células.

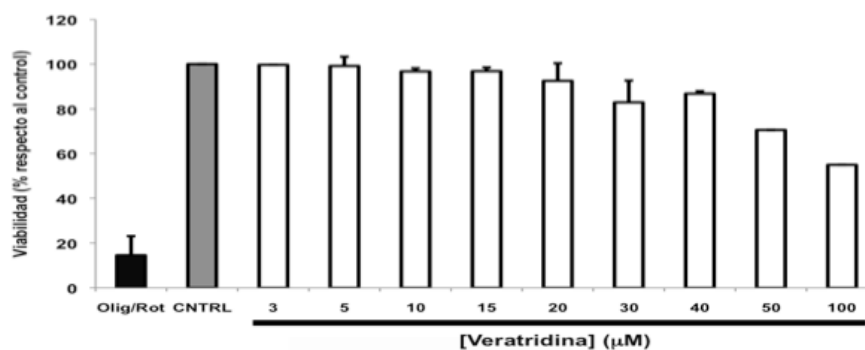


Figura 4.24: Curva dosis-efecto de la veratridina en la línea celular MU-PH1. Se presentan los datos de las medias más la desviación estándar de tres experimentos independientes.

A continuación estudiamos el efecto conjunto de veratridina y ouabaina. Como podemos observar en la figura 4.25, la incubación de ambas toxinas tampoco produjo un efecto marcado de muerte celular.

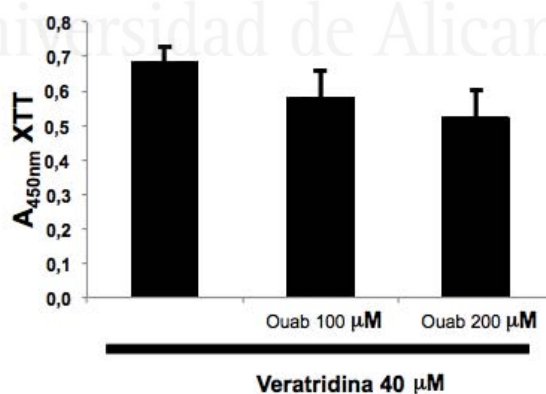


Figura 4.25: Efecto de la incubación de la línea celular MU-PH1 en presencia de veratridina y ouabaina. Se muestran determinaciones de viabilidad medida mediante el ensayo de XTT. Se presentan los datos de las medias más la desviación estándar de tres experimentos independientes.

RESULTADOS

Así pues, los resultados obtenidos permiten demostrar la expresión de canales de Na^+ dependientes de voltaje en la línea celular MU-PH1 pero no la funcionalidad de los mismos. A pesar de ello, no podemos descartar que *in vivo* estos canales sean funcionales en células con características similares a la de esta línea celular.

4.6.4. Estudio de la sensibilidad a la luz

Dado que las células MU-PH1 expresan marcadores de células fotosensibles, decidimos estudiar su funcionalidad mediante la respuesta de las células a estímulos luminosos.

Para estudiar la presencia de opsinas funcionales en cultivos de células MU-PH1, determinamos los niveles de Ca^{2+} libre intracelular en respuesta a la luz, utilizando el colorante Fluo-4 AM sensible al Ca^{2+} .

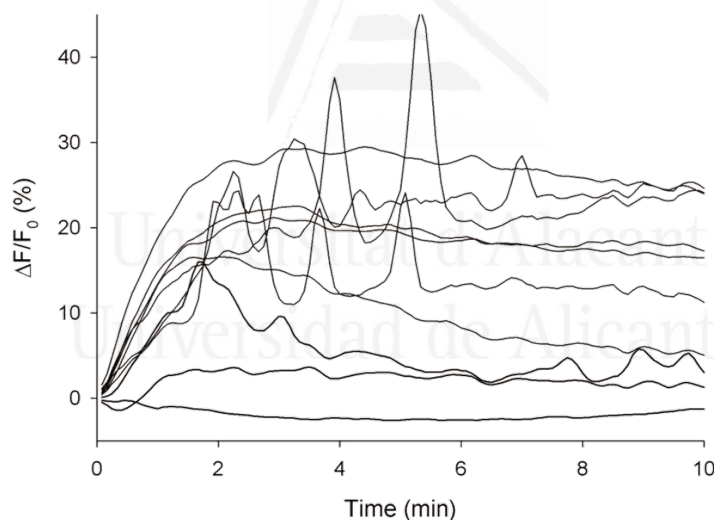


Figura 4.26: Se muestran las respuestas a la luz de células MU-PH1 en cultivo. Las trayectorias de las líneas representan cambios de fluorescencia en relación con el tiempo ($\Delta F/F_0$) de células MU-PH1 marcadas con el colorante sensible al calcio Fluo-4. Los cambios de fluorescencia reflejan los incrementos de calcio libre intracelular medido en las células al ser expuestas a la luz de 480 nm, durante el tiempo de 10 minutos. Cada trazo corresponde a la respuesta de una sola célula.

Como se muestra en la figura 4.26, la estimulación de las células con luz de 480 nm en estímulos de 10 minutos de duración, produjo respuestas transitorias, con aumentos rápidos y lentos de Ca^{2+} , en la mayoría de las células

analizadas. Durante la estimulación con luz, la mayoría de las células sensibles mostraron un aumento progresivo del Ca^{2+} libre intracelular, que llegó al máximo entre los 2-4 minutos después del inicio del estímulo, y se mantuvo elevado durante los 10 minutos de estímulo. Además de estos movimientos transitorios lentos de Ca^{2+} , varias células fotosensibles mostraron también movimientos transitorios rápidos de Ca^{2+} que, en algunos casos, se repitieron periódicamente cada 1-2 minutos.

Estos resultados coinciden con los observados en estudios realizados por otros autores, utilizando los mismos estímulos luminosos, en diferentes tipos de células (Hollborn et al., 2011; Nieto et al., 2011). Por lo tanto, estas células MU-PH1 demuestran tener opsinas funcionales

4.7. EXPRESIÓN Y FUNCIONALIDAD DE RECEPTORES TIPO TOLL EN LA LÍNEA CELULAR MU-PH1

Diversos estudios han descrito la expresión de los TLRs en células gliales o progenitoras, y se han relacionado con funciones relevantes aparte de las bien conocidas en la respuesta inmunitaria. Así los TLR4 se han descrito como reguladores negativos de la proliferación de células progenitoras de la retina (Shechter et al., 2008) o inhibidores de la proliferación de células progenitoras en el hipocampo (Rolls et al., 2007). Por otra parte, TLR2 se ha relacionado con la diferenciación in vitro de células neurales progenitoras (Rolls et al., 2007) y con la proliferación de células madre hematopoyéticas (Megías et al., 2012; Yáñez et al., 2010). Dado que en la retina se ha confirmado la expresión de TLRs en células ganglionares, fotorreceptores, RPCs, glía: astrogliá, microgliá y Müller (Brito et al., 2004; Jiang et al., 2009; Kumar et al., 2004; Langmann, 2007; Okun et al., 2011; Shamsuddin and Kumar, 2011; Shechter et al., 2008), decidimos comprobar su expresión en la línea celular MU-PH1.

4.7.1. Estudio de la expresión de receptores tipo Toll en la línea celular MU-PH1

El estudio de la expresión de TLRs en la línea MU-PH1 se realizó mediante RT-PCR y citometría de flujo. La amplificación por RT-PCR mostró la expresión de TLR1, 2, 4 y 6 (Figura 4.27 A). Se decidió estudiar la expresión del receptor TLR2 en la superficie celular mediante citometría de flujo dado que

RESULTADOS

TLR2 es el receptor que mayor expresión muestra y tiene relación con los procesos de proliferación y diferenciación celular (Figura 4.27 B). Como se pudo comprobar, las células MU-PH1 expresan el receptor TLR2 en su superficie.

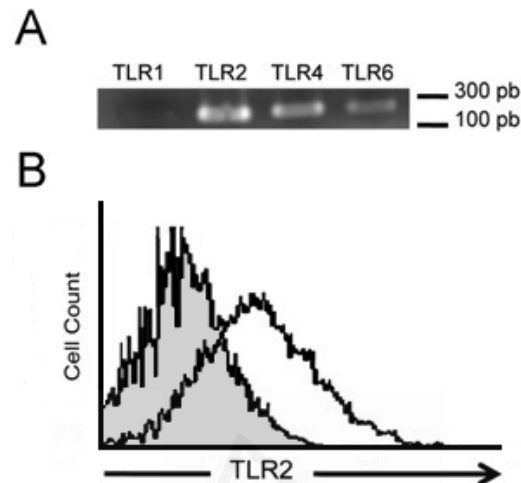


Figura 4.27: Expresión de TLRs en la línea celular MU-PH1. (A) Amplificación por RT-PCR de los TLRs 1, 2, 4 y 6 a partir de cDNA de MU-PH1. (B) Confirmación de la expresión de TLR2 por citometría de flujo utilizando anticuerpos anti-TLR2; También se muestra la señal del isotipo control para este anticuerpo.

4.7.2. Estudio de la funcionalidad de receptores tipo Toll en la línea celular MU-PH1

4.7.2.1. Estudio del aumento de la expresión de TLRs en respuesta a la activación por MAMPs

Es bien sabido que los TLRs reconocen patrones moleculares conservados de patógenos microbianos e inducen la activación de la respuesta inmunitaria innata, así como la posterior respuesta inmunitaria adaptativa. El receptor TLR2, que forma el heterodímero TLR2/TLR6, está implicado en la señalización inducida por *C. albicans* y una activación del mismo induce su sobreexpresión en diversos tipos celulares (Yáñez et al., 2009). En consecuencia, decidimos comprobar si *C. albicans* es capaz de inducir la sobreexpresión de los TLRs de las células MU-PH1. Para ello coincubamos las células MU-PH1 con la cepa *C. albicans* ATCC 26555, tanto inactivada por calor (Fig. 4.28 A,B) como en su forma viable (Fig. 4.28 C,D) y analizamos la expresión de los genes TLR2 y TLR6 mediante RT-PCR semicuantitativa.

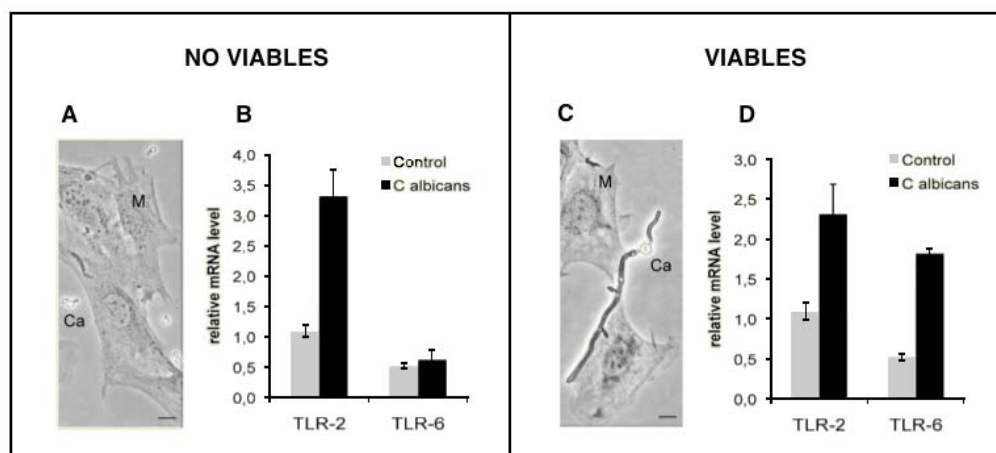


Figura 4.28: (A) Imagen de células MU-PH1 (M) coincubadas con células de levadura *C. albicans* ATCC 26555 (Ca) inactivadas por calor. La escala representa 20 μm. (B) Análisis mediante RT-PCR semicuantitativa de la expresión de TLR2 y TLR6 a partir de ARNm de células MU-PH1, después de 24 horas de incubación conjunta con células de levadura *C. albicans* ATCC 26555 inactivadas por calor. Se muestran los valores normalizados respecto a la expresión de β-actina. (C) Imagen de células MU-PH1 (M) coincubadas durante 4 horas con células de levadura *C. albicans* ATCC 26555 (Ca) viables; En estas condiciones experimentales *C. albicans* desarrolla tubos germinales y abundantes hifas verdaderas. La escala representa 20 μm. (D) Análisis mediante RT-PCR semicuantitativa de la expresión de ARNm de TLR2 y TLR6 en células MU-PH1 después de 4 horas de incubación conjunta con células de levadura *C. albicans* ATCC 26555 viables. Proporción 5:1, levaduras:células murinas. Se muestran los valores normalizados respecto a la expresión de β-actina. Los datos corresponden a los valores promedios de dos experimentos independientes, cada uno de ellos con medidas cuadruplicadas para cada valor analizado.

En ambos casos se produjo un aumento de los niveles de expresión de TLR2 y TLR6 como se observa en las figuras 4.29 B y D. Estos resultados sugieren que los TLR2 de las células MU-PH1 son funcionales.

4.7.2.2. Estudio del efecto de la estimulación de los TLRs de las células MU-PH1 sobre la proliferación celular

Para estudiar la posible implicación de TLR2 en procesos de proliferación en las células MU-PH1.

Analizamos en primer lugar la influencia de la activación de TLR2 en el desarrollo de neuroesferas en un cultivo de células MU-PH1, incubando las células en SRM suplementado en EFG y en presencia de Pam₃CSK₄ o de células de levadura de *C. albicans* ATCC 26555 inactivadas por calor. Como pudimos com-

RESULTADOS

probar, la presencia de ligandos de TLRs causó un aumento estadísticamente significativo en la formación de neuroesferas en ambos casos (Fig. 4.29).

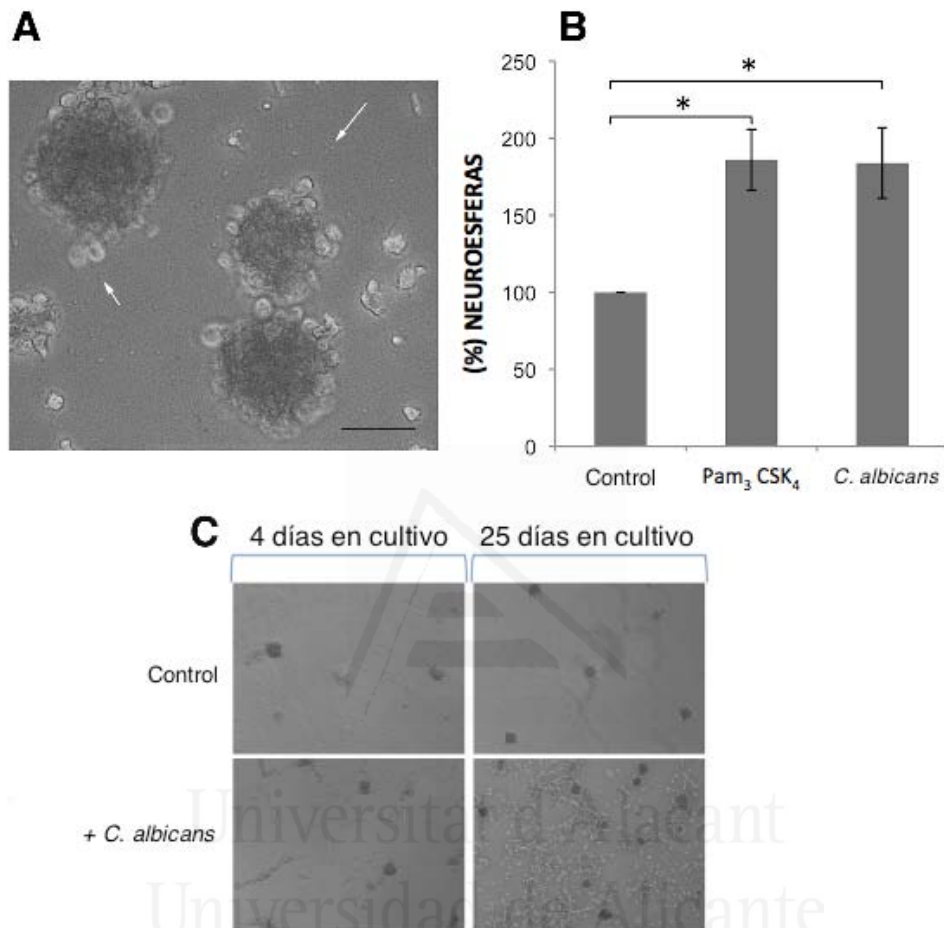


Figura 4.29: Formación de neuroesferas a partir de células MU-PH1 en cultivo, incubadas en SRM, con EGF (30 ng/mL) y en presencia de ligando de TLR2 Pam₃CSK₄ (0,125 µg/mL) o *C. albicans*. (A) Imagen de las neuroesferas tras dos semanas en cultivo en presencia de *C. albicans* (flechas). (B) Histograma que muestra el número de neuroesferas formadas en presencia de los estímulos Pam₃CSK₄ (0,125 µg/mL) y *C. albicans*. El recuento de neuroesferas se realizó en tres experimentos independientes, en placas de 6 pocillos, contando un mínimo de dos pocillos para cada condición experimental. (C) Imágenes de las neuroesferas formadas sin estímulos (control) y en presencia de Pam₃CSK₄ (0,125 µg/mL) tras cuatro y veinticinco días en cultivo. Proporción 5:1, levaduras:células murinas. Se muestran campos representativos de cada condición. (*= $P.68$ $p < 0,05$, considerado significativo en el análisis de t-student). La barra de escala representa 100 µm.

A continuación estudiamos si la proliferación celular de las células MU-PH1 aumentaba como consecuencia de la activación de los TLRs por medio de li-

gandos y estímulos de estos receptores. La proliferación se estimó valorando el número de células viables mediante el ensayo de XTT. Los resultados se muestran en la figura 4.30, en la que podemos observar el aumento de la proliferación con respecto al control cuando la línea celular se incubó en presencia de Pam₃CSK₄ y de *C. albicans*. En cambio, no se observó un aumento de la población celular tras incubarse en presencia de LPS.

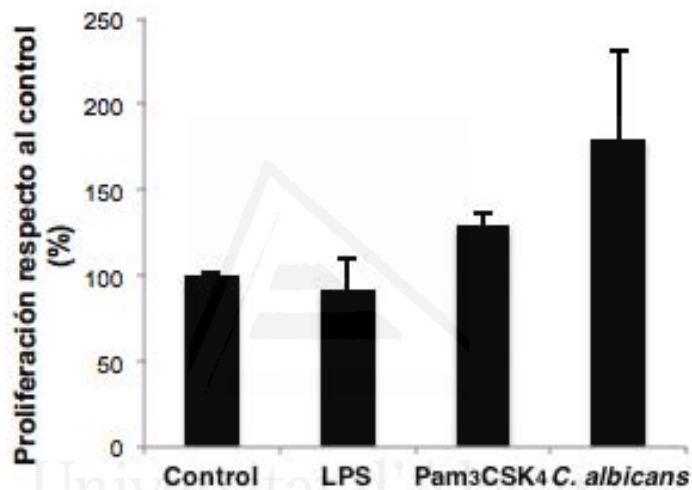


Figura 4.30: Histograma que muestra la proliferación celular de células MU-PH1 en ausencia (control) y presencia de los estímulos LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Pam₃CSK₄ (0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y *C. albicans* inactivadas por calor. Proporción 5:1, levaduras:células murinas. Los datos, obtenidos a partir de los valores de viabilidad celular medidos mediante el ensayo de XTT, se muestran normalizados respecto al control. Se muestran las medias y las desviación estándar de tres experimentos independientes.

Este hallazgo indica que TLR2 puede estar implicado en el proceso de proliferación en células progenitoras de la retina y coincide con resultados previos de otros autores y de nuestro grupo sobre la participación de TLR2 en el control de los procesos de proliferación de células madre (Megías et al., 2012; Yáñez et al., 2013). Este efecto proliferativo se opone a la función restrictiva de TLR4 descrita para la proliferación de la retina, lo que sugiere que los TLRs pueden modular las respuestas en este proceso.

4.7.2.3. Estudio del efecto de la estimulación de los TLRs en las células MU-PH1 sobre la diferenciación celular

Dada la relación de los TLR2 con la proliferación de las células progenitoras, podemos pensar que en situaciones patológicas oculares en las que aparecen procesos proliferativos, como en el caso de la neovascularización, las células progenitoras presentes en la retina podrían contribuir en el desarrollo de este proceso, quizás mediante la activación de TLRs. La neovascularización garantiza la perfusión sanguínea en zonas dañadas, pero también es responsable de pérdidas irreversibles de la visión, como las que se producen en la Degeneración Macular Asociada a la Edad de tipo exudativo.

A continuación nos preguntamos si los TLRs podrían participar en fenómenos de diferenciación celular. Así, cabe pensar que, en caso de que participen en el proceso de neovascularización, quizá podrían diferenciarse a células de tipo endotelial. Para explorar esta posibilidad, tras mantener las células en cultivo durante 28 días en las condiciones ensayadas de desdiferenciación y producción de neuroesferas y en presencia de levaduras de *C. albicans* inactivadas por calor como estímulo de TLRs, purificamos ARNm y analizamos mediante RT-PCR la expresión de CD31, marcador de células endoteliales. Mediante este método no detectamos un aumento de la expresión de esta proteína (resultados no mostrados), por lo que no podemos proponer una relación directa con la neovascularización. En cualquier caso, dadas las características de nuestro estudio *in vitro*, no tenemos datos suficientes para descartar esta posibilidad, puesto que pueden ser necesarios otros factores o circunstancias presentes en las condiciones *in vivo*, que no hayamos reproducido en nuestros estudios.

4.7.2.4. Producción de citocinas: implicación de los TLRs de las células MU-PH1 en la respuesta inmunitaria

El papel principal reconocido de los TLRs es su implicación en la respuesta inmunitaria, en el reconocimiento de patógenos y la producción de citocinas como respuesta a la presencia de los mismos. TLR2 juega un papel clave en la respuesta inmunitaria innata a patógenos mediada a través de la producción de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF- α). El TNF- α es una citocina clave producida en abundancia por varias células del sistema inmunitario que reconocen ligandos microbianos por los receptores TLRs.

Para probar si la estimulación de los TLRs es capaz de inducir la secreción de TNF- α en células MUPH1, se coincubaron cultivos de células MU-PH1 con

células de *C. albicans* inactivadas por calor (levadura e hifa) y con Pam₃CSK₄, ligando puro de TLR2.

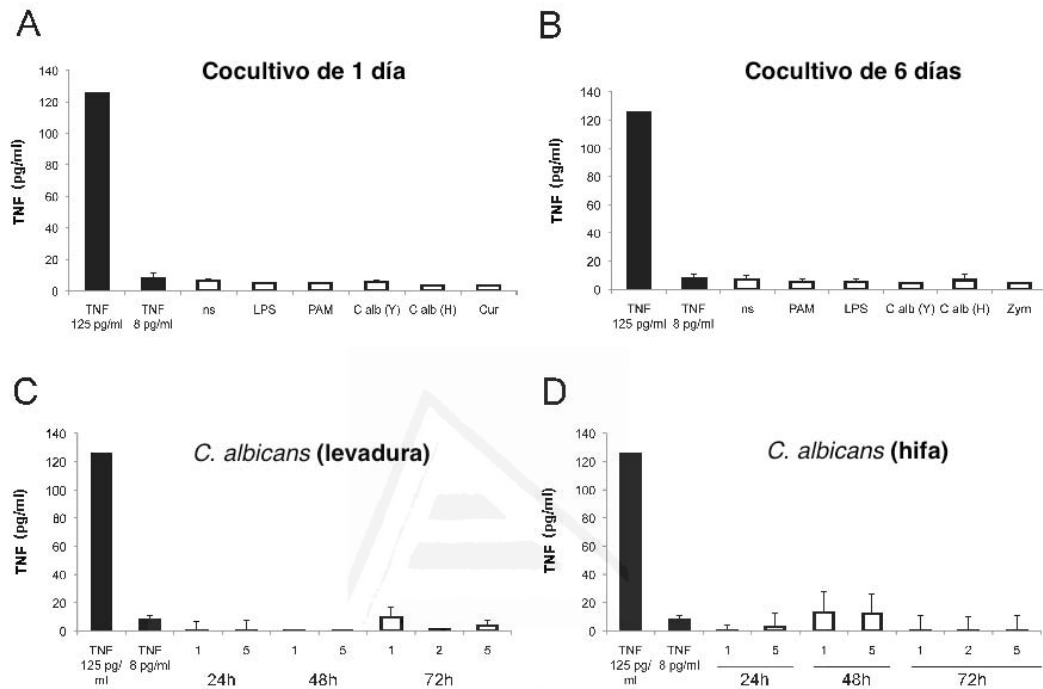


Figura 4.31: Medida de la secreción de TNF- α por la células MU-PH1 tras su incubación con Pam₃CSK₄ (0,125 μ g/mL), LPS (1 μ g/mL), *C. albicans* y zimosan en los tiempos que se indican. Proporción 5:1, levaduras:células murinas. Se muestra la media de dos experimentos independientes en los que cada condición se ensayó por duplicado.

Para evaluar la posible participación de otros TLRs se añadió también LPS, ligando puro de TLR4. Se ensayaron diferentes períodos de tiempo, de 1 a 7 días. Se probó también el efecto de partículas del glucano zimosan, que también se une a los TLR2. Se midió la secreción de TNF- α al medio de cultivo mediante ELISA ("Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay").

No se observaron cambios morfológicos en las células cultivadas en ninguna de las condiciones ensayadas. La estimulación con *C. albicans*, Pam₃CSK₄, LPS o zimosan no provocó cambios morfológicos en células cultivadas ni la secreción de TNF- α en las distintas condiciones utilizadas. Este resultado indica que, en nuestras condiciones *in vitro*, los TLRs no median la producción de TNF- α en células MU-PH1. Es posible que esto se deba a la falta de expresión de la

señal completa de la vía de transducción de TLR2 en condiciones *in vitro*, por lo que con estos resultados, no es posible descartar un papel de TLR2 en la producción de citocinas *in vivo* (Fig. 4.31).

4.8. UTILIZACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR MU-PH1 COMO MODELO DE CRIBADO DE COMPUESTOS NEUROPROTECTORES

Una de las ventajas que ofrece trabajar con una línea celular de retina es la posibilidad de servir como modelo para el estudio de nuevas sustancias, permitiendo valorar los posibles efectos nocivos de dichas sustancias, así como su potencial neuroprotector y su posible aplicación en el tratamiento de patologías de la retina.

4.8.1. Estudio de la sensibilidad de la línea MU-PH1 a distintos estímulos nocivos

Para valorar la utilidad de la línea celular como modelo de cribado, analizamos en primer lugar la sensibilidad de las células MU-PH1 a diversos estímulos nocivos reconocidos. Cuantificamos la viabilidad celular tras el periodo de estímulo mediante el método de XTT.

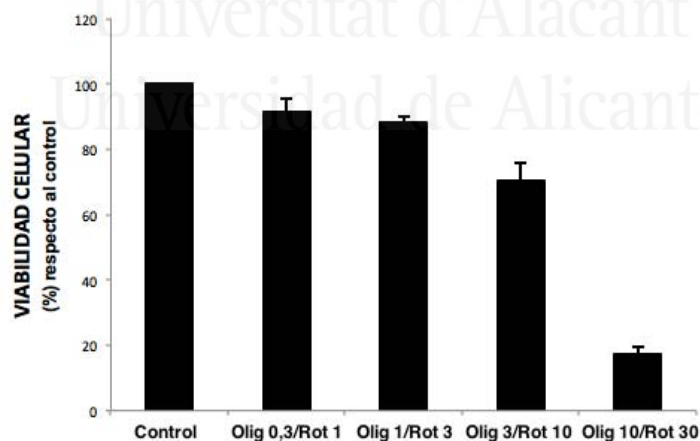


Figura 4.32: Curva dosis-respuesta de la administración conjunta de oligomicina (de 0,3 μM a 10 μM) y rotenona (de 1 μM a 30 μM) a las dosis indicadas y durante 24 horas en la línea celular MU-PH1, analizada mediante el ensayo de XTT. Se muestran los valores normalizados respecto al control. Los datos corresponden al valor de la media y la desviación estándar de cinco experimentos independientes, en los que cada condición se ensayó por cuadruplicado.

Como estímulo nocivo seleccionamos en primer lugar una combinación de oligomicina y rotenona, que producen la muerte celular mediante estrés oxidativo. Como se observa en la figura 4.32, concentraciones crecientes de oligomicina y rotenona produjeron un daño progresivamente mayor. Las células también se mostraron sensibles al agente apoptótico nitroprusiato sódico (Fig. 4.33 A).

4.8.2. Estudio del efecto neuroprotector de sustancias antioxidantes en la línea MU-PH1

A continuación ensayamos el efecto de diversas sustancias de conocido efecto antiapoptótico (TUDCA y ácido valproico) o antioxidante (vitamina E, melatonina y N-acetilcisteína) sobre las células MU-PH1 sometidas a un daño producido por nitroprusiato sódico (0,3 mM) (Fig. 4.33 A) o bien oligomicina (3 μ M)/rotenona (10 μ M) (Fig. 4.33 B), como se ha indicado anteriormente.

Los estímulos se mantuvieron durante 24 horas en la línea celular MU-PH1 con las siguientes concentraciones: nitroprusiato sódico (0,3 μ M) y oligomicina (3 μ M)/rotenona (10 μ M). Las sustancias antioxidantes se utilizaron para revertir el efecto fueron: vitamina E: 200 μ M, N-acetilcisteína: 2 mM, melatonina: 1 mM, TUDCA: 500 μ M y ácido valproico: 1 mM. A las 24 horas se realizó la medida de la viabilidad celular mediante el ensayo de XTT.

Como pudimos comprobar, al tratar las células con nitroprusiato sódico 0,3 μ M, la viabilidad celular disminuyó hasta un 64 % del valor control. Tanto la N-acetilcisteína como la vitamina E revirtieron parcialmente el daño producido, consiguiendo una viabilidad del 87 % y del 70 % respectivamente a las concentraciones ensayadas. Con el resto de sustancias no se consiguió revertir el efecto lesivo.

En cambio el TUDCA sí consiguió revertir completamente el daño producido por la combinación de oligomicina y rotenona en las condiciones ensayadas.

Los resultados muestran que la línea celular MU-PH1 puede ser utilizada como modelo de estudio para el cribado de sustancias con propiedades antioxidantes y neuroprotectoras y así ser de utilidad en el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de patologías de la retina.

RESULTADOS

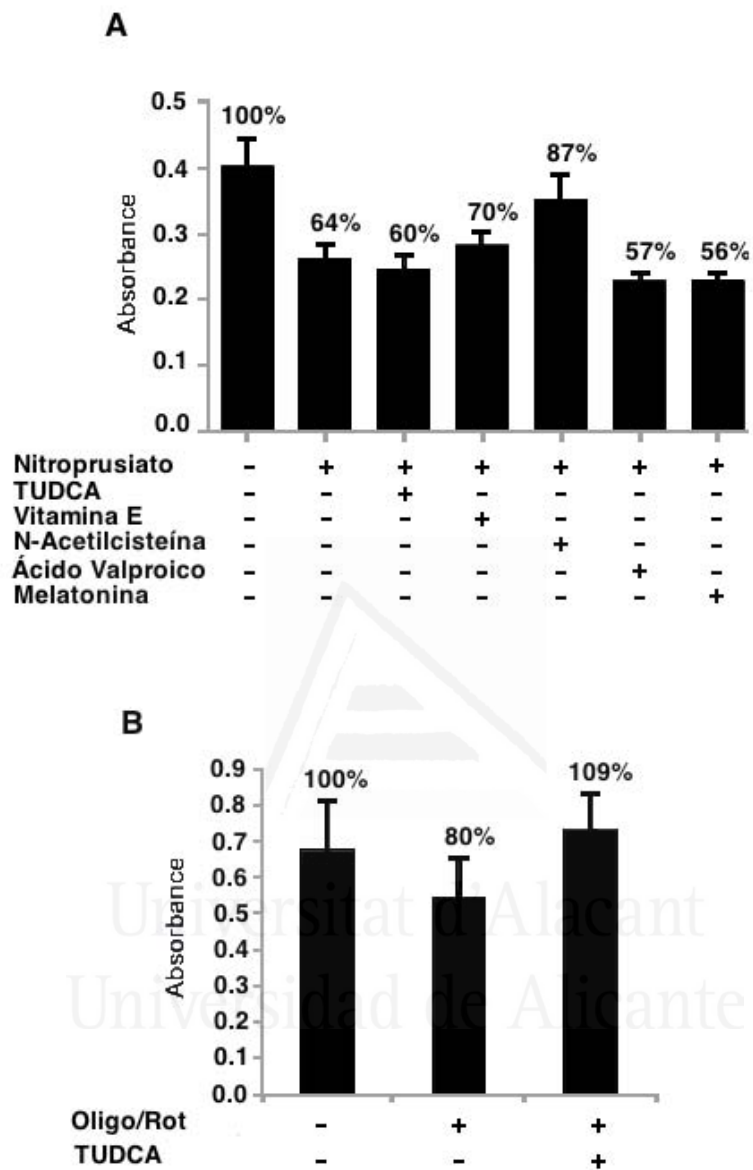


Figura 4.33: Estudio del efecto neuroprotector de sustancias antioxidantes frente a el efecto nocivo de (A) nitroprusiato sódico ($0,3 \mu\text{M}$) y (B) oligomicina ($3 \mu\text{M}$)/rotenona ($10 \mu\text{M}$), analizado en la línea celular MU-PH1. Las concentraciones utilizadas fueron vitamina E: $200 \mu\text{M}$, N-acetilcisteína: 2mM , melatonina: 1mM , TUDCA: $500 \mu\text{M}$ y ácido valproico: 1mM . Los estímulos se mantuvieron durante 24 horas previamente a la medida de la viabilidad celular. Se muestran los valores promedios y la desviación estándar de medidas realizadas por cuadruplicado para cada condición.

Capítulo 5

DISCUSIÓN

La degeneración de la retina es una causa común de ceguera. Frecuentemente esta se debe a la degeneración de los fotorreceptores, que ocasiona una pérdida de respuesta a la luz y, en consecuencia, una pérdida de visión. Las enfermedades degenerativas de la retina en humanos son actualmente incurables, ya que una vez iniciado el proceso de degeneración es irreversible. Los tratamientos experimentales encaminados a reemplazar las células de la retina perdidas o restaurar la visión no son todavía efectivos. Para ello, sería necesario rescatar a los fotorreceptores de la muerte o introducir componentes fotosensibles alternativos en el ojo. En este sentido se están haciendo grandes esfuerzos para desarrollar terapias celulares que intentan sustituir los fotorreceptores en los pacientes.

En la actualidad, los posibles enfoques terapéuticos dirigidos a la búsqueda de una cura para enfermedades degenerativas de la retina se centran en tres grandes líneas de acción. En primer lugar se encuentra el uso de estrategias de prevención que tratan de contrarrestar los mecanismos subyacentes de la enfermedad, ya sea mediante la manipulación celular a través de la utilización de compuestos farmacológicos o mediante modificación genética por silenciamiento y/o sustitución de genes. El segundo enfoque no se refiere tanto a la causa de la enfermedad sino a la prevención de la muerte celular, con la administración de compuestos antioxidantes, antiapoptóticos, antiinflamatorios y factores neurotróficos. El tercer enfoque se centra en la regeneración de la retina, a través de la sustitución de los fotorreceptores dañados por células madre o tipos celulares diferenciados (Cuenca et al., 2014). En este sentido, la reparación de la retina por reemplazo de células se intenta bien mediante el trasplante de células madre/progenitoras (Cuenca et al., 2014) bien me-

DISCUSIÓN

diante el reclutamiento de poblaciones de progenitores endógenos que residen en tejidos de mamífero adulto. La identificación y caracterización de estas células progenitoras endógenas de la retina es un área de investigación activa, no sólo en roedores, sino también en primates, incluidos los seres humanos (Singh and MacLaren, 2011; Wohl et al., 2012). El éxito de la sustitución de los fotorreceptores depende de la supervivencia de las células trasplantadas en la retina, por lo que resulta importante la prevención del rechazo de tejidos. Otra cuestión importante es la facilidad de su obtención y el coste del proceso.

La necesidad clínica de terapias para la regeneración de la retina ha activado la búsqueda de células renovables para reemplazar los fotorreceptores perdidos en pacientes con procesos de degeneración retiniana (Singh and MacLaren, 2011). Como se ha descrito, los peces y anfibios regeneran neuronas retinianas durante toda la vida. La neurogénesis de la retina en mamíferos, en cambio, termina en el periodo postnatal temprano. No obstante, aunque la proliferación de células progenitoras y la diferenciación neuronal ya no son evidentes, persiste un pequeño número de células madre y progenitoras en la retina de mamíferos adultos. Los estudios actuales muestran evidencias crecientes de que el potencial neurogénico podría estar conservado, lo que abre la posibilidad a una terapia basada en células regeneradoras para restaurar la función visual.

Tal y como hemos visto, existen progenitores neuronales identificados en las diferentes regiones del ojo de ratón adulto y estos pueden provenir de varias fuentes, como las células de Müller, el RPE o el cuerpo ciliar. Las células gliales de Müller se perfilan como una fuente de células madre endógenas para reemplazar los fotorreceptores perdidos. Su capacidad para desdiferenciarse y volverse a diferenciar después a células con fenotipo neuronal representa una estrategia terapéutica prometedora, ya que este tipo de células diferenciadas pueden obtenerse de muchas fuentes, tales como líneas celulares humanas inmortalizadas, así como por medio de cirugía de membranas epirretinianas de ojos de pacientes con patologías oculares (Reichenbach and Bringmann, 2013). Se ha descrito la proliferación y migración de estas células transdiferenciadas después de lesiones inducidas por láser o por toxicidad con glutamato, aunque la diferenciación a nuevas neuronas de la retina todavía no se ha conseguido con éxito (Reyes-Aguirre et al., 2013).

Aunque existe bastante trabajo publicado al respecto, todavía es necesario conocer mejor este proceso para dilucidar los mecanismos moleculares exactos

requeridos para obtener progenitores neuronales a partir de células de Müller. Además de estas células, varios estudios realizados en anfibios y pollos señalan al RPE como una posible fuente de células regeneradoras. Diversos autores han demostrado que el RPE está formado por una población celular no homogénea, con subpoblaciones que retienen potencial proliferativo, con una capacidad inusual de transdiferenciarse en diversos tipos de células para producir una nueva retina (Fuhrmann et al., 2014; Machalińska et al., 2013). Por otra parte, hay que tener en cuenta que las células madre mesenquimales también pueden suponer una buena fuente de células progenitoras para la terapia celular. Hoy en día la médula ósea sigue siendo la fuente principal de células madre mesenquimales para la mayoría de los estudios preclínicos y clínicos, si bien la grasa está ganando cada vez más importancia como fuente de células progenitoras, porque las células pueden ser fácilmente aisladas y se obtienen en gran cantidad. Se ha demostrado que células madre mesenquimales de médula ósea inyectadas en el espacio subretiniano de ratones y ratas knockout para el gen de la rodopsina son capaces de prevenir el deterioro funcional sin problemas de rechazo inmunológico (Arnhold et al., 2007,0; Lu et al., 2010).

Otra estrategia en cuanto a la realización de trasplantes, consiste en la utilización de líneas celulares con características de células progenitoras. En este sentido se han utilizado diferentes líneas celulares para el trasplante de retina, como la línea celular E1A, obtenida a partir de un cultivo de células de Müller de retina de ratones adultos pero utilizando ADN viral para su inmortalización (Seigel et al., 1998), la línea ARPE-19 procedente de RPE (Pinilla et al., 2007; Wang et al., 2008), células no retinianas (Pinilla et al., 2009) o células progenitoras neuronales (Gamm et al., 2007; Giannelli et al., 2011). Giannelli et al. (2011) consiguieron diferenciar células de Müller a bastones, con una eficiencia del 54 %, y demostraron que estos fotorreceptores derivados de células de Müller pudieron integrarse y sobrevivir en retinas de ratones inmunodeficientes (Giannelli et al., 2011).

A pesar de los esfuerzos investigadores en este campo, todavía no se conocen completamente los mecanismos y factores implicados en la proliferación de células madre presentes en la retina adulta. En este sentido, se ha sugerido que los receptores de tipo Toll, bien conocidos por su función como mediadores de la respuesta innata y la respuesta adquirida, podrían estar implicados en los mecanismos de inducción e inhibición de la proliferación y diferenciación celular. Un hecho que apoya esto es que estos receptores, además de expresarse en las células implicadas en la respuesta inmunitaria, también se expresan en

células madre y neuronales. Así, se ha demostrado que los TLRs se expresan en diversas células en el sistema nervioso central humano, incluyendo microglía, astrocitos, neuronas y células endoteliales vasculares (Hanamsagar et al., 2012). Los TLRs se expresan también en células madre y progenitoras hematopoyéticas, en las cuales modulan procesos de proliferación y diferenciación celular (Boiko and Borghesi, 2012; Yáñez et al., 2009). En la retina de mamíferos se ha detectado la expresión de diferentes TLRs en astrocitos (Jiang et al., 2009), células de Müller (Kumar and Shamsuddin, 2012), RPE (Ebihara et al., 2007; Kumar et al., 2004), fotorreceptores (Tu et al., 2011; Yi et al., 2012) y microglía (Maneu et al., 2014). Se ha demostrado además la expresión de TLRs en diversas células madre y progenitoras, gliales y retinianas, tanto de la retina como del cuerpo ciliar (Brito et al., 2004; Shechter et al., 2008; Tu et al., 2011). Shechter et al. (2008) demostraron que TLR4 es un regulador negativo de la proliferación de células progenitoras de la retina en el periodo postnatal temprano, inhibiendo la proliferación de células que expresan marcadores de progenitoras (Rolls et al., 2007; Shechter et al., 2008). Rolls et al. (2007) demostraron que TLR4 inhibe la proliferación de células progenitoras neurales en el hipocampo adulto, mientras que TLR2 aumenta la diferenciación de células progenitoras neuronales *in vitro* (Rolls et al., 2007). También se ha descrito el papel de TLR3 como un regulador negativo de las células progenitoras neurales cultivadas en el cerebro en desarrollo (Lathia et al., 2008).

En este trabajo nos planteamos estudiar la expresión y funcionalidad de TLR en células madre o progenitoras presentes en la retina de mamíferos adultos, con el fin de contribuir al esclarecimiento de los mecanismos implicados en la proliferación y diferenciación de estas células y estudiar su potencial neuroreparador ante un proceso patológico neurodegenerativo. Dada su implicación en procesos de proliferación celular seleccionamos el TLR2 como principal objeto de estudio. En primer lugar intentamos localizar en retinas adultas células con características de células madre o progenitoras según la expresión del transportador *Abcg2* y el antígeno *Sca-1*. En nuestro trabajo no pudimos encontrar en retinas de ratón adulto una población celular que expresara el marcador *Abcg2* y mostrara así el fenotipo de "Side Population". Este resultado fue en cierta medida esperado, puesto que otros autores habían comprobado una disminución drástica en el número de células con este fenotipo a partir del día postnatal 6 (Bhattacharya et al., 2003). Sí pudimos comprobar en cambio que en retina de ratón adulto se mantiene una población de células que expresan el antígeno de células madre *Sca-1*. Estas células no expresan la proteína CD45 ni otros marcadores de linaje hematopoyético. Se trata de una población de

tamaño muy pequeño, a veces difícil de distinguir del debrís celular. Por sus características parece coincidir con la población descrita por diversos grupos de investigación, que han puesto de manifiesto la existencia en tejidos de ratón de una pequeña población de células madre con potencial regenerador, que presentan las características de expresar el antígeno Sca-1, siendo CD45 negativas y negativas también para otros marcadores de linaje, además de mostrar un tamaño muy pequeño (2-6 μm) (Havens et al., 2013; Kassmer and Krause, 2013). A esta población, a la que se ha llamado VSEs del inglés "Very Small Embryonic-Like stem cells" se le ha atribuido capacidad pluripotencial (Anand et al., 2014; Bhartiya et al., 2014; Chen et al., 2014; Guerin et al., 2015; Kassmer and Krause, 2013). Aunque inicialmente se encontraron en médula ósea (pese a que no son hematopoyéticas), posteriormente se ha demostrado que estas células se encuentran presentes también en otros tejidos de ratón como cerebro, bazo (Kassmer and Krause, 2013; Kucia et al., 2006) o retina (Liu et al., 2009). Estas células expresan diversos marcadores de células pluripotentes (Oct-4, Nanog, Rex-1, Dppa3, y la proteína Rif1 (Havens et al., 2013; Kassmer and Krause, 2013; Zuba-Surma et al., 2008a). Recientemente se ha puesto de manifiesto cierta controversia sobre la capacidad pluripotencial de estas células y especialmente en tejidos humanos (Danova-Alt et al., 2012; Miyanishi et al., 2013; Parker, 2014; Ratajczak et al., 2014; Suszynska et al., 2013; Szade et al., 2014,1), estando cuestionada su posible aplicabilidad en regeneración de tejidos dañados. En cualquier caso, su presencia en diversos tejidos y su potencialidad en medicina regenerativa merecen un estudio más profundo para evaluar esta capacidad.

En nuestro trabajo demostramos que esta población de células Sca-1 positivas presentes en la retina de ratón adulto expresan TLR2. Como hemos descrito, pudimos aislar y cultivar estas células y estudiar la funcionalidad de los receptores. Tras su purificación comprobamos que este receptor es funcional, puesto que cuando incubamos con Pam₃CSK₄, observamos un aumento en la proliferación celular, acompañado de la sobreexpresión de TLR2. La activación de este receptor indujo además la expresión del marcador CD11b, en lo que parece ser un aumento en la diferenciación celular. Estos resultados coinciden con datos previos de otros autores y de nuestro propio laboratorio en los que se ha visto que TLR2 está implicado en procesos de proliferación y diferenciación celular, como ocurre en células neurales progenitoras y células madre hematopoyéticas (Megías et al., 2012; Rolls et al., 2007; Yáñez et al., 2010).

DISCUSIÓN

Al estimular estas células con un ligando específico de TLR4, también observamos un aumento en la proliferación y la diferenciación celular, si bien en menor grado. Este resultado no coincide con lo descrito en trabajos previos de otros autores, que han demostrado que, en otros tipos de células progenitoras, TLR4 se comporta como regulador negativo de la proliferación celular en el periodo postnatal (Shechter et al., 2008). El hecho de que en esta población celular TLR4 no suponga un "freno" en la diferenciación de estas células, sugiere que los distintos tipos de células madre y progenitoras podrían presentar distintos mecanismos de regulación por lo que pueden tener un papel muy distinto en fenómenos de regeneración. Así, ante un daño en la retina, distintas señales o moléculas intermediarias podrían reclutar unos tipos de células madre u otros para iniciar el proceso reparador, incluso en un mismo tejido. El hecho de encontrar este tipo de células progenitoras en retinas de mamíferos adultos nos invita a pensar que con los estímulos adecuados, también podríamos iniciar un proceso neurorregenerador en caso de daño o degeneración retiniana, de manera similar a lo que ocurre en anfibios y peces.

En cuanto a la capacidad regeneradora, si bien con nuestros datos no podemos concluir que estas células efectivamente tengan capacidad pluripotencial como defienden algunos autores, tampoco podemos apoyar la teoría de que sea una población artefactual, puesto que responden a estímulos que activan los TLRs, lo que sugiere que sí pueden tener una función *in vivo*, bajo determinadas circunstancias. Así pues, podemos concluir que en la retina de ratones adultos, existe al menos una población de células inmaduras que expresa TLR2 y TLR4 funcionales los cuales pueden estar implicados en procesos de proliferación y diferenciación celular. Los mecanismos que frenan esta capacidad proliferativa en una situación patológica traumática o degenerativa deberán ser aclarados en estudios posteriores.

Un segundo objetivo de nuestro trabajo consistió en obtener una línea de células progenitoras de la retina adulta de mamíferos y estudiar en ella la expresión y funcionalidad de los TLR, para conocer mejor su posible implicación en los procesos de proliferación y diferenciación celular. Elegimos el protocolo de obtención a partir de un cultivo de células de Müller, puesto que es bien conocida la capacidad de las células de estos cultivos de inmortalizar espontáneamente (Florian et al., 2008; Hicks and Courtois, 1990). Además, como se ha demostrado previamente, las células gliales pueden actuar como precursores neurales en procesos regenerativos (Raymond et al., 2006). Hasta la fecha se han descrito varias líneas celulares derivadas de cultivos de células de Müller,

a partir de rata, ratón y también humanas, algunas de ellas de retinas adultas, buscando su utilidad potencial en procesos de regeneración de la retina (Florian et al., 2008; Giannelli et al., 2011; Limb et al., 2002; Otteson and Phillips, 2010; Sarthy et al., 1998; Tomi et al., 2003). Las líneas celulares son particularmente valiosas además para estudiar procesos básicos celulares y moleculares, especialmente cuando sólo se puede aislar un bajo número de células o hay una marcada dificultad en la obtención de poblaciones puras de células. Además de la inmortalización espontánea, en algunos casos se recurre a la obtención de líneas celulares inmortalizadas mediante la sobreexpresión constitutiva de oncogenes exógenos en células primarias. Este método presenta el inconveniente de que la inmortalización permanente altera las características innatas de las células primarias y aumenta el riesgo de generación de tumores cuando se utilizan en el trasplante *in vivo*. En este sentido, la inmortalización espontánea podría representar una ventaja, por no sobreexpresar estos oncogenes de forma artificial.

Siguiendo el método descrito en la bibliografía, obtuvimos una nueva línea celular, MU-PH1, derivada de células de Müller murinas con características de células progenitoras. Como pudimos comprobar, estas células, en condiciones adecuadas, poseen la capacidad de perder la diferenciación y formar neuroesferas, como es característico de este tipo de células progenitoras (Florian et al., 2008; Hicks and Courtois, 1990; Limb et al., 2002; Shechter et al., 2008). Como demostramos, se trata de una línea celular pura que expresa marcadores de células progenitoras, a la vez que expresa marcadores de células gliales y fotorreceptores, mientras que no expresa marcadores característicos de otras células (tales como células bipolares, amacrinas, astrocitos, microglía o endotelio). Entre los marcadores de células madre, demostramos la expresión de la proteína nestina, que es característica de células progenitoras neuronales. Según se ha descrito, sólo la subpoblación de células de Müller que expresa este filamento intermedio es capaz de proliferar *in vitro* de forma indefinida, mientras que las poblaciones que no lo expresan no presentan esta capacidad (Bhatia et al., 2009; Lawrence et al., 2007). De hecho, en nuestro laboratorio obtuvimos mediante el mismo procedimiento otras líneas celulares que no expresaban nestina y que murieron tras varios pases en cultivo. También es de destacar la expresión en las células MU-PH1 del transportador *Abcg2*, presente en células madre neuronales, a las que confiere el fenotipo de "Side Population", con capacidad multipotencial (Bhattacharya et al., 2007; Mato et al., 2009). Por otra parte, la expresión de marcadores característicos de fotorreceptores, como diversas opsinas, concuerda con las características descritas para otras

DISCUSIÓN

líneas celulares, como la línea MIO-M1, obtenida por [Hollborn et al. \(2011\)](#) a partir de células humanas .

La línea MU-PH1, además de expresar marcadores de fotorreceptores es sensible a la luz, demostrando así la funcionalidad de estas proteínas. Estos resultados de sensibilidad a la luz concuerdan con los de otros investigadores, descritos en líneas celulares como MIO-M1 ([Hollborn et al., 2011](#)) y RGC-5 ([Nieto et al., 2011](#)). Se trata de una población homogénea, con patrones de expresión homogéneos en todos los casos analizados. Esta homogeneidad supone una ventaja frente a otras líneas celulares como la R28 ([Seigel, 1996](#)), que presenta gran heterogeneidad que no la hace apta para algunas determinaciones. Frente a otras líneas celulares como la 661W, obtenida a partir de conos ([Tan et al., 2004](#)), la línea MU-PH1 ofrece la ventaja de haber inmortalizado de forma espontánea y presentar *a priori* un menor riesgo de formación de tumores. Así pues, es una línea celular con características únicas, obtenida a partir de retinas adultas que puede ser útil para investigar la función de los fotorreceptores tanto *in vitro* como *in vivo* y para realizar estudios de trasplante de retina.

En los trabajos de caracterización celular comprobamos que las células MU-PH1 expresan además otros marcadores no relacionados con la visión y que pueden resultar de gran interés, como receptores de melatonina 1 y 2. [Niles et al. \(2004\)](#) demostraron que las células madre neuronales expresan receptores funcionales de melatonina, de tipo MT1, y que estos colocalizan con marcadores neuronales y gliales. La función de estos receptores en células progenitoras y la posible implicación de la melatonina en el desarrollo neuronal no se ha aclarado todavía, aunque sí se ha sugerido que esta tiene alguna función en el desarrollo del sistema nervioso central y podría tener implicaciones relevantes a la hora de optimizar estrategias terapéuticas en enfermedades neurodegenerativas ([Niles et al., 2004](#)).

Comprobamos también que MU-PH1 expresa canales de sodio dependientes de voltaje, que están implicados en la modulación del potencial de acción de iniciación y propagación de los fotorreceptores, ya que son responsables de la despolarización inicial de la membrana. En nuestras condiciones experimentales no pudimos comprobar una funcionalidad para estos canales en nuestras condiciones de estudio, pero no podemos descartar su funcionalidad bien *in vivo* o *in vitro* con otras condiciones de cultivo (por ejemplo mediante cocultivo con otros tipos celulares de soporte).

Como hemos demostrado, la línea MU-PH1 expresa TLR1, 2, 4 y 6 a nivel de ARNm y al menos TLR2 en la membrana celular, lo que la convierte en un buen modelo para estudiar su funcionalidad. Atendiendo a la función de los TLRs en la respuesta inmune, como pudimos comprobar, ante un agente patógeno microbiano como *C. albicans*, las células incrementaron la expresión de TLR2 y TLR6, de los que es bien sabido que están implicados en el reconocimiento de PAMPs. Dado que está descrito que TLR2 tiene una función relevante en la respuesta inmune mediante la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α (Murciano et al., 2007), analizamos la producción de esta citocina por las células MU-PH1. Si bien tras incubar con diferentes estímulos (tanto *C. albicans* como ligandos puros) y a distintos tiempos no se indujo la secreción de TNF- α en estas células, no podemos descartar completamente que *in vivo* TLR2 tenga una función relacionada con la respuesta inmunitaria en ellas, pues al estar en cultivo se pierde parte de la ruta de transducción de las señales inducidas por la activación de los receptores.

Por otra parte, la presencia de *C. albicans*, al igual que el ligando puro de TLR2 Pam₃CSK₄ sí indujo un incremento en la proliferación celular, tanto en la formación de neuroesferas, como en las células en cultivo en condiciones estándar, lo que sugiere que, además del papel en el reconocimiento de patógenos, también aquí los TLR2 parecen tener un efecto sobre la capacidad proliferativa de las células. Este resultado no se observó al estimular con LPS. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Rolls et al. (2007), que demostraron que la deficiencia de TLR2 disminuye la neurogénesis en el hipocampo mientras que su activación estimula la diferenciación de células progenitoras neurales *in vitro* y con los trabajos previos de nuestro grupo sobre la implicación de TLR2 en la proliferación de células madre hematopoyéticas (Megías et al., 2012; Yáñez et al., 2010). Al contrario del comportamiento que hemos descrito para la población de células Sca-1 positivas, estos resultados sí que concuerdan con las observaciones de otros autores que describieron que TLR4 restringe la capacidad proliferativa de las células progenitoras (Shechter et al., 2008), reforzando la idea que hemos expuesto de que distintos tipos de células progenitoras presentes en la retina pueden tener distintos mecanismos de regulación de la proliferación y diferenciación celulares. Así pues, nuestros resultados apoyan la idea de que las células madre de la retina mantienen la capacidad proliferativa aún en la edad adulta, y que esta proliferación, así como procesos de diferenciación, pueden producirse por mediación de los receptores TLR2 y/o TLR4.

DISCUSIÓN

Para estudiar la posible utilidad de la línea celular para el rastreo de sustancias neuroprotectoras, sometimos a las células a diferentes estímulos nocivos como nitroprusiato sódico, oligomicina y rotenona y evaluamos el efecto protector de reconocidos antioxidantes y neuroprotectores como TUDCA, Vitamina E, N-acetilcisteína, ácido valproico y melatonina. Dado que los compuestos N-acetilcisteína, vitamina E y TUDCA pudieron revertir parte del efecto lesivo producido por los agentes tóxicos, consideramos que la línea celular MU-PH1 puede ser utilizada como modelo de estudio para el cribado de sustancias con propiedades antioxidantes y neuroprotectoras y ser de utilidad en el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de patologías de la retina.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Capítulo 6

CONCLUSIONES

1. En la retina de ratón adulto existe una población de células que expresan marcadores de células inmaduras $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{CD45}^-$. Estas células pueden ser aisladas y mantenidas en cultivo.
2. La población de células inmaduras $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{CD45}^-$ presente en la retina de ratón adulto expresa TLR2 y TLR4 funcionales.
3. La señalización a través de TLR2 y TLR4 en la población de células inmaduras $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{CD45}^-$ presente en la retina de ratón adulto induce la proliferación y diferenciación celular *in vitro*.
4. Se ha obtenido una nueva línea celular, inmortalizada de forma espontánea a partir de células de Müller murinas con características de progenitoras, llamada MU-PH1.
5. La línea celular MU-PH1 expresa de forma estable marcadores de fotorreceptores, así como marcadores de glia y de células madre, además responde a estímulos luminosos. Es la primera línea celular con estas características, lo que confiere a MU-PH1 un gran interés como modelo de desarrollo de los fotorreceptores y de la regeneración de la retina.
6. La línea celular MU-PH1 puede ser utilizada como modelo de cribado de diferentes ligandos y compuestos neuroprotectores en la búsqueda de dianas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades degenerativas de la retina.
7. La línea celular MU-PH1 expresa TLR2 funcionales. La señalización a través de TLR2 en las células de esta línea confirma la participación de los TLRs en la inducción de mecanismos de proliferación celular.

Capítulo 7

ABREVIATURAS

- **ABCG2** Transportador transmembrana ATP-Binding Cassette G2
- **ADP** Adenosín Difosfato
- **APC** Aloficocianina
- **ATP** Adenosín Trifosfato
- **EGF** «Epidermal Growth Factor»; Factor de crecimiento epidérmico
- **ELISA** «Enzyme-Linked InmunoSorbent Assay»
- **ESCs** «Embryonic Stem Cells»; Células madre embrionarias
- **FGF** «Fibroblast Growth Factor»; Factor de crecimiento de fibroblastos
- **FITC** Isotiocianato de fluoresceína
- **GABA** Ácido γ -aminobutírico
- **GCL** «Ganglionar Cells Layer»; Capa de células ganglionales
- **HSCs** «Hematopoyetic Stem Cells»; Células madre hematopoyéticas
- **KO** «Knockout»
- **Lin** «Lineage»; Linaje
- **LPS** Lipopolisacárido
- **MO** Médula ósea

- **MSCs** «Mesenchymal Stem Cells»; Células madre mesenquimales
- **NPCs** «Neural Progenitors Cells»; Células progenitoras neuronales
- **NSCs** «Neural Stem Cell»; Células madre neurales
- **PBS** «Phosphate Buffered Saline»; Solución salina tamponada con fosfato
- **PCs** «Progenitors Cells»; Células progenitoras
- **PDE** Fosfodiesterasa
- **PE** Ficoeritrina
- **RPCs** «Retinal Progenitors Cells»; Células progenitoras de la retina
- **RSCs** «Retinal Stem Cells»; Células madre de la retina
- **Sca-1** «Stem Cell Antigen-1»
- **SNC** Sistema Nervioso Central
- **SP** «Side Population»
- **TLRs** «Toll-Like Receptors»; Receptores tipo Toll
- **TNF- α** «Tumor Necrosis Factor- α »; Factor de necrosis tumoral- α
- **TUDCA** Ácido Tauroursodeoxicólico
- **VSEs** «Very Small Embryonic/epiblastic-Like cell»

Bibliografía

- Abbott, B. L. (2003). *Abcg2 (bcpr) expression in normal and malignant hematopoietic cells. Hematological oncology*, 21(3):115–130.
- Ahmad, I., Das, A. V., James, J., Bhattacharya, S., and Zhao, X. (2004). Neural stem cells in the mammalian eye: types and regulation. In *Seminars in cell & developmental biology*, volume 15, pages 53–62. Elsevier.
- Ahmad, I., Tang, L., and Pham, H. (2000). Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochemical and biophysical research communications*, 270(2):517–521.
- Al-Ubaidi, M. R., Hollyfield, J. G., Overbeek, P. A., and Baehr, W. (1992). Photoreceptor degeneration induced by the expression of simian virus 40 large tumor antigen in the retina of transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(4):1194–1198.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., et al. (1994). *Molecular biology of the cell*. 1994, new york and london.
- Alliot, F., Rutin, J., Leenen, P., and Pessac, B. (1999). Pericytes and periendothelial cells of brain parenchyma vessels co-express aminopeptidase n, aminopeptidase a, and nestin. *Journal of neuroscience research*, 58(3):367–378.
- Alm, P. L. K. . A. (2004). *Fisiología del ojo. Aplicación clínica*. 10ª edición edición.
- Alonso, G. (2001). Proliferation of progenitor cells in the adult rat brain correlates with the presence of vimentin-expressing astrocytes. *Glia*, 34(4):253–266.
- Alvarez-Buylla, A. and García-Verdugo, J. M. (2002). Neurogenesis in adult subventricular zone. *The Journal of neuroscience*, 22(3):629–634.
- Alvarez-Buylla, A. and Temple, S. (1998). Stem cells in the developing and adult nervous system. *Journal of neurobiology*, 36(2):105–110.
- Amato, M. A., Arnault, E., Perron, M., et al. (2004). Retinal stem cells in vertebrates: parallels and divergences. *Int J Dev Biol*, 48(8-9):993–1001.
- Anand, S., Bhartiya, D., Sriraman, K., Patel, H., and Manjramkar, D. (2014).

Very Small Embryonic-Like Stem Cells Survive and Restore Spermatogenesis after Busulphan Treatment in Mouse Testis. J Stem Cell Res Ther 4: 216. doi: 10.4172/2157-7633.1000216 Page 2 of 16 Volume 4 Issue 7* 1000216 J Stem Cell Res Ther ISSN: 2157-7633 JSCRT, an open access journal of pluripotent VSELs in adult mice testis by flow cytometry. Several groups have reported the presence of a 'side population' with stem cell characteristics (having a small size and a low scatter) in testicular tissue of cockerels and mice [18-20]. PhD thesis, These side population (SP) cells have the ability to repopulate germ cell depleted testis when transplanted in adult mice. Kubota et al.[21] reported that SSCs and SP in testis are two distinct populations.*

- Anderson, K. V., Bokla, L., and Nüsslein-Volhard, C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the drosophila embryo: The induction of polarity by the toll gene product. *Cell*, 42(3):791–798.
- Anjos-Afonso, F. and Bonnet, D. (2007). Nonhematopoietic/endothelial ssea-1+ cells define the most primitive progenitors in the adult murine bone marrow mesenchymal compartment. *Blood*, 109(3):1298–1306.
- Araki, M. (2007). Regeneration of the amphibian retina: role of tissue interaction and related signaling molecules on rpe transdifferentiation. *Development, growth & differentiation*, 49(2):109–120.
- Arnhold, S., Absenger, Y., Klein, H., Addicks, K., and Schraermeyer, U. (2007). Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells rescue photoreceptor cells in the dystrophic retina of the rhodopsin knockout mouse. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 245(3):414–422.
- Arnhold, S., Heiduschka, P., Klein, H., et al. (2006). Adenovirally transduced bone marrow stromal cells differentiate into pigment epithelial cells and induce rescue effects in rcs rats. *Investigative ophthalmology & visual science*, 47(9):4121–4129.
- Arshavsky, V. Y., Lamb, T. D., and Pugh Jr, E. N. (2002). G proteins and phototransduction. *Annual review of Physiology*, 64(1):153–187.
- Asami, M., Sun, G., Yamaguchi, M., and Kosaka, M. (2007). Multipotent cells from mammalian iris pigment epithelium. *Developmental biology*, 304(1):433–446.
- Atari, M., Barajas, M., Hernández-Alfaro, F., et al. (2011). Isolation of pluripotent stem cells from human third molar dental pulp. *Histology and histopathology*, 26(7):1057.
- Balu, D. T. and Lucki, I. (2009). Adult hippocampal neurogenesis: regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. *Neuro-*

- cience & Biobehavioral Reviews*, 33(3):232–252.
- Barton, G. M. and Medzhitov, R. (2002). Control of adaptive immune responses by toll-like receptors. *Current opinion in immunology*, 14(3):380–383.
- Batts, T. D., Machado, H. L., Zhang, Y., et al. (2011). Stem cell antigen-1 (sca-1) regulates mammary tumor development and cell migration. *PLoS One*, 6(11):e27841.
- Baylor, D. A. (1987). Photoreceptor signals and vision. proctor lecture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 28(1):34–49.
- Belecky-Adams, T., Tomarev, S., Li, H.-S., et al. (1997). Pax-6, prox 1, and chx10 homeobox gene expression correlates with phenotypic fate of retinal precursor cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 38(7):1293–1303.
- Bernardos, R. L., Barthel, L. K., Meyers, J. R., and Raymond, P. A. (2007). Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial müller glia that function as retinal stem cells. *The Journal of neuroscience*, 27(26):7028–7040.
- Bhartiya, D., Mundekar, A., Mahale, V., and Patel, H. (2014). Very small embryonic-like stem cells are involved in regeneration of mouse pancreas post-pancreatectomy. *Stem cell research & therapy*, 5(5):106.
- Bhatia, B., Singhal, S., Lawrence, J. M., Khaw, P. T., and Limb, G. A. (2009). Distribution of müller stem cells within the neural retina: evidence for the existence of a ciliary margin-like zone in the adult human eye. *Experimental eye research*, 89(3):373–382.
- Bhattacharya, S., Das, A., Mallya, K., and Ahmad, I. (2007). Maintenance of retinal stem cells by *abcg2* is regulated by notch signaling. *Journal of cell science*, 120(15):2652–2662.
- Bhattacharya, S., Jackson, J. D., Das, A. V., et al. (2003). Direct identification and enrichment of retinal stem cells/progenitors by hoechst dye efflux assay. *Investigative ophthalmology & visual science*, 44(6):2764–2773.
- Boiko, J. R. and Borghesi, L. (2012). Hematopoiesis sculpted by pathogens: Toll-like receptors and inflammatory mediators directly activate stem cells. *Cytokine*, 57(1):1–8.
- Bringmann, A., Iandiev, I., Pannicke, T., et al. (2009). Cellular signaling and factors involved in müller cell gliosis: neuroprotective and detrimental effects. *Progress in retinal and eye research*, 28(6):423–451.
- Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., et al. (2006). Müller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in retinal and eye research*, 25(4):397–424.
- Brito, B. E., Zamora, D. O., Bonnah, R. A., et al. (2004). Toll-like receptor

- 4 and cd14 expression in human ciliary body and tlr-4 in human iris endothelial cells. *Experimental eye research*, 79(2):203–208.
- Bunnell, B. A., Betancourt, A. M., and Sullivan, D. E. (2010). New concepts on the immune modulation mediated by mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*, 1(5):34.
- Bunting, K. D. (2002). Abc transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem cells*, 20(1):11–20.
- Burns, M. E. and Arshavsky, V. Y. (2005). Beyond counting photons: trials and trends in vertebrate visual transduction. *Neuron*, 48(3):387–401.
- Cameron, J. S., Alexopoulou, L., Sloane, J. A., et al. (2007). Toll-like receptor 3 is a potent negative regulator of axonal growth in mammals. *The Journal of Neuroscience*, 27(47):13033–13041.
- Chabre, M. and Deterre, P. (1989). Molecular mechanism of visual transduction. *European Journal of Biochemistry*, 179(2):255–266.
- Chang, J., McCluskey, P., and Wakefield, D. (2006). Toll-like receptors in ocular immunity and the immunopathogenesis of inflammatory eye disease. *British Journal of Ophthalmology*, 90(1):103–108.
- Chen, L., Yang, P., and Kijlstra, A. (2002). Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocular immunology and inflammation*, 10(1):27–39.
- Chen, Z.-H., Lv, X., Dai, H., et al. (2014). Hepatic regenerative potential of mouse bone marrow very small embryonic-like stem cells. *Journal of cellular physiology*.
- Cicero, S. A., Johnson, D., Reyntjens, S., et al. (2009). Cells previously identified as retinal stem cells are pigmented ciliary epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(16):6685–6690.
- Coles, B. L., Angénieux, B., Inoue, T., et al. (2004). Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(44):15772–15777.
- Conti, L. and Cattaneo, E. (2010). Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities? *Nature Reviews Neuroscience*, 11(3):176–187.
- Coorey, N. J., Shen, W., Chung, S. H., Zhu, L., and Gillies, M. C. (2012). The role of glia in retinal vascular disease. *Clinical and Experimental Optometry*, 95(3):266–281.
- Cuenca, N., Fernández-Sánchez, L., Campello, L., et al. (2014). Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases. *Progress in retinal and eye research*, 43:17–75.
- Curcio, C. A., Sloan, K. R., Packer, O., Hendrickson, A. E., et al. (1987).

- Distribution of cones in human and monkey retina: individual variability and radial asymmetry. *Science*.
- Dacey, D. M., Peterson, B. B., Robinson, F. R., and Gamlin, P. D. (2003). Fireworks in the primate retina: in vitro photodynamics reveals diverse lgn-projecting ganglion cell types. *Neuron*, 37(1):15–27.
- Danova-Alt, R., Heider, A., Egger, D., Cross, M., and Alt, R. (2012). Very small embryonic-like stem cells purified from umbilical cord blood lack stem cell characteristics. *PLoS One*, 7(4):e34899.
- Denham, M., Conley, B., Olsson, F., Cole, T. J., and Mollard, R. (2005). Stem cells: an overview. *Current Protocols in Cell Biology*, pages 23–1.
- Derrickson, G. J. T. . B. (2011). *Principios de Anatomía y Fisiología*. Editorial Panamericana, 11^ª edición edition.
- Dick, A. D., Carter, D., Robertson, M., et al. (2003). Control of myeloid activity during retinal inflammation. *Journal of leukocyte biology*, 74(2):161–166.
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., García-Verdugo, J. M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 97(6):703–716.
- Dore-Duffy, P., Katychew, A., Wang, X., and Van Buren, E. (2006). Cns microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 26(5):613–624.
- Doyle, L. A. and Ross, D. D. (2003). Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein bcrp (abcg2). *Oncogene*, 22(47):7340–7358.
- Duflocq, A., Le Bras, B., Bullier, E., Couraud, F., and Davenne, M. (2008). Nav1. 1 is predominantly expressed in nodes of ranvier and axon initial segments. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 39(2):180–192.
- Dyce, P. W., Liu, J., Tayade, C., et al. (2011). In vitro and in vivo germ line potential of stem cells derived from newborn mouse skin. *PloS one*, 6(5):e20339.
- Ebihara, N., Chen, L., Tokura, T., et al. (2007). Distinct functions between toll-like receptors 3 and 9 in retinal pigment epithelial cells. *Ophthalmic research*, 39(3):155–163.
- Eckfeldt, C. E., Mendenhall, E. M., and Verfaillie, C. M. (2005). The molecular repertoire of the 'almighty' stem cell. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(9):726–737.
- Edlund, T. and Jessell, T. M. (1999). Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system. *Cell*, 96(2):211–224.
- Ellis, P., Fagan, B. M., Magness, S. T., et al. (2005). Sox2, a persistent marker

- for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Developmental neuroscience*, 26(2-4):148–165.
- Engelhardt, M., Bogdahn, U., and Aigner, L. (2005). Adult retinal pigment epithelium cells express neural progenitor properties and the neuronal precursor protein doublecortin. *Brain research*, 1040(1):98–111.
- Engelhardt, M., Wachs, F.-P., Couillard-Despres, S., and Aigner, L. (2004). The neurogenic competence of progenitors from the postnatal rat retina in vitro. *Experimental eye research*, 78(5):1025–1036.
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., et al. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine*, 4(11):1313–1317.
- Ertel, E. A., Campbell, K. P., Harpold, M. M., et al. (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, 25(3):533–535.
- Firulli, A. B. and Olson, E. N. (1997). Modular regulation of muscle gene transcription: a mechanism for muscle cell diversity. *Trends in Genetics*, 13(9):364–369.
- Fischer, A. J. and Bongini, R. (2010). Turning müller glia into neural progenitors in the retina. *Molecular neurobiology*, 42(3):199–209.
- Fischer, A. J., Hendrickson, A., and Reh, T. A. (2001). Immunocytochemical characterization of cysts in the peripheral retina and pars plana of the adult primate. *Investigative ophthalmology & visual science*, 42(13):3256–3263.
- Fischer, A. J. and Reh, T. A. (2000). Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Developmental biology*, 220(2):197–210.
- Fischer, A. J. and Reh, T. A. (2001). Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nature neuroscience*, 4(3):247–252.
- Fischer, A. J. and Reh, T. A. (2002). Exogenous growth factors stimulate the regeneration of ganglion cells in the chicken retina. *Developmental biology*, 251(2):367–379.
- Fischer, A. J., Zelinka, C., and Scott, M. A. (2010). Heterogeneity of glia in the retina and optic nerve of birds and mammals. *PloS one*, 5(6):e10774.
- Fischer, M. and Ehlers, M. (2008). Toll-like receptors in autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1143(1):21–34.
- Florian, C., Langmann, T., Weber, B. H., and Morsczeck, C. (2008). Murine müller cells are progenitor cells for neuronal cells and fibrous tissue cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 374(2):187–191.
- Franze, K., Grosche, J., Skatchkov, S. N., et al. (2007). Müller cells are living optical fibers in the vertebrate retina. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences*, 104(20):8287–8292.
- Fuchs, E. and Segre, J. A. (2000). Stem cells: a new lease on life. *Cell*, 100(1):143–155.
- Fuhrmann, S., Zou, C., and Levine, E. M. (2014). Retinal pigment epithelium development, plasticity, and tissue homeostasis. *Experimental eye research*, 123:141–150.
- Galli-Resta, L. (2002). Putting neurons in the right places: local interactions in the genesis of retinal architecture. *Trends in neurosciences*, 25(12):638–643.
- Gamm, D. M., Wang, S., Lu, B., et al. (2007). Protection of visual functions by human neural progenitors in a rat model of retinal disease. *PLoS One*, 2(3):e338.
- Gerhart, J. (1999). 1998 warkany lecture: signaling pathways in development. *Teratology*, 60(4):226–239.
- Giannelli, S. G., Demontis, G. C., Pertile, G., Rama, P., and Broccoli, V. (2011). Adult human müller glia cells are a highly efficient source of rod photoreceptors. *Stem Cells*, 29(2):344–356.
- Gilbert, S. F. (2005). *Biología del desarrollo*. 7ª edición edition.
- Goldin, A. L., Barchi, R. L., Caldwell, J. H., et al. (2000). Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 28(2):365–368.
- Goldsmith, T. H. (1980). Hummingbirds see near ultraviolet light. *Science*, 207(4432):786–788.
- Goldstein, E. B. (2013). *Sensation and perception*. Cengage Learning.
- Goodell, M. A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A. S., and Mulligan, R. C. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 183(4):1797–1806.
- Gould, E. and Tanapat, P. (1999). Stress and hippocampal neurogenesis. *Biological psychiatry*, 46(11):1472–1479.
- Graeber, M. B. and Streit, W. J. (1990). Microglia: immune network in the CNS. *Brain Pathology*, 1(1):2–5.
- Guerin, C., Loyer, X., Vilar, J., et al. (2015). Bone-marrow-derived very small embryonic-like stem cells in patients with critical leg ischaemia: evidence of vasculogenic potential. *Thromb Haemost*.
- Guidry, C. (1996). Isolation and characterization of porcine müller cells. myofibroblastic dedifferentiation in culture. *Investigative ophthalmology & visual science*, 37(5):740–752.
- Halfon, M. S., Hashimoto, C., and Keshishian, H. (1995). The drosophila toll gene functions zygotically and is necessary for proper motoneuron and

- muscle development. *Developmental biology*, 169(1):151–167.
- Hanamsagar, R., Hanke, M. L., and Kielian, T. (2012). Toll-like receptor (tlr) and inflammasome actions in the central nervous system. *Trends in immunology*, 33(7):333–342.
- Hanisch, U.-K. and Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature neuroscience*, 10(11):1387–1394.
- Hargrave, P. A. (2001). Rhodopsin structure, function, and topography the Friedenwald lecture. *Investigative ophthalmology & visual science*, 42(1):3–9.
- Haruta, M., Kosaka, M., Kanegae, Y., et al. (2001). Induction of photoreceptor-specific phenotypes in adult mammalian iris tissue. *Nature neuroscience*, 4(12):1163–1164.
- Hashimoto, C., Hudson, K. L., and Anderson, K. V. (1988). The toll gene of drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, 52(2):269–279.
- Hauck, S. M., Suppmann, S., and Ueffing, M. (2003). Proteomic profiling of primary retinal müller glia cells reveals a shift in expression patterns upon adaptation to in vitro conditions. *Glia*, 44(3):251–263.
- Havens, A. M., Sun, H., Shiozawa, Y., et al. (2013). Human and murine very small embryonic-like cells represent multipotent tissue progenitors, in vitro and in vivo. *Stem cells and development*, 23(7):689–701.
- Hayes, S., Nelson, B. R., Buckingham, B., and Reh, T. A. (2007). Notch signaling regulates regeneration in the avian retina. *Developmental biology*, 312(1):300–311.
- Hicks, D. and Courtois, Y. (1990). The growth and behaviour of rat retinal müller cells in vitro 1. an improved method for isolation and culture. *Experimental eye research*, 51(2):119–129.
- Hitchcock, P. F., Macdonald, R. E., VanDeRyt, J. T., and Wilson, S. W. (1996). Antibodies against pax6 immunostain amacrine and ganglion cells and neuronal progenitors, but not rod precursors, in the normal and regenerating retina of the goldfish.
- Hitchcock, P. F. and Raymond, P. A. (2004). The teleost retina as a model for developmental and regeneration biology. *Zebrafish*, 1(3):257–271.
- Hodgkin, A., McNaughton, P., and Nunn, B. (1987). Measurement of sodium-calcium exchange in salamander rods. *The Journal of physiology*, 391(1):347–370.
- Hollborn, M., Ulbricht, E., Rillich, K., et al. (2011). The human müller cell line mio-m1 expresses opsins. *Molecular vision*, 17:2738.
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., et al. (1999). Cutting edge: Toll-like

- receptor 4 (tlr4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for tlr4 as the lps gene product. *The Journal of Immunology*, 162(7):3749–3752.
- Hosoya, K.-I., Tomi, M., Ohtsuki, S., et al. (2001). Conditionally immortalized retinal capillary endothelial cell lines (tr-ibrb) expressing differentiated endothelial cell functions derived from a transgenic rat. *Experimental eye research*, 72(2):163–172.
- Howell, J. C., LEE, W.-H., Morrison, P., et al. (2003). Pluripotent stem cells identified in multiple murine tissues. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 996(1):158–173.
- Hughes, A., Saszik, S., Bilotta, J., DeMarco, P. J., and Patterson, W. F. (1998). Cone contributions to the photopic spectral sensitivity of the zebrafish erg. *Visual neuroscience*, 15(6):1029–1037.
- Hulspas, R. and Quesenberry, P. J. (2000). Characterization of neurosphere cell phenotypes by flow cytometry. *Cytometry*, 40(3):245–250.
- Hume, D. A., Perry, V. H., and Gordon, S. (1983). Immunohistochemical localization of a macrophage-specific antigen in developing mouse retina: phagocytosis of dying neurons and differentiation of microglial cells to form a regular array in the plexiform layers. *The Journal of cell biology*, 97(1):253–257.
- Ishiwata, T., Teduka, K., Yamamoto, T., et al. (2011). Neuroepithelial stem cell marker nestin regulates the migration, invasion and growth of human gliomas. *Oncology reports*, 26(1):91–99.
- Jian, Q., Xu, H., Xie, H., et al. (2009). Activation of retinal stem cells in the proliferating marginal region of rcs rats during development of retinitis pigmentosa. *Neuroscience letters*, 465(1):41–44.
- Jiang, G., Ke, Y., Sun, D., et al. (2009). Regulatory role of tlr ligands on the activation of autoreactive t cells by retinal astrocytes. *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(10):4769–4776.
- Johnson, G. B., Brunn, G. J., and Platt, J. L. (2003). Activation of mammalian toll-like receptors by endogenous agonists. *Critical Reviews in Immunology*, 23(1-2).
- Jopling, C., Boue, S., and Belmonte, J. C. I. (2011). Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(2):79–89.
- Karl, M. and Reh, T. (2010). Regenerative medicine for retinal diseases: activating endogenous repair mechanisms. *Trends in molecular medicine*, 16(4):193–202.
- Karl, M. O., Hayes, S., Nelson, B. R., et al. (2008). Stimulation of neural

- regeneration in the mouse retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(49):19508–19513.
- Kassen, S. C., Thummel, R., Campochiaro, L. A., et al. (2009). Cntf induces photoreceptor neuroprotection and müller glial cell proliferation through two different signaling pathways in the adult zebrafish retina. *Experimental eye research*, 88(6):1051–1064.
- Kassmer, S. H. and Krause, D. S. (2013). Very small embryonic-like cells: Biology and function of these potential endogenous pluripotent stem cells in adult tissues. *Molecular reproduction and development*, 80(8):677–690.
- Kawai, T. and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity update on toll-like receptors. *Nature immunology*, 11(5):373–384.
- Kawamoto, H., Ohmura, K., and Katsura, Y. (1997). Direct evidence for the commitment of hematopoietic stem cells to t, b and myeloid lineages in murine fetal liver. *International immunology*, 9(7):1011–1019.
- Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., and Kronenberg, G. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends in neurosciences*, 27(8):447–452.
- Kernie, S. G., Erwin, T. M., and Parada, L. F. (2001). Brain remodeling due to neuronal and astrocytic proliferation after controlled cortical injury in mice. *Journal of neuroscience research*, 66(3):317–326.
- Kimelberg, H. K. (2010). Functions of mature mammalian astrocytes: a current view. *The Neuroscientist*, 16(1):79–106.
- Klaassen, I., Van Noorden, C. J., and Schlingemann, R. O. (2013). Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions. *Progress in retinal and eye research*, 34:19–48.
- Kohno, H., Sakai, T., and Kitahara, K. (2006). Induction of nestin, ki-67, and cyclin d1 expression in müller cells after laser injury in adult rat retina. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 244(1):90–95.
- Kolb, H. (2003). How the retina works. *American scientist*, 91(1):28–35.
- Kolb, H. and Dekorver, L. (1991). Midget ganglion cells of the parafovea of the human retina: a study by electron microscopy and serial section reconstructions. *Journal of Comparative Neurology*, 303(4):617–636.
- Kolb, H., Nelson, R., Ahnelt, P., and Cuenca, N. (2001). Cellular organization of the vertebrate retina. *Progress in Brain Research*, 131:3–26.
- Kondo, T., Hosoya, K.-i., Hori, S., et al. (2003). Establishment of conditionally immortalized rat retinal pericyte cell lines (tr-rpct) and their application in

- a co-culture system using retinal capillary endothelial cell line (tr-ibrb2). *Cell structure and function*, 28(3):145–153.
- Kong, Y. and Le, Y. (2011). Toll-like receptors in inflammation of the central nervous system. *International immunopharmacology*, 11(10):1407–1414.
- Kono, M., Goletz, P. W., and Crouch, R. K. (2008). 11-cis- and all-trans-retinols can activate rod opsin: Rational design of the visual cycle. *Biochemistry*, 47(28):7567–7571.
- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in neurosciences*, 19(8):312–318.
- Krishnamoorthy, R., Agarwal, P., Prasanna, G., et al. (2001). Characterization of a transformed rat retinal ganglion cell line. *Molecular Brain Research*, 86(1):1–12.
- Krishnamurthy, P. and Schuetz, J. (2006). Role of *abcg2/bcrp* in biology and medicine. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 46:381–410.
- Krupkova Jr, O., Loja, T., Redova, M., et al. (2011). Analysis of nuclear nestin localization in cell lines derived from neurogenic tumors. *Tumor Biology*, 32(4):631–639.
- Kubota, R., Hokoc, J., Moshiri, A., McGuire, C., and Reh, T. (2002). A comparative study of neurogenesis in the retinal ciliary marginal zone of homeothermic vertebrates. *Developmental brain research*, 134(1):31–41.
- Kucia, M., Reza, R., Campbell, F., et al. (2006). A population of very small embryonic-like (vsel) *cxcr4*⁺; *ssea-1*⁺; *oct-4*⁺ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia*, 20(5):857–869.
- Kucia, M., Wysoczynski, M., Ratajczak, J., and Ratajczak, M. (2008). Identification of very small embryonic like (vsel) stem cells in bone marrow. *Cell and tissue research*, 331(1):125–134.
- Kumagai, Y., Takeuchi, O., and Akira, S. (2008). Pathogen recognition by innate receptors. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 14(2):86–92.
- Kumar, A. and Shamsuddin, N. (2012). Retinal muller glia initiate innate response to infectious stimuli via toll-like receptor signaling. *PloS one*, 7(1):e29830.
- Kumar, A., Singh, C. N., Glybina, I. V., Mahmoud, T. H., and Fu-Shin, X. Y. (2010). Toll-like receptor 2 ligand induced protection against bacterial endophthalmitis. *Journal of Infectious Diseases*, 201(2):255–263.
- Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2009). Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and biophysical research communications*, 388(4):621–625.
- Kumar, M. V., Nagineni, C. N., Chin, M. S., Hooks, J. J., and Detrick, B. (2004). Innate immunity in the retina: Toll-like receptor (tlr) signaling

- in human retinal pigment epithelial cells. *Journal of neuroimmunology*, 153(1):7–15.
- Kur, J., Newman, E. A., and Chan-Ling, T. (2012). Cellular and physiological mechanisms underlying blood flow regulation in the retina and choroid in health and disease. *Progress in retinal and eye research*, 31(5):377–406.
- Langmann, T. (2007). Microglia activation in retinal degeneration. *Journal of leukocyte biology*, 81(6):1345–1351.
- Lathia, J. D., Okun, E., Tang, S.-C., et al. (2008). Toll-like receptor 3 is a negative regulator of embryonic neural progenitor cell proliferation. *The Journal of Neuroscience*, 28(51):13978–13984.
- Lawrence, J. M., Singhal, S., Bhatia, B., et al. (2007). Mio-m1 cells and similar müller glial cell lines derived from adult human retina exhibit neural stem cell characteristics. *Stem cells*, 25(8):2033–2043.
- Lehnardt, S., Massillon, L., Follett, P., et al. (2003). Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14):8514–8519.
- Lemaitre, B. and Hoffmann, J. (2007). The host defense of drosophila melanogaster. *Annu. Rev. Immunol.*, 25:697–743.
- Li, L. and Xie, T. (2005). Stem cell niche: structure and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21:605–631.
- Limb, G. A., Salt, T. E., Munro, P. M., Moss, S. E., and Khaw, P. T. (2002). In vitro characterization of a spontaneously immortalized human müller cell line (mio-m1). *Investigative ophthalmology & visual science*, 43(3):864–869.
- Liu, I. S., Chen, J.-d., Ploder, L., et al. (1994). Developmental expression of a novel murine homeobox gene (*chx10*): Evidence for roles in determination of the neuroretina and inner nuclear layer. *Neuron*, 13(2):377–393.
- Liu, Y., Gao, L., Zuba-Surma, E. K., et al. (2009). Identification of small sca-1⁺, lin⁻, cd45⁻ multipotential cells in the neonatal murine retina. *Experimental hematology*, 37(9):1096–1107.
- Livesey, F. and Cepko, C. (2001). Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(2):109–118.
- Lledó Riquelme, M., Campos Mollo, E., Cuenca Navarro, N., et al. (2010). La transducción visual.
- Lobo, M. V., Arenas, M. I., Alonso, F. J. M., et al. (2004). Nestin, a neuroectodermal stem cell marker molecule, is expressed in leydig cells of

- the human testis and in some specific cell types from human testicular tumours. *Cell and tissue research*, 316(3):369–376.
- Lois, C. and Alvarez-Buylla, A. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(5):2074–2077.
- Lopez, J. M. A. and York, N. (2006). 10. la vía visual cien años después de ramón y cajal. *Santiago Ramón y Cajal: cien años después*, page 233.
- Lu, B., Wang, S., Girman, S., et al. (2010). Human adult bone marrow-derived somatic cells rescue vision in a rodent model of retinal degeneration. *Experimental eye research*, 91(3):449–455.
- Lu, Y.-B., Franze, K., Seifert, G., et al. (2006). Viscoelastic properties of individual glial cells and neurons in the CNS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(47):17759–17764.
- Luo, C., Yang, X., Kain, A. D., et al. (2010). Glaucomatous tissue stress and the regulation of immune response through glial toll-like receptor signaling. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(11):5697–5707.
- Ma, Y., Li, J., Chiu, I., et al. (2006). Toll-like receptor 8 functions as a negative regulator of neurite outgrowth and inducer of neuronal apoptosis. *The Journal of cell biology*, 175(2):209–215.
- Machalińska, A., Kawa, M. P., Pius-Sadowska, E., et al. (2013). Endogenous regeneration of damaged retinal pigment epithelium following low dose sodium iodate administration: an insight into the role of glial cells in retinal repair. *Experimental eye research*, 112:68–78.
- Macneil, M. A., Heussy, J. K., Dacheux, R. F., Raviola, E., and Masland, R. H. (1999). The shapes and numbers of amacrine cells: matching of photofilled with golgi-stained cells in the rabbit retina and comparison with other mammalian species. *The Journal of comparative neurology*, 413(2):305–326.
- Maneu, V., Noailles, A., Megías, J., et al. (2014). Retinal microglia are activated by systemic fungal infection. *Investigative ophthalmology & visual science*, pages IOVS–14.
- Marc, R. E. (2004). Retinal neurotransmitters. *The visual neurosciences*. Baskerville, Hong-Kong, printed EEUU.
- Marc, R. E. (2008). Functional neuroanatomy of the retina. *Albert and Jakobiec's Principles and Practice of Ophthalmology*. 3rd ed: Elsevier, pages 1565–1592.
- Marc, R. E. and Center, J. A. M. E. (2011). The synaptic organization of the retina. *Adler's Physiology of the Eye*, 11th ed. Saunders: Elsevier, pages 443–458.

BIBLIOGRAFÍA

- Marc, R. E. and Jones, B. W. (2002). Molecular phenotyping of retinal ganglion cells. *The Journal of neuroscience*, 22(2):413–427.
- Maroto, R., De la Fuente, M.-T., Artalejo, A. R., et al. (1994). Effects of ca 2+ channel antagonists on chromaffin cell death and cytosolic ca 2+ oscillations induced by veratridine. *European Journal of Pharmacology: Environmental Toxicology and Pharmacology*, 270(4):331–339.
- Marquardt, T., Ashery-Padan, R., Andrejewski, N., et al. (2001). Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell*, 105(1):43–55.
- Marquardt, T. and Gruss, P. (2002). Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *Trends in neurosciences*, 25(1):32–38.
- Martínez-Navarrete, G. C., Angulo, A., Martín-Nieto, J., and Cuenca, N. (2008). Gradual morphogenesis of retinal neurons in the peripheral retinal margin of adult monkeys and humans. *Journal of Comparative Neurology*, 511(4):557–580.
- Mato, E., Lucas, M., Petriz, J., Gomis, R., and Novials, A. (2009). Identification of a pancreatic stellate cell population with properties of progenitor cells: new role for stellate cells in the pancreas. *Biochem. J*, 421:181–191.
- Matsumura, S., Takagi, K., Okuda-Ashitaka, E., et al. (2010). Characterization of nestin expression in the spinal cord of gfp transgenic mice after peripheral nerve injury. *Neuroscience*, 170(3):942–953.
- Matsushima, D., Heavner, W., and Pevny, L. H. (2011). Combinatorial regulation of optic cup progenitor cell fate by sox2 and pax6. *Development*, 138(3):443–454.
- Mayer, E., Carter, D., Ren, Y., et al. (2005). Neural progenitor cells from post-mortem adult human retina. *British journal of ophthalmology*, 89(1):102–106.
- McGuckin, C., Forraz, N., Baradez, M.-O., et al. (2005). Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. *Cell proliferation*, 38(4):245–255.
- McGuckin, C., Jurga, M., Ali, H., Strbad, M., and Forraz, N. (2008). Culture of embryonic-like stem cells from human umbilical cord blood and onward differentiation to neural cells in vitro. *Nature protocols*, 3(6):1046–1055.
- Medzhitov, R. and Janeway, C. A. (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *cell*, 91(3):295–298.
- Medzhitov, R. and Janeway Jr, C. A. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current opinion in immunology*, 9(1):4–9.
- Megías, J., Maneu, V., Salvador, P., Gozalbo, D., and Gil, M. L. (2013). *Candida albicans* stimulates in vivo differentiation of haematopoietic stem

- and progenitor cells towards macrophages by a tlr2-dependent signalling. *Cellular microbiology*, 15(7):1143–1153.
- Megías, J., Yáñez, A., Moriano, S., et al. (2012). Direct toll-like receptor-mediated stimulation of hematopoietic stem and progenitor cells occurs in vivo and promotes differentiation toward macrophages. *Stem Cells*, 30(7):1486–1495.
- Meshulam, T., Levitz, S. M., Christin, L., and Diamond, R. D. (1995). A simplified new assay for assessment of fungal cell damage with the tetrazolium dye,(2, 3)-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2h)-tetrazolium-5-carboxanilide (xtt). *Journal of Infectious Diseases*, 172(4):1153–1156.
- Metaa, M. R. and Newman, E. A. (2006). Glial cells dilate and constrict blood vessels: a mechanism of neurovascular coupling. *The Journal of neuroscience*, 26(11):2862–2870.
- Metaa, M. R. and Newman, E. A. (2007). Signalling within the neurovascular unit in the mammalian retina. *Experimental physiology*, 92(4):635–640.
- Milla, J., Montesinos, M. S., Machado, J. D., et al. (2011). Ouabain enhances exocytosis through the regulation of calcium handling by the endoplasmic reticulum of chromaffin cells. *Cell calcium*, 50(4):332–342.
- Ming, G.-l. and Song, H. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.*, 28:223–250.
- Mitashov, V. (2001). Multipotent and stem cells in the developing, definitive, and regenerating vertebrate eye. *Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences*, 28(6):606–615.
- Miyanishi, M., Mori, Y., Seita, J., et al. (2013). Do pluripotent stem cells exist in adult mice as very small embryonic stem cells? *Stem cell reports*, 1(2):198–208.
- Mogensen, T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical microbiology reviews*, 22(2):240–273.
- Mokrý, J., Ehrmann, J., Karbanová, J., et al. (2008). Expression of intermediate filament nestin in blood vessels of neural and non-neural tissues. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 51(3):173–179.
- Morrison, S. J., Hemmati, H. D., Wandycz, A. M., and Weissman, I. L. (1995). The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(22):10302–10306.
- Morrison, S. J., Wright, D. E., and Weissman, I. L. (1997). Cyclophosphamide/granulocyte colony-stimulating factor induces hematopoietic stem cells to proliferate prior to mobilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(5):1908–1913.

BIBLIOGRAFÍA

- Moshiri, A., Close, J., and Reh, T. A. (2004). Retinal stem cells and regeneration. *Int J Dev Biol*, 48(8-9):1003–14.
- Mouthon, M.-A., Fouchet, P., Mathieu, C., et al. (2006). Neural stem cells from mouse forebrain are contained in a population distinct from the side population. *Journal of neurochemistry*, 99(3):807–817.
- Murciano, C., Yáñez, A., Gil, M. L., and Gozalbo, D. (2007). Both viable and killed candida albicans cells induce in vitro production of tnf- α and ifn- γ in murine cells through a tlr2-dependent signalling. *European cytokine network*, 18(1):38–43.
- Nag, T. C. and Wadhwa, S. (2012). Ultrastructure of the human retina in aging and various pathological states. *Micron*, 43(7):759–781.
- Nagai, Y., Garrett, K. P., Ohta, S., et al. (2006). Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity*, 24(6):801–812.
- Nakatani, K. and Yau, K. (1988). Calcium and magnesium fluxes across the plasma membrane of the toad rod outer segment. *The Journal of physiology*, 395(1):695–729.
- Newman, E. and Reichenbach, A. (1996). The müller cell: a functional element of the retina. *Trends in neurosciences*, 19(8):307–312.
- Newman, E. A. (2004). Glial modulation of synaptic transmission in the retina. *Glia*, 47(3):268–274.
- Nickerson, P. E., Emsley, J. G., Myers, T., and Clarke, D. B. (2007). Proliferation and expression of progenitor and mature retinal phenotypes in the adult mammalian ciliary body after retinal ganglion cell injury. *Investigative ophthalmology & visual science*, 48(11):5266–5275.
- Nicolau, S. M., de Diego, A. M., Cortés, L., et al. (2009). Mitochondrial na⁺/ca²⁺-exchanger blocker cgp37157 protects against chromaffin cell death elicited by veratridine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 330(3):844–854.
- Nicolau, S. M., Egea, J., López, M. G., and García, A. G. (2010). Mitochondrial na⁺/ca²⁺ exchanger, a new target for neuroprotection in rat hippocampal slices. *Biochemical and biophysical research communications*, 400(1):140–144.
- Nieto, P. S., Valdez, D. J., Acosta-Rodríguez, V. A., and Guido, M. E. (2011). Expression of novel opsins and intrinsic light responses in the mammalian retinal ganglion cell line rgc-5. presence of opn5 in the rat retina. *PLoS one*, 6(10):e26417.
- Niles, L. P., Armstrong, K. J., Castro, L. M. R., et al. (2004). Neural stem cells express melatonin receptors and neurotrophic factors: colocalization

- of the mt1 receptor with neuronal and glial markers. *BMC neuroscience*, 5(1):41.
- Nishiguchi, K. M., Kaneko, H., Nakamura, M., Kachi, S., and Terasaki, H. (2008). Identification of photoreceptor precursors in the pars plana during ocular development and after retinal injury. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49(1):422–428.
- Ohashi, K., Burkart, V., Flohé, S., and Kolb, H. (2000). Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *The Journal of Immunology*, 164(2):558–561.
- Okamura, Y., Watari, M., Jerud, E. S., et al. (2001). The extra domain a of fibronectin activates toll-like receptor 4. *Journal of Biological Chemistry*, 276(13):10229–10233.
- Okano, H. (2002). Stem cell biology of the central nervous system. *Journal of neuroscience research*, 69(6):698–707.
- Okun, E., Griffioen, K. J., Gen Son, T., et al. (2010). Tlr2 activation inhibits embryonic neural progenitor cell proliferation. *Journal of neurochemistry*, 114(2):462–474.
- Okun, E., Griffioen, K. J., Lathia, J. D., et al. (2009). Toll-like receptors in neurodegeneration. *Brain research reviews*, 59(2):278–292.
- Okun, E., Griffioen, K. J., and Mattson, M. P. (2011). Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease. *Trends in neurosciences*, 34(5):269–281.
- Ooto, S., Akagi, T., Kageyama, R., et al. (2004). Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(37):13654–13659.
- Orkin, S. H. (1998). Embryonic stem cells and transgenic mice in the study of hematopoiesis. *International Journal of Developmental Biology*, 42:927–934.
- Osakada, F., Ooto, S., Akagi, T., et al. (2007). Wnt signaling promotes regeneration in the retina of adult mammals. *The Journal of neuroscience*, 27(15):4210–4219.
- Osterberg, G. (1935). *Topography of the layer of rods and cones in the human retina*. Nyt Nordisk Forlag.
- Otteson, D. C. and Phillips, M. J. (2010). A conditional immortalized mouse müller glial cell line expressing glial and retinal stem cell genes. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(11):5991–6000.
- Parker, G. C. (2014). Very small embryonic-like stem cells: a scientific debate? *Stem cells and development*, 23(7):687–688.

BIBLIOGRAFÍA

- Perron, M. and Harris, W. A. (2000). Retinal stem cells in vertebrates. *Bioessays*, 22(8):685–688.
- Perron, M., Kanekar, S., Vetter, M. L., and Harris, W. A. (1998). The genetic sequence of retinal development in the ciliary margin of the *Xenopus* eye. *Developmental biology*, 199(2):185–200.
- Pevsner-Fischer, M., Morad, V., Cohen-Sfady, M., et al. (2007). Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood*, 109(4):1422–1432.
- Piccinini, A. and Midwood, K. (2010). Dampening inflammation by modulating tlr signalling. *Mediators of Inflammation*, 2010.
- Pinilla, I., Cuenca, N., Martinez-Navarrete, G., Lund, R. D., and Sauv e, Y. (2009). Intraretinal processing following photoreceptor rescue by non-retinal cells. *Vision research*, 49(16):2067–2077.
- Pinilla, I., Cuenca, N., Sauv e, Y., Wang, S., and Lund, R. D. (2007). Preservation of outer retina and its synaptic connectivity following subretinal injections of human rpe cells in the royal college of surgeons rat. *Experimental eye research*, 85(3):381–392.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., et al. (1998). Defective lps signaling in c3h/hej and c57bl/10sccr mice: mutations in tlr4 gene. *Science*, 282(5396):2085–2088.
- Polyak, S. L. (1941). The retina: the anatomy and the histology of the retina in man, ape, and monkey, including the consideration of visual functions, the history of physiological optics, and the histological laboratory technique.
- Potten, C. S. and Loeffler, M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. lessons for and from the crypt. *Development*, 110(4):1001–1020.
- Pow, D. V. and Crook, D. K. (1995). Immunocytochemical evidence for the presence of high levels of reduced glutathione in radial glial cells and horizontal cells in the rabbit retina. *Neuroscience letters*, 193(1):25–28.
- Prada, C., Puga, J., Pérez-Méndez, L., López, R., and Ramírez, G. (1991). Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the chick retina. *European Journal of Neuroscience*, 3(6):559–569.
- Qureshi, S. T., Larivière, L., Leveque, G., et al. (1999). Endotoxin-tolerant mice have mutations in toll-like receptor 4 (tlr4). *The Journal of experimental medicine*, 189(4):615–625.
- Raivich, G., Bohatschek, M., Kloss, C. U., et al. (1999). Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain research reviews*, 30(1):77–105.
- Ratajczak, J., Zuba-Surma, E., Klich, I., et al. (2011). Hematopoietic differen-

- tiation of umbilical cord blood-derived very small embryonic/epiblast-like stem cells. *Leukemia*, 25(8):1278–1285.
- Ratajczak, M., Zuba-Surma, E., Wojakowski, W., et al. (2014). Very small embryonic-like stem cells (vsels) represent a real challenge in stem cell biology: recent pros and cons in the midst of a lively debate. *Leukemia*, 28(3):473–484.
- Raymond, P. A., Barthel, L. K., Bernardos, R. L., and Perkowski, J. J. (2006). Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish. *BMC developmental biology*, 6(1):36.
- Reh, T. (1987). Cell-specific regulation of neuronal production in the larval frog retina. *The Journal of neuroscience*, 7(10):3317–3324.
- Reh, T. and Kljavin, I. (1989). Age of differentiation determines rat retinal germinal cell phenotype: induction of differentiation by dissociation. *The Journal of neuroscience*, 9(12):4179–4189.
- Reh, T. A. and Fischer, A. J. (2006). Retinal stem cells. *Methods in enzymology*, 419:52–73.
- Reichenbach, A. and Bringmann, A. (2010). *Müller Cells in the Healthy and Diseased Retina*. Springer.
- Reichenbach, A. and Bringmann, A. (2013). New functions of müller cells. *Glia*, 61(5):651–678.
- Reichenbach, A., Stolzenburg, J.-U., Eberhardt, W., et al. (1993). What do retinal müller (glial) cells do for their neuronal small siblings. *Journal of chemical neuroanatomy*, 6(4):201–213.
- Reyes-Aguirre, L., Ferraro, S., Quintero, H., et al. (2013). Glutamate-induced epigenetic and morphological changes allow rat müller cell dedifferentiation but not further acquisition of a photoreceptor phenotype. *Neuroscience*, 254:347–360.
- Riveros, D. M., Chagoyán, J. C. V., Morales, R. A., and Juárez, M. C. (2007). Células madre y células troncoembrionarias: Diferencias biológicas stem cells and embryonic stem cells: Biological differences. *Vet. Méx*, 38:4.
- Rivest, S. (2009). Regulation of innate immune responses in the brain. *Nature Reviews Immunology*, 9(6):429–439.
- Robinson, J., Schmitt, E. A., Harosi, F. I., Reece, R. J., and Dowling, J. E. (1993). Zebrafish ultraviolet visual pigment: absorption spectrum, sequence, and localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(13):6009–6012.
- Rolls, A., Shechter, R., London, A., et al. (2007). Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nature cell biology*, 9(9):1081–1088.
- Rose, D., Zhu, X., Kose, H., et al. (1997). Toll, a muscle cell surface molecule,

- locally inhibits synaptic initiation of the rp3 motoneuron growth cone in drosophila. *Development*, 124(8):1561–1571.
- Roy, S., Gascard, P., Dumont, N., et al. (2013). Rare somatic cells from human breast tissue exhibit extensive lineage plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(12):4598–4603.
- Sakakibara, S.-i., Imai, T., Hamaguchi, K., et al. (1996). Mouse-musashi-1, a neural rna-binding protein highly enriched in the mammalian cns stem cell. *Developmental biology*, 176(2):230–242.
- Sakami, S., Etter, P., and Reh, T. A. (2008). Activin signaling limits the competence for retinal regeneration from the pigmented epithelium. *Mechanisms of development*, 125(1):106–116.
- Sarthy, V. P., Brodjian, S. J., Dutt, K., et al. (1998). Establishment and characterization of a retinal müller cell line. *Investigative ophthalmology & visual science*, 39(1):212–216.
- Saszik, S. and DeVries, S. H. (2012). A mammalian retinal bipolar cell uses both graded changes in membrane voltage and all-or-nothing na⁺ spikes to encode light. *The Journal of Neuroscience*, 32(1):297–307.
- Scheef, E., Wang, S., Sorenson, C. M., and Sheibani, N. (2005). Isolation and characterization of murine retinal astrocytes. *Mol Vis*, 11:613–624.
- Schnitzer, J. (1988). Astrocytes in the guinea pig, horse, and monkey retina: their occurrence coincides with the presence of blood vessels. *Glia*, 1(1):74–89.
- Schofield, R. (1977). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood cells*, 4(1-2):7–25.
- Schütte, M. and Werner, P. (1998). Redistribution of glutathione in the ischemic rat retina. *Neuroscience letters*, 246(1):53–56.
- Seaberg, R. M. and van der Kooy, D. (2003). Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends in neurosciences*, 26(3):125–131.
- Seigel, G. M. (1996). Establishment of an e1a-immortalized retinal cell culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 32(2):66–68.
- Seigel, G. M., Takahashi, M., Adamus, G., and McDaniel, T. (1998). Intraocular transplantation of e1a-immortalized retinal precursor cells. *Cell transplantation*, 7(6):559–566.
- Serrano, A. P., Benítez, J. T. C., and Fonseca, R. d. C. S. (2006). Fototransducción visual. *Rev Mex Oftalmol*, 80(6):340–346.
- Shamsuddin, N. and Kumar, A. (2011). Tlr2 mediates the innate response of retinal müller glia to staphylococcus aureus. *The Journal of Immunology*, 186(12):7089–7097.

- Shechter, R., Ronen, A., Rolls, A., et al. (2008). Toll-like receptor 4 restricts retinal progenitor cell proliferation. *The Journal of cell biology*, 183(3):393–400.
- Shirazi, R., Zarnani, A. H., Soleimani, M., et al. (2012). Bmp4 can generate primordial germ cells from bone-marrow-derived pluripotent stem cells. *Cell biology international*, 36(12):1185–1193.
- Singh, M. S. and MacLaren, R. E. (2011). Stem cells as a therapeutic tool for the blind: biology and future prospects. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1721):3009–3016.
- Smith, B. J. and Côté, P. D. (2012). Reduced retinal function in the absence of nav1. 6. *PloS one*, 7(2):e31476.
- Spangrude, G. J. and Brooks, D. M. (1993). Mouse strain variability in the expression of the hematopoietic stem cell antigen ly-6a/e by bone marrow cells. *Blood*, 82(11):3327–3332.
- Spangrude, G. J., Heimfeld, S., and Weissman, I. L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*, 241(4861):58–62.
- Spitznas, M. (1973). The fine structure of the chorioretinal border tissues of the adult human eye. *Advances in ophthalmology= Fortschritte der Augenheilkunde= Progres en ophtalmologie*, 28:78–174.
- Stasi, K., Nagel, D., Yang, X., et al. (2006). Complement component 1q (c1q) upregulation in retina of murine, primate, and human glaucomatous eyes. *Investigative ophthalmology & visual science*, 47(3):1024–1029.
- Stenzel, W., Soltek, S., Sanchez-Ruiz, M., et al. (2008). Both tlr2 and tlr4 are required for the effective immune response in *S. aureus*-induced experimental murine brain abscess. *The American journal of pathology*, 172(1):132–145.
- Stevens, B., Allen, N. J., Vazquez, L. E., et al. (2007). The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*, 131(6):1164–1178.
- Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological reviews*, 85(3):845–881.
- Streit, W. J., Walter, S. A., and Pennell, N. A. (1999). Reactive microgliosis. *Progress in neurobiology*, 57(6):563–581.
- Stryer, L. and Bourne, H. R. (1986). G proteins: a family of signal transducers. *Annual review of cell biology*, 2(1):391–419.
- Su, X., Sorenson, C. M., and Sheibani, N. (2003). Isolation and characterization of murine retinal endothelial cells. *Mol Vis*, 9(1):171–178.
- Sun, D., Enzmann, V., Lei, S., et al. (2003). Retinal pigment epithelial cells activate uveitogenic T cells when they express high levels of MHC class II

- molecules, but inhibit t cell activation when they express restricted levels. *Journal of neuroimmunology*, 144(1):1–8.
- Suszynska, M., Zuba-Surma, E. K., Maj, M., et al. (2013). The proper criteria for identification and sorting of very small embryonic-like stem cells, and some nomenclature issues. *Stem cells and development*, 23(7):702–713.
- Suzuki, S., Namiki, J., Shibata, S., Mastuzaki, Y., and Okano, H. (2010). The neural stem/progenitor cell marker nestin is expressed in proliferative endothelial cells, but not in mature vasculature. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 58(8):721–730.
- Szade, K., Bukowska-Strakova, K., Nowak, W. N., Jozkowicz, A., and Dulak, J. (2014). Comment on: The proper criteria for identification and sorting of very small embryonic-like stem cells, and some nomenclature issues. *Stem cells and development*, 23(7):714–716.
- Szade, K., Bukowska-Strakova, K., Nowak, W. N., et al. (2013). Murine bone marrow lin⁻ sca-1⁺ cd45⁻ very small embryonic-like (vsel) cells are heterogeneous population lacking oct-4a expression. *PloS one*, 8(5):e63329.
- Taguchi, T., Mitcham, J. L., Dower, S. K., Sims, J. E., and Testa, J. R. (1996). Chromosomal localization of til, a gene encoding a protein related to the drosophila transmembrane receptor toll, to human chromosome 4p14. *Genomics*, 32(3):486–488.
- Takeda, K. and Akira, S. (2004). Tlr signaling pathways. In *Seminars in immunology*, volume 16, pages 3–9. Elsevier.
- Tan, E., Ding, X.-Q., Saadi, A., et al. (2004). Expression of cone-photoreceptor-specific antigens in a cell line derived from retinal tumors in transgenic mice. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(3):764–768.
- Taylor, A. (2012). Introduction to the issue regarding research regarding age related macular degeneration. *Molecular aspects of medicine*, 33(4):291.
- Temple, S. (2001). The development of neural stem cells. *Nature*, 414(6859):112–117.
- Temple, S. and Alvarez-Buylla, A. (1999). Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Current opinion in neurobiology*, 9(1):135–141.
- Tian, M., Jarsky, T., Murphy, G. J., Rieke, F., and Singer, J. H. (2010). Voltage-gated na channels in aii amacrine cells accelerate scotopic light responses mediated by the rod bipolar cell pathway. *The Journal of Neuroscience*, 30(13):4650–4659.
- Tomi, M., Funaki, T., Abukawa, H., et al. (2003). Expression and regulation of l-cystine transporter, system xc⁻, in the newly developed rat retinal müller cell line (tr-mul). *Glia*, 43(3):208–217.

- Trenholm, S., Borowska, J., Zhang, J., et al. (2012). Intrinsic oscillatory activity arising within the electrically coupled amacrine-on cone bipolar cell network is driven by voltage-gated Na^+ channels. *The Journal of physiology*, 590(10):2501–2517.
- Tropepe, V., Coles, B. L., Chiasson, B. J., et al. (2000). Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science*, 287(5460):2032–2036.
- Tu, Z., Portillo, J.-A. C., Howell, S., et al. (2011). Photoreceptor cells constitutively express functional tlr4. *Journal of neuroimmunology*, 230(1):183–187.
- Turner, D. L. and Cepko, C. L. (1986). A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature*, 328(6126):131–136.
- Urtubia Vicario, C. (2007). Epitelio pigmetario de la retina (iii). metabolismo de la vitamina a. *Ver y Oír*, 24(213):144–151.
- Van Buren, J. M. (1963). *The retinal ganglion cell layer: a physiological-anatomical correlation in man and primates of the normal topographical anatomy of the retinal ganglion cell layer and its alterations with lesions of the visual pathways*. Ch. c. Thomas.
- Van De Rijn, M., Heimfeld, S., Spangrude, G. J., and Weissman, I. L. (1989). Mouse hematopoietic stem-cell antigen sca-1 is a member of the ly-6 antigen family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(12):4634–4638.
- Vaney, D. (2004). Retinal amacrine cells.
- Vicario, C. U. (1999). *Neurobiología de la visión*, volume 51. Univ. Politèc. de Catalunya.
- Villamón, E., Gozalbo, D., Roig, P., et al. (2004). Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections. *Microbes and infection*, 6(1):1–7.
- Wadachi, R. and Hargreaves, K. (2006). Trigeminal nociceptors express tlr-4 and cd14: a mechanism for pain due to infection. *Journal of dental research*, 85(1):49–53.
- Wagner, H.-J. and Wagner, E. (1988). Amacrine cells in the retina of a teleost fish, the roach (*Rutilus rutilus*): a golgi study on differentiation and layering. *Philosophical Transactions of The Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, pages 263–324.
- Wang, S., Lu, B., Girman, S., et al. (2008). Morphological and functional rescue in rcs rats after rpe cell line transplantation at a later stage of degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*, 49(1):416–421.

- Wässle, H. (2004). Parallel processing in the mammalian retina. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(10):747–757.
- Watanabe, T. and Raff, M. C. (1988). Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve.
- Waterman, R. S., Tomchuck, S. L., Henkle, S. L., and Betancourt, A. M. (2010). A new mesenchymal stem cell (msc) paradigm: polarization into a pro-inflammatory msc1 or an immunosuppressive msc2 phenotype. *PLoS one*, 5(4):e10088.
- Waxman, S. G. (2006). Axonal conduction and injury in multiple sclerosis: the role of sodium channels. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(12):932–941.
- Weissman, I. L., Anderson, D. J., and Gage, F. (2001). Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annual review of cell and developmental biology*, 17(1):387–403.
- Wilson, A. and Trumpp, A. (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature Reviews Immunology*, 6(2):93–106.
- Wohl, S. G., Schmeer, C. W., and Isenmann, S. (2012). Neurogenic potential of stem/progenitor-like cells in the adult mammalian eye. *Progress in retinal and eye research*, 31(3):213–242.
- Wohl, S. G., Schmeer, C. W., Kretz, A., Witte, O. W., and Isenmann, S. (2009). Optic nerve lesion increases cell proliferation and nestin expression in the adult mouse eye *in vivo*. *Experimental neurology*, 219(1):175–186.
- Xue, X.-j. and Yuan, X.-b. (2010). Nestin is essential for mitogen-stimulated proliferation of neural progenitor cells. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 45(1):26–36.
- Yamada, E. S., Bordt, A. S., Marshak, D. W., et al. (2005). Wide-field ganglion cells in macaque retinas. *Visual neuroscience*, 22(4):383.
- Yamaguchi, M., Saito, H., Suzuki, M., and Mori, K. (2000). Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-gfp transgenic mice. *Neuroreport*, 11(9):1991–1996.
- Yamamoto, Y., Yasumizu, R., Amou, Y., et al. (1996). Characterization of peripheral blood stem cells in mice. *Blood*, 88(2):445–454.
- Yáñez, A., Flores, A., Murciano, C., et al. (2010). Signalling through tlr2/myd88 induces differentiation of murine bone marrow stem and progenitor cells to functional phagocytes in response to candida albicans. *Cellular microbiology*, 12(1):114–128.
- Yáñez, A., Hassanzadeh-Kiabi, N., Ng, M. Y., et al. (2013). Detection of a tlr2 agonist by hematopoietic stem and progenitor cells impacts the function of the macrophages they produce. *European journal of immunology*,

- 43(8):2114–2125.
- Yáñez, A., Murciano, C., O'Connor, J.-E., Gozalbo, D., and Gil, M. L. (2009). *Candida albicans* triggers proliferation and differentiation of hematopoietic stem and progenitor cells by a myd88-dependent signaling. *Microbes and infection*, 11(4):531–535.
- Yi, H., Patel, A. K., Sodhi, C. P., Hackam, D. J., and Hackam, A. S. (2012). Novel role for the innate immune receptor toll-like receptor 4 (tlr4) in the regulation of the wnt signaling pathway and photoreceptor apoptosis. *PloS one*, 7(5):e36560.
- Young, R. W. (1985). Cell differentiation in the retina of the mouse. *The Anatomical Record*, 212(2):199–205.
- Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M. S., et al. (2004). A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science*, 303(5663):1522–1526.
- Zhao, X., Das, A. V., Soto-Leon, F., and Ahmad, I. (2005). Growth factor-responsive progenitors in the postnatal mammalian retina. *Developmental dynamics*, 232(2):349–358.
- Zinkernagel, M. S., Chinnery, H. R., Ong, M. L., et al. (2013). Interferon γ -dependent migration of microglial cells in the retina after systemic cytomegalovirus infection. *The American journal of pathology*, 182(3):875–885.
- Zuba-Surma, E. K., Kucia, M., Abdel-Latif, A., et al. (2008a). Morphological characterization of very small embryonic-like stem cells (vsels) by imagestream system analysis. *Journal of cellular and molecular medicine*, 12(1):292–303.
- Zuba-Surma, E. K., Kucia, M., Wu, W., et al. (2008b). Very small embryonic-like stem cells are present in adult murine organs: Imagestream-based morphological analysis and distribution studies. *Cytometry Part A*, 73(12):1116–1127.