



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y
DE LA SALUD ANIMAL

CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS PROGENITORAS
DURANTE LA RETINOGENÉISIS CANINA

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

MALLELY CAROLINA ÁVILA GARCÍA

TUTOR: NORMA ANGÉLICA MORENO MENDOZA

COMITÉ TUTORAL: GUSTAVO ADOLFO GARCÍA SÁNCHEZ

FRANCISCO JOSÉ TRIGO TAVERA

MÉXICO D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el departamento de Biología Celular y fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza y gracias a la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del Comité Tutorial:

Norma Angélica Moreno Mendoza.

Gustavo Adolfo García Sánchez.

Francisco José Trigo Tavera.

A los miembros del Jurado:

Dr. Jaime I. Velasco Velásquez.

Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza

Dra. Sara Caballero Chacón.

Dr. Abelardo Rodríguez Reyes.

Esp. Ciriaco Tista Olmos.

Al posgrado en Ciencias de la Producción y Salud Animal, UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

AGRADECIMIENTOS

Dra. Norma Moreno Mendoza, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio, por sus enseñanzas y por todo su apoyo.

Dr. Jaime I. Velasco Velázquez por su estupenda revisión y valiosas observaciones realizadas en el trabajo final.

MC. Gilberto F. García Ruiz, por toda la ayuda brindada a lo largo de este estudio, por sus invaluable contribuciones al trabajo final y sobre todo por los buenos momentos en el laboratorio.

Dra. Sara Caballero Chacón, por su revisión y por sus excelentes comentarios.

Dr. Gustavo A. García Sánchez, por apoyarme para seguir superándome.

Dr. Abelardo Rodríguez Reyes, por sus aportaciones hacia el trabajo.

MVZ. José Luis Trejo Cesario, MVZ. Karla I. Ramírez Zepeda, MVZ. Roberto Graciano Alcántara, MVZ. José Luis Ortega Villegas y MVZ. Mario García Ruiz del Centro de Control Canino de Ecatepec, Estado de México, por facilitarme las muestras empleadas para este proyecto.

Esp. Tista Olmos Ciriaco por toda la ayuda brindada y por las muestras proporcionadas.

Biól. Rocío Antonio, por su apoyo en el área de biología molecular.

MC. Raymundo Ávila Benítez, por sus valiosas observaciones y por la asesoría estadística.

MC. Clara Aguillón García, Técnico José Baltazar, MC. Sandra Guerrero, MC. Esmeralda Lira, por la ayuda brindada.

DEDICATORIAS

A veces la vida nos da golpes muy duros que son difíciles de superar pero al final siempre nos hacen crecer y revalorar nuestra vida. Estoy muy agradecida con todos y cada uno de ustedes por ayudarme a salir adelante, por escucharme, aconsejarme y fortalecerme; por todos sus cuidados, abrazos, besos, y sonrisas. Gracias por haber llegado a mi vida y compartir momentos felicidad y tristeza, por tener siempre la palabra precisa en el momento adecuado.

Con todo mi amor y gratitud:

A mis papás Teresita y Mundito.

A mis hermanas y cuñados Iridi, Dulce, Nelly, Manuel y Felipe.

A mis sobrinos Fany, Dany, Maureen y Gerardo.

A Sussane Rodekohr.

A Lucién Simón, Héctor López, Rosa Martha Quintero y Nicasio García.

A toda mi familia, especialmente a: Fernando, Carmela, Lucia, José Luis, Laura, Gloria, Roberto, Oscar, Areli y Gutty.

A mis amigos Gilberto García, Elena Vera, Angélica Pablo, Caro Muñoz, Juan Carlos Burgos, Guillermo Hernández, Antonio González, Cristina, Dulce Rangel, Paola Cano, Raúl Flores, Albany Bravo, Eva Abarca, Alicia Ávila, Sofía, Esther e Iván.

RESUMEN

En peces y anfibios existe una zona marginal ciliar (ZMC) que sirve como nicho de células troncales, estas células pueden diferenciarse a todos los tipos neuronales de la retina y continuar produciendo progenitores durante toda su vida. Durante el desarrollo del ojo del perro, se desconoce si las células troncales pierden su habilidad para diferenciarse. En el presente estudio se identificaron células progenitoras, ganglionares y células en proliferación durante la retinogénesis canina con la expresión de marcadores específicos. **Material y métodos:** ojos de perros en etapa embrionaria, fetal y neonatal fueron enucleados y procesados para histología e inmunohistoquímica. Se detectaron marcadores inmunocitoquímicos específicos de las células progenitoras (Pax6, c-kit y Nestina), células ganglionares (BDNF, Brn3a y Thy1) y células en proliferación ($pH3$). Las secciones fueron examinadas con microscopía de luz, electrónica y confocal. **Resultados:** La expresión de Pax6, Nestina, c-kit y $pH3$ se detectó en la capa neuroblástica de la retina en la etapa embrionaria. En la etapa fetal, Pax6, Nestina, c-kit y $pH3$ fueron expresados en la capa neuroblástica interna (CNBI) así como en la capa neuroblástica externa; BDNF, Thy1 y Brn3a solo fueron expresados en la CNBI. En la etapa neonatal, todos los marcadores fueron expresados con excepción de c-kit. **Conclusiones:** La expresión de diferentes marcadores de células progenitoras (Pax6, Nestina y c-kit) fueron detectados durante la etapa embrionaria, fetal y neonatal en la retinogénesis canina. En la etapa fetal, fue evidente la fase M del ciclo celular en las células progenitoras mientras que en la etapa neonatal fue en las células ganglionares. La diferenciación celular fue detectada a partir de la etapa fetal con la expresión de Brn3a, Thy1 y BDNF. Los genes Pax6 y BDNF incrementaron durante la retinogénesis canina, sin embargo la proteína del gen BDNF solo fue expresada después de la etapa fetal.

Palabras clave: células progenitoras, retinogénesis canina, inmunohistoquímica, Pax6, c-kit, Nestina.

ABSTRACT

In fish and amphibians there is a ciliary marginal zone (CMZ) which serves as the stem cell niche, these cells can give rise to all types of retinal neurons and continue to produce progenitors throughout life. During embryonic development of the eye's dog, it is unknown if the stem cells lose their ability to differentiate. In the present study were describe stem cells, ganglion cells and proliferation cells during canine retinogenesis each the expression of retina-specific marker. **Methods:** Eyes from canine embryos, fetuses and dog from postnatal day 1 were enucleated and then processed for histology and immunohistochemical analysis. The expression of retinal-specific markers in stem cells (Pax6, c-kit and nestin), ganglion cells (BDNF, Brn3a and Thy1) and cell proliferation (ρ H3) was determined. Sections were examined with light, electron and confocal microscopy. **Results:** Expression of Pax6, nestin, c-kit and ρ H3 were localized mainly in neuroblastic layer of the retina in the embryonary stage. At the fetal stage, Pax6, Nestin, c-kit and ρ H3 were expressed into the inner neuroblastic layer (INL) as outer neuroblastic layer; BDNF, Thy1 and Brn3a were also expressed in INL. During the neonatal stage, all retinal-specific markers were expressed except c-kit. **Conclusions:** The expression of different progenitor markers was detected during embryonary, fetal and neonatal stages in canine retinogenesis. Progenitor cells in M-phase were found during fetal stage, whereas cells in this phase of cell cycle were present in ganglion cells in neonates. Differentiated cells were detected during fetal stage with the expression of BDNF, Thy1 and Brn3a. The genes Pax6 and BDNF were increased during canine retinogenesis; however the protein of BDNF was expressed after fetal stage.

Key words: stem cells, canine retinogenesis, immunohistochemical, Pax6, nestin, c-kit.

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN	1
<hr/>	
1. Antecedentes	2
1.1 Células troncales	2
1.1.1 Definición y propiedades	2
1.2 Células troncales y progenitoras de la retina	4
1.2.1 Zona marginal ciliar	4
1.2.2 Cuerpo ciliar	5
1.2.3 Epitelio pigmentado	5
1.2.4 Glía de Müller	5
1.2.5 Trasplante de células troncales en la retina	6
2. Desarrollo del ojo	7
2.1 Retinogénesis canina	7
3. Expresión genética de células progenitoras	11
3.1 Pax6	11
3.2 Nestina	13
3.3 c-kit	14
4. Expresión genética de células ganglionares	15
4.1 BDNF	15
4.2 Brn3a	16
4.3 Thy1	17

II. JUSTIFICACIÓN	18
<hr/>	
III. HIPÓTESIS	19
<hr/>	
IV. OBJETIVOS	20
<hr/>	
V. MATERIAL Y MÉTODOS	21
<hr/>	
1. Obtención de muestras.....	21
2. Estudio Histológico.....	22
2.1 Parafina.....	22
2.2 Resina de Epon.....	22
3. Análisis Inmunohistoquímico.....	23
4. Aislamiento del ARN total.....	24
5. Detección de los genes Pax6 y BDNF por RT-PCR.....	25
<hr/>	
VI. RESULTADOS	27
<hr/>	
1. Determinación del desarrollo embrionario.....	27
2. Etapa embrionaria (25 días de gestación).....	27
2.1 Morfogénesis.....	27
2.2 Identificación de células progenitoras y en proliferación.....	28
2.3 Identificación de células ganglionares.....	28

3. Etapa fetal (35-60 días de gestación).....	36
3.1 Morfogénesis.....	36
3.2 Identificación de células progenitoras y en proliferación.....	36
3.3 Identificación de células ganglionares.....	37
4. Etapa neonatal (1 día post-natal).....	44
4.1 Morfogénesis.....	44
4.2 Identificación de células progenitoras y en proliferación.....	44
4.3 Identificación de células ganglionares.....	44
5. Detección de células progenitoras y ganglionares por RT-PCR.....	49
VII. DISCUSIÓN	52
<hr/>	
VIII. CONCLUSIONES	58
<hr/>	
IX. REFERENCIAS	59
<hr/>	

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos empleados en la inmunohistoquímica

23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Propiedad de auto-renovación y potencia presente en células troncales y progenitoras.....	3
Figura 2. Retinogénesis.....	10
Figura 3. Desarrollo de la retina en etapas pre-natal y post-natal.....	29
Figura 4. Fotomicrografías de la retina en la etapa pre-natal y post-natal.....	31
Figura 5. Morfología de la retina en la etapa embrionaria (25 días de gestación).....	33
Figura 6. Expresión marcadores de células progenitoras durante la etapa embrionaria.....	34
Figura 7. Células progenitoras proliferando durante retinogénesis canina en la etapa embrionaria.....	35
Figura 8. Morfología de la retina durante la etapa fetal (35-60 días de gestación).....	38
Figura 9. Expresión de marcadores de células progenitoras durante la etapa fetal.....	39
Figura 10. Expresión de células en proliferación en la etapa fetal.....	40
Figura 11. Colocalización de células progenitoras proliferando durante la etapa fetal.....	41

Figura 12. Expresión de marcadores de células ganglionares en etapa fetal...	42
Figura 13. Células ganglionares proliferando en la etapa fetal.....	43
Figura 14. Morfología de la retina en la etapa neonatal (1 día post-natal).....	45
Figura 15. Células progenitoras neurales en la etapa neonatal.....	46
Figura 16. Presencia de células ganglionares en la etapa neonatal.....	47
Figura 17. Células ganglionares en proliferación en la etapa neonatal.....	48
Figura 18. Comparación de los patrones de expresión genética de células progenitoras detectadas por RT-PCR durante la etapa embrionaria, fetal y neonatal en la retina canina.....	50
Figura 19. Comparación de los patrones de expresión genética de células ganglionares detectadas por RT-PCR durante la etapa embrionaria, fetal y neonatal de la retinogenesis canina.....	51

ABREVIATURAS

BDNF	Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro
CCG	Capa de células ganglionares
CNBE	Capa neuroblástica externa
CNBI	Capa neuroblástica interna
CNI	Capa nuclear interna
CNE	Capa nuclear externa
CFN	Capa de fibras nerviosas
CFR	Capa de fotorreceptores
CPE	Capa plexiforme externa
CPI	Capa plexiforme interna
Ddg	Días de gestación
DEPC	Agua tratada con dietil pirocarbonato
Dpn	Días post-natal
EGF	Factor de crecimiento epidérmico

EPR	Epitelio pigmentado de la retina
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
MLE	Membrana limitante externa
MLI	Membrana limitante interna
OsO ₄	Tetróxido de osmio
PFA	Paraformaldehído
pH3	Fosfohistona H3
RT-PCR	Transcripción inversa-Reacción en cadena de la polimerasa
SCF	Stem cell factor
Shh	Sonic hedgehog
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
ZMC	Zona marginal ciliar

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han logrado muchos avances en el tratamiento de padecimientos de la córnea, el cristalino y la retina. Enfermedades oculares como: atrofia retiniana progresiva, degeneración macular relacionada con la edad, desprendimiento de la retina y glaucoma, están asociadas con la degeneración neuronal y son la causa principal del debilitamiento visual (Abmad, 2001).

El glaucoma es un grupo de enfermedades oculares caracterizado por la muerte progresiva de células ganglionares de la retina y sus axones. En el humano se estima que 60 millones de personas pueden estar afectadas por el glaucoma, de las cuales 8.4 millones desarrollarán ceguera bilateral. En el caso de animales domésticos, se estima que el glaucoma afecta aproximadamente al 0.9% de las razas puras de perros en América del Norte, siendo la de mayor predisposición Cocker Spaniel Americano. Además, el glaucoma afecta a gatos, caballos, cabras y otras especies incluyendo animales de vida silvestre (Ofri y Narfström, 2007; Gelatt, 2007).

A pesar de la incidencia de esta enfermedad, hasta la fecha no hay un tratamiento eficaz capaz de bloquear el progreso de la enfermedad o restaurar la función de la retina. En los últimos años la búsqueda de generar una terapia de restitución celular, cuyo objetivo es reemplazar las células dañadas por nuevas, para formar una nueva integración sináptica y así poder recuperar el sistema visual. Se ha observado que el trasplante de células troncales puede generar una integración estructural en el reemplazo de fotorreceptores, epitelio pigmentado y células ganglionares; sin embargo, su funcionalidad no ha sido completamente establecida. Por ello, actualmente las investigaciones se han enfocado en indagar sobre la identificación de genes y moléculas que participan en la homeostasis y sobrevivencia de células troncales neurales (Ahmad, 2001; Ofri y Narfström, 2007; Dahlmann-Noor *et al.*, 2010).

1. ANTECEDENTES

1.1. CÉLULAS TRONCALES

1.1.1 DEFINICIÓN Y PROPIEDADES

Las células troncales o células madres son definidas por sus dos principales propiedades: auto-renovación y potencial de diferenciación.

Una célula troncal (Figura 1) es aquella célula indiferenciada que por su capacidad de auto-renovación puede dividirse simétrica y/o asimétricamente generando una o más células tanto idénticas como diferenciadas. Por su potencia, es decir por su capacidad de diferenciarse dentro de un tipo celular especializado se clasifican en: totipotentes (provenientes de la fusión de un óvulo con un espermatozoide, tienen la capacidad de diferenciarse a todos los tipos celulares embrionarios y extraembrionarios), pluripotentes (con la cualidad de generar todas las células de las tres capas germinales) y multipotentes (con la capacidad de diferenciarse en las células de su capa germinal). En contraste, aunque las células progenitoras conservan la propiedad de auto-renovación, su nivel de especialización ha perdido cierto grado de diferenciación, catalogándose como: multipotentes (solo pueden dar lugar a tipos celulares de una familia) o unipotentes (si pueden crear un único tipo celular). Tanto las células troncales como las progenitoras, juegan un papel importante en la organogénesis y en la regeneración de tejidos. En etapas adultas estas células residen en microambientes especiales llamados nichos y su activación dependerá de señales tanto intrínsecas como extrínsecas (Ahmad, 2001; McCulloch y Till, 2005; Li y Xie, 2005; Salem y Thiemermann, 2010).

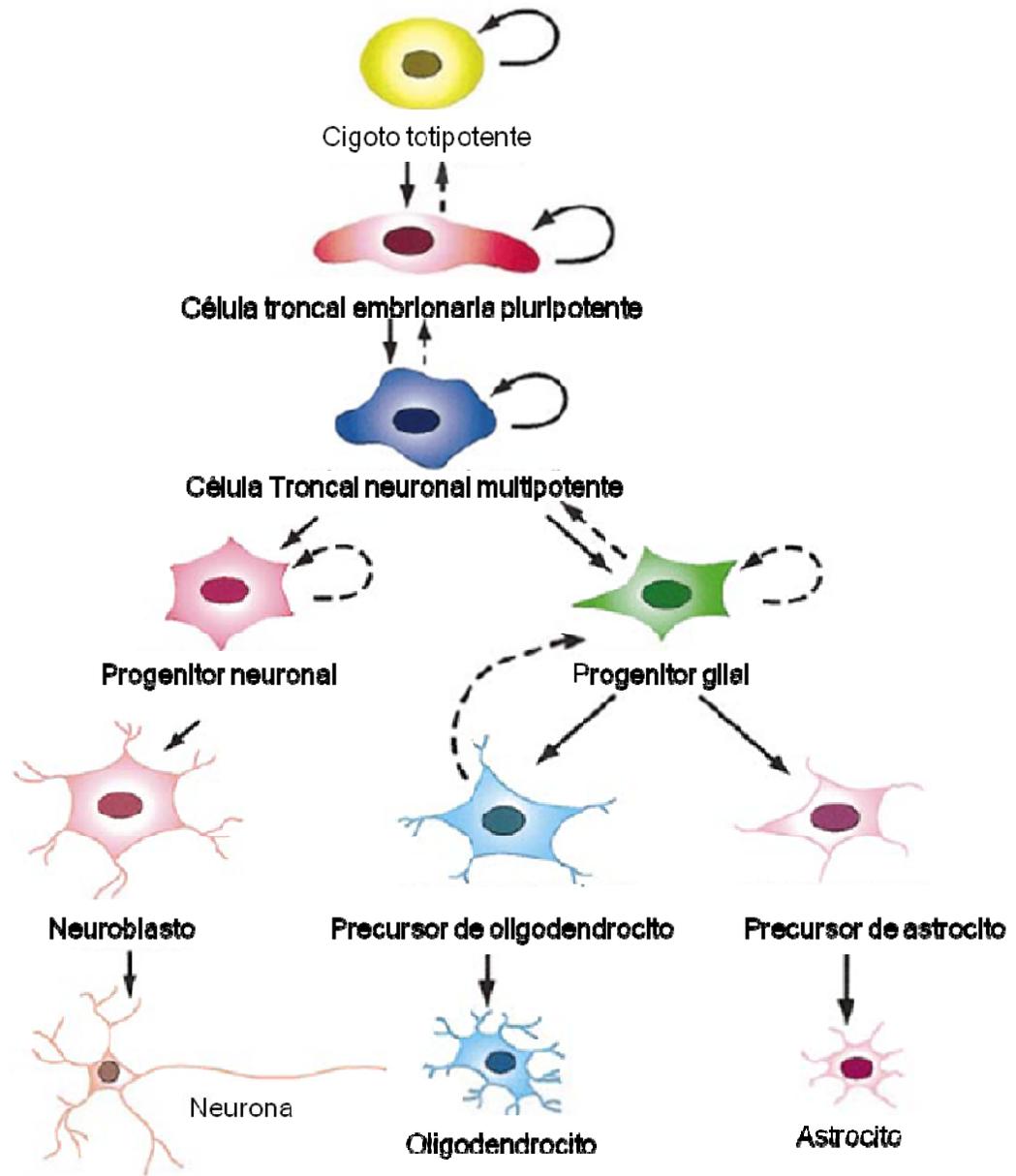


Figura 1. Propiedad de auto-renovación y potencia presente en células troncales y progenitoras. Modificado de Ahmad, 2001.

1.2 CÉLULAS TRONCALES Y PROGENITORAS DE LA RETINA

Durante el desarrollo embrionario del ojo, un grupo de células progenitoras multipotentes de la vesícula óptica tienen la capacidad de diferenciarse en neuronas y células de la glía durante la vida embrionaria y en algunas especies esta característica continúa en estado adulto. En peces y anfibios, células de la retina continúan diferenciándose por toda la vida adulta, en aves esta particularidad se encuentra limitada a etapas embrionarias o como respuesta a una lesión, mientras que en mamíferos está ausente (Reh y Levine, 1998).

1.2.1 ZONA MARGINAL CILIAR

En peces y anfibios, donde el desarrollo ocular se mantiene aún después de finalizar la etapa embrionaria, es decir, células de la retina continúan diferenciándose en el periodo de larva y en estado adulto se ha demostrado que las células de la retina de estos organismos tiene la capacidad de regenerarse durante la vida adulta. En estos animales, se ha observado una zona llamada zona marginal ciliar (ZMC) que presenta un grupo de células troncales ubicadas en la región más periférica de la retina, cerca de la unión con el epitelio ciliar. Estas células tienen la capacidad de diferenciarse en todos los tipos celulares de la retina a lo largo de toda la vida adulta. En aves se ha reportado cierta capacidad de regeneración, sin embargo la ZMC es más pequeña y su capacidad de diferenciación celular se ve limitada exclusivamente a la producción de células amacrinas y bipolares a partir de la diferenciación de células de la glía de Müller (Moshiri *et al.*, 2004; Reh y Fischer, 2001; Reh y Fischer, 2006).

1.2.2 CUERPO CILIAR

En mamíferos se ha observado que el cuerpo ciliar es análogo a la ZMC de peces y anfibios. En ratas y ratones adultos (Tropepe *et al.*, 2000; Ahmad *et al.*, 2004) así como en cerdos durante etapas embrionarias y postnatales (Gu *et al.*, 2007) se ha logrado diferenciar neuronas y glía a partir del aislamiento y proliferación *in vitro* de células del cuerpo ciliar en presencia de factores de crecimiento epidérmico (EGF) y fibroblástico (FGF). En humanos también se ha reportado la diferenciación celular a partir de células troncales embrionarias (Nistor *et al.*, 2010) y células disociadas de la pars plana y la neuroretina de humanos adultos post mortem, donde se aislaron células progenitoras y se observó que son capaces de formar neuroesferas en condiciones apropiadas de cultivo que expresan marcadores específicos de la glía, de células neuronales y de fotorreceptores (Mayer *et al.*, 2005).

1.2.3 EPITELIO PIGMENTADO

En estudios realizados con urodelos principalmente ajolotes y salamandras, se ha observado que las células del epitelio pigmentado tienen la característica de transdiferenciarse y proliferar a nuevas células progenitoras. En embriones de pollo y roedores esta habilidad se pierde durante estados tempranos del desarrollo. Desde 1989 Park y Hollenberg colaboradores demostraron que factores de crecimiento juegan un papel muy importante en el proceso de transdiferenciación (Moshiri *et al.*, 2004).

1.2.4 GLÍA DE MÜLLER

Fisher observó que después de ser dañada la retina del pollo con un tratamiento tóxico a base de NMDA, las células de la glía de Müller regresan al

ciclo celular, migran a la capa nuclear externa para entrar en la fase de mitosis y sufrir una desdiferenciación para dar lugar a nuevas neuronas y glía. Además se ha probado que la combinación de factores de crecimiento pueden estimular a la glía para iniciar una onda de proliferación. Sin embargo, muchas células permanecen indiferenciadas; alguna diferenciadas a glía y en número menor a neuronas bipolares y amacrinas (Reh y Fischer, 2001; Fischer *et al.*, 2002).

1.2.5 TRASPLANTE DE CÉLULAS TRONCALES EN LA RETINA

Takahashi y colaboradores (1998), demostraron que células progenitoras neurales derivadas del hipocampo de rata adulta, que son trasplantadas en la cavidad vítrea son capaces de asumir la morfología de las células de la retina; sin embargo, no expresaron marcadores específicos y su función está aún por dilucidarse. Desde entonces, se han intensificado los estudios presentándose resultados variables y muchas veces contradictorios. En un estudio reciente donde se trasplantaron células progenitoras en estadio de diferenciación y/o bastones jóvenes en la retina en un modelo murino con distrofia de los fotorreceptores, se demostró que el trasplante de neuronas jóvenes o progenitoras casi diferenciadas son capaces de migrar, sobrevivir y llevar a cabo su función fisiológica (MacLaren *et al.*, 2006). Sin embargo, debido a la baja tasa de proliferación de estas células y a su controvertida obtención, se dificulta el desarrollo para su utilización en el tratamiento de humanos.

2. DESARROLLO DEL OJO

Durante el desarrollo del tubo neural a la altura del prosencéfalo se produce la evaginación del ectodermo neural que al hacer contacto con el ectodermo superficial forma la vesícula óptica, esta unión ejerce un efecto inductor en la diferenciación de la placoda del cristalino. Consecutivamente la parte distal de la vesícula se invagina y da lugar a la copa óptica, en este momento la vesícula del cristalino se separa del ectodermo superficial y forma el cristalino. La retina se forma en la parte posterior de la copa óptica. Hacia la porción externa de la retina se derivan células que contienen melanina y que constituyen el epitelio pigmentado de la retina (EPR), mientras que en la porción neural, los neuroblastos en la retina sensorial se diferenciarán en células ganglionares, bipolares, horizontales, amacrinas y fotorreceptores (conos y bastones). Por su parte, los espongioblastos se diferenciarán en células de la glía de Müller. En estudios realizados en humano, ratón y perro se ha identificado una secuencia de diferenciación celular cronológica durante la retinogénesis. Se ha observado que las primeras células en diferenciarse son las células ganglionares y a partir de este suceso, se suscitan ondas de diferenciación de la parte central hacia la periferia y de la capa interna hacia la externa de la retina (De Lahunta, 1983; Antúnez, 2003; Quiroz *et al.*, 2004; Gelatt, 2007).

2.1 RETINOGENESIS CANINA

La retinogénesis en el perro se inicia en el día 25 de gestación, donde a partir de una capa neuroblástica (Figura 2a) se formarán dos zonas: una marginal interna (anuclear) y una germinativa externa (nuclear), iniciándose de esta manera el proceso morfogénico caracterizado por ondas de diferenciación. El EPR, constituido por una capa de células cuboidales que contienen pigmento melánico en su citoplasma acumulado hacia el extremo apical, se extiende desde los bordes del nervio óptico hasta la ora serrata. Al día 32 de gestación, en la zona nuclear

externa se observa proliferación y migración celular hacia la zona marginal interna, originando las capas neuroblástica interna (CNBI) y neuroblástica externa (CNBE) separadas entre sí por el espacio transitorio de Chievitz. Dentro de la CNBI las primeras células en diferenciarse son las ganglionares, cuyos axones se dirigirán hacia el cerebro y formarán la capa de fibras nerviosas del nervio óptico (Figura 2b).

Las células ganglionares están clasificadas de acuerdo a su morfología, fisiología y tamaño de soma. La franja visual compuesta por un denso número de células ganglionares se encuentra en el área central, es una banda orientada horizontalmente localizada en la retina central entre la región dorsal y temporal del nervio óptico. Una baja concentración de células ganglionares se observan en la retina periférica. Las células ganglionares identificadas en el perro son: células alfa, cuyo soma es muy grande (21-23 μm ó 33-44 μm en la región central y periférica respectivamente), un campo dendrítico amplio (160-200 μm en la retina central y 1100 μm en la periférica) y un axón pronunciado. Estas células representan una pequeña población tan solo del 3-14% del número total de células ganglionares. Células beta, tienen un soma pequeño (14 μm en la retina central y 21 a 30 μm en la periferia), un pequeño campo dendrítico (25-360 μm en la retina central y periférica respectivamente) y un pequeño axón. Son más comunes que las alfa, debido a que representan el 90% del total de la población. Células Gama, se presentan en los perros pero su información se encuentra aún limitada (Aguirre *et al.*, 1972; Brooks *et al.*, 1999).

La consolidación de la capa de células ganglionares (CCG) se presenta en el día 45 y es el resultado de la formación de la capa plexiforme interna (CPI); en este día además se observan los primeros conos y bastones rudimentarios. Entre el día 1 y 16 postnatal los segmentos interno y externo de los fotorreceptores son detectados, la CNBE (día 7-19) comienza a separarse con el surgimiento de la capa plexiforme externa (CPE) formando las capas: nuclear interna (CNI) y externa (CNE) entre el día 7 y 13. Desde el día 16 y hasta el día 40 postnatal

continúa el desarrollo de las capas de la retina; en la parte proximal de la CNI se localizan las células amacrinas, en la intermedia se encuentran los núcleos de las células bipolares y glía de Müller, mientras que en la distal se localizan las células horizontales, eliminando con esta disposición celular la capa transitoria de Chievitz; en la CNE, se disponen los cuerpos de los fotorreceptores (Figura 2c). Finalmente al término de esta diferenciación celular, histológicamente la retina se divide en 10 capas:

1. Epitelio pigmentado de la retina (EPR)
2. Capa de fotorreceptores (CFR)
3. Membrana limitante externa (MLE)
4. Capa nuclear externa (CNE)
5. Capa plexiforme externa (CPE)
6. Capa nuclear interna (CNI)
7. Capa plexiforme interna (CPI)
8. Capa de células ganglionares (CCG)
9. Capa de fibras nerviosas (CFN)
10. Membrana limitante interna (MLI)

(Aguirre *et al.*, 1972; Tasman y Jaeger, 1994; Cook, 1995; Marquardt y Gruss, 2002; Gelatt, 2007).

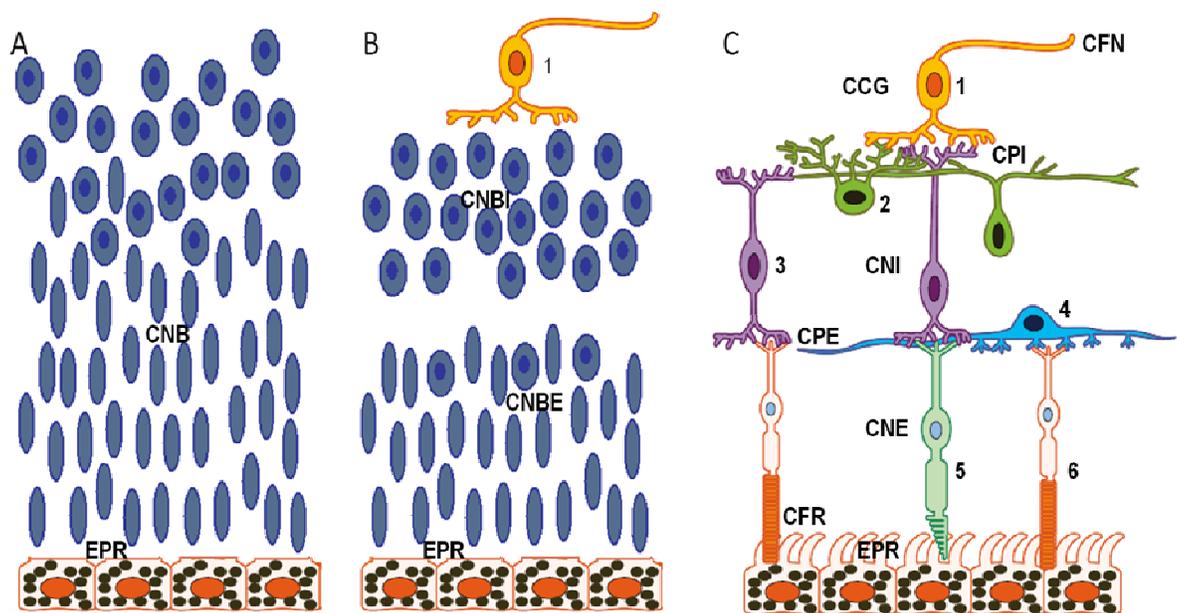


Figura 2. Retinogénesis. A) Capa neuroblástica (CNB) donde se observan sus dos zonas: marginal interna (anuclear) y germinativa externa (nuclear). B) Las células de la capa neuroblástica migran y forman dos capas interna (CNBI) y externa (CNBE), algunas células comienzan su diferenciación a células ganglionares (1). C) Al terminar la diferenciación celular, la retina presenta una capa de fibras nerviosas (CFN); capa de células ganglionares (CCG); capa plexiforme interna (CPI) formada por las uniones sinápticas de células ganglionares (1) con amacrinas (2); capa nuclear interna (CNI) integrada por los núcleos de células amacrinas (2), bipolares (3) y horizontales (4); capa plexiforme externa (CPE), constituida por uniones sinápticas de las células bipolares (3) y horizontales (4) con los conos (5) y bastones (6); capa nuclear externa (CNE) compuesta por los núcleos de los conos (5) y bastones (6); capa de fotorreceptores (CFR) localizados los segmentos externos de los conos y bastones; epitelio pigmentado de la retina (EPR). Modificado de Dahlmann-Noor *et al.*, 2010.

3. EXPRESIÓN GENÉTICA DE CELULAS PROGENITORAS

Dentro de los diferentes modelos animales (rana, mosca de la fruta y embrión de pollo) se ha observado que la retinogénesis está regulada por la expresión de diferentes vías de señalización, entre ellas se encuentran: *Sonic hedgehog (Shh)*, cuya expresión inicia la diferenciación de las células ganglionares; Notch y Wnt que regulan el potencial proliferativo y el estado indiferenciado de células progenitoras dentro del nicho; Chx10, Pax6, Rx1, Six3 y Six6, genes implicados en la diferenciación de las células progenitoras, así como, en el mantenimiento de la zona marginal ciliar. También se han identificado diferentes genes involucrados en el desarrollo del ojo, que participan en la especificación de diversos tipos celulares y cuya expresión puede modificar la presencia de algún tipo celular mientras que su ausencia causa serios problemas en la formación del ojo como la anoftalmia, microftalmia, ciclopía, coloboma, afaquia, etc. (Marquardt y Gruss, 2002; Zaghloul *et al.*, 2005; Raymond *et al.*, 2006).

3.1 Pax6

Uno de los genes de mayor importancia durante el desarrollo ocular es el factor de transcripción denominado Pax6, cuya expresión está localizada en el sistema nervioso central, nariz, páncreas y ojo. Su expresión ha sido reportada antes de la formación de la placoda del cristalino, participando activamente en la diferenciación del cristalino y la retina durante el desarrollo embrionario, mientras que en el ojo adulto su expresión es mantenida en el cristalino, córnea, células ganglionares y amacrinas de la retina. Las mutaciones de Pax6 están asociadas con anomalías en la retina, iris, cristalino y córnea. En humanos las mutaciones han sido identificadas en pacientes con aniridia, cataratas, dislocación del lente, displasia foveal, hipoplasia del nervio óptico, nistagmus y glaucoma; además se ha

descrito en la anomalía de Peters, donde los pacientes presentan leucoma, capas posteriores de la córnea defectuosas, adhesión entre la superficie anterior del lente y la superficie posterior de la córnea y/o adhesión entre el iris, además defectos en córnea y cristalino. En el ratón, las mutaciones de Pax6 son responsables de un fenotipo heterocigoto conocido como “small eye” (Sey). Se ha reportado que este fenotipo presenta malformaciones del ojo (microftalmia, hipoplasia del iris, cataratas, lente vacuolado y dislocado), problemas letales al nacimiento (ausencia del ojo, nariz y bulbo olfatorio e inadecuada migración neuronal) y crecimiento retardado (microtia y coloboma).

Durante la retinogénesis en el ratón, Pax6 es expresado en todas las células progenitoras de la retina, su deficiencia lleva a una reducción en la actividad mitótica que conducirá a un retraso en la diferenciación de las neuronas, mientras que en su ausencia la diferenciación de células progenitoras se restringe solo a la generación de células amacrinas (Strachan y Read, 1994; Quinn JC *et al.*, 1996, Ashery-Padan R *et al.*, 2000, Marquardt *et al.*, 2001; Hever *et al.*, 2006; Osumi *et al.*, 2008).

Recientemente, Thummel y colaboradores (2010) encontraron en pez cebra dos genes parálogos de Pax6 (Pax6a, Pax6b) los cuales codifican para proteínas funcionales que regulan la formación y diferenciación de la retina y el cristalino. Ellos señalan que el “Knockdown” de Pax6b inhibe la subsecuente división de los progenitores derivados de la glía de Müller de la CNI. En contraste, Pax6a permite su división temprana pero evita la tardía. Esta reducción de las células progenitoras en la CNI tiene como consecuencia una pérdida de conos regenerados pero no de bastones, sugiriendo que los progenitores derivados de la CNI fueron requeridos para la regeneración de conos.

Por su parte Doh y colaboradores (2010) observaron el patrón de expresión de Pax6 durante desarrollo del embrión de pollo. Un número pequeño de células progenitoras fue detectado por inmunohistoquímica en la CNBI durante la etapa

E4. Posteriormente, el incremento de Pax6 se encontró en la CNI en la E8. Finalmente en etapas tardías del desarrollo (E10), células ganglionares y amacrinas fueron marcadas mientras que algunas células horizontales presentaron una marca tenue después de la E14.

3.2 Nestina

Otro gen importante durante el desarrollo del ojo es Nestina, cuya proteína es característica de los filamentos intermedios tipo IV del citoesqueleto y fue identificada como un marcador de células progenitoras mitóticamente activas del sistema nervioso central (SNC) y del sistema nervioso periférico (SNP) que se diferenciarán a neuronas y glía; también se ha encontrado en precursores del músculo esquelético y cardíaco así como en epidermis, corazón, páncreas riñón y pulmón. Se ha caracterizado como un marcador de células troncales y progenitoras neurales; su expresión está reportada en peces, pollos, rata, ratón y humano en donde participa activamente en el desarrollo del cerebro y del ojo. Dentro de las anomalías encontradas por una inadecuada expresión de esta proteína encontramos: microcefalia (tamaño reducido del cerebro), hidrocefalia y microftalmia (Wiese *et al.*, 2004; Michalczyk y Ziman, 2005; Mahler y Driever, 2007; Gilyarov, 2008; Chen *et al.*, 2010).

En los últimos años varios autores han enfocado sus estudios en caracterizar la presencia de esta proteína durante el desarrollo del ojo y posterior a una lesión ocular. Mahler y Driever (2007) identificaron en el estado embrionario, larval y juvenil del pez cebra una extensa expresión dentro del SNC y SNP. Su distribución fue observada en la zona ventricular, telencéfalo y diencefalo en el SNC y en el par craneal VII, VIII y X del SNP. Por su parte, Chen y colaboradores (2010) observaron que al inocular el morfolino de Nestina en ojos del pez cebra, de 48 horas post-fertilización, la retina presentaba una pobre organización y defectos en el desarrollo de la lente en ambos ojos como consecuencia de la

reducción en las células progenitoras de la retina y células progenitoras epiteliales debido al incremento de apoptosis.

En lo referente a la presencia de nestina después de una lesión, Wohl y colaboradores (2009) encontraron en ratones adultos sometidos a una axotomía del nervio óptico, un aumento en el número de células marcadas con BrdU cinco días después de la lesión. Además, observaron que estas células estaban asociadas con la expresión de Nestina y GFAP (por sus siglas en inglés: glial fibrillary acidic protein) en la CCG, CFN y cuerpo ciliar (pars plana y plicata), lo que sugiere que células troncales y progenitoras neurales así como células de la glía, una vez que detectan el daño, comienzan a proliferar con la finalidad de mantener la integridad de la retina.

3.3 c-kit

c-kit es un glicoproteína transmembranal que contiene un dominio tirosinacinasas intracelular. Junto con su ligando stem cell factor (SCF), c-kit interactúan para el mantenimiento de células troncales en la gametogénesis, hematopoyesis y melanogénesis, mientras que en el SNC podrían participar en la neurogénesis. La disminución en la expresión de este gen causa defectos que incluyen esterilidad, anemia y despigmentación, mientras que su ausencia en el ratón es fatal durante la primera semana postnatal causándole la muerte. El piebaldismo se presenta a causa de la mutación de c-kit, los ratones afectados nacen con zonas despigmentadas en cabeza y tronco, debido a la ausencia de melanocitos (Tosaki *et al.*, 2006; Keshet *et al.*, 1991). También se ha observado que en el sistema nervioso, interviene en el establecimiento de conexiones neurales promoviendo la sobrevivencia neuronal y específicamente en el SNP c-kit está implicado en la sobrevivencia, migración, proliferación y diferenciación de células progenitoras de la cresta neural. En el ojo del ratón, su expresión se ha reportado en células progenitoras del epitelio pigmentado de la retina y del cuerpo ciliar, además en

células amacrinas y ganglionares de la retina en roedores adultos (Hirata *et al.*, 1993; Das *et al.*, 2004, Koso *et al.*, 2007).

Koso y colaboradores (2007) examinaron la expresión de c-kit en la retina del ratón en etapas embrionarias y postnatales, por inmunohistoquímica encontraron que la intensidad de la señal fue mayor en la región central y declinó en la periférica. Al analizar la etapa embrionaria (E14), c-kit fue expresado aproximadamente en el 40% de las células de la retina neural, mientras que, después del nacimiento disminuyó drásticamente hasta un 5% en P7 y solo un 2% fue observado en células amacrinas y ganglionares de animales adultos.

4. EXPRESIÓN GENÉTICA DE CÉLULAS GANGLIONARES

Una vez que las células ganglionares comienzan a diferenciarse, la expresión genética cambia. Jagatha y colaboradores (2009) encontraron que ciertos genes están íntimamente relacionados con la vía de señalización Shh y algunos factores de crecimiento como FGF2, interactúan en la diferenciación ganglionar. Dentro de estos genes encontramos a BDNF, Thy1 y BRN3A.

4.1 BDNF

BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), es una neurotrofina crucial para la plasticidad neuronal. Tiene varios papeles en la sobrevivencia celular, apoptosis, expresión de genes, en el crecimiento de neuritas, axones y morfología celular. Acoplado al receptor TrkB promueven la sobrevivencia ganglionar y la regeneración axonal. Diferentes autores han reportado la expresión de BDNF y TrkB en la CCG y CNl de diferentes especies de vertebrados, desde peces hasta monos, además se ha observado su expresión en células amacrinas al igual que una colocalización de en conos y células ganglionares de ratones. Caminos *et al.*,

(1999) observó la regeneración del nervio dañado en peces después de 30 días posteriores a una lesión. La expresión de BDNF fue observada por inmunohistoquímica en la CNI y CCG, en los cuerpos celulares y en procesos de la glía de Müller. Por su parte, Weber y Harman (2008), mediante el colorante amarillo de Lucifer, compararon la morfología de las células ganglionares α y β de ojos de gatos que recibieron tratamiento con BDNF posterior a una lesión del nervio óptico; encontraron que los cambios sufridos en las dendritas (longitud, complejidad y área de superficie) y el soma (reducción del tamaño) de células no tratadas son mayores en las células α y β ; sin embargo, ambas células preservan características morfológicas similares a las observadas en células normales en una dosis de 90 μ L de BDNF. En recientes estudios realizados por Germanà y colaboradores (2010), encontraron un patrón de expresión similar de BDNF durante el desarrollo de la retina del pez cebra. Por inmunohistoquímica observaron una alta reactividad en la CNE, CPE y CPI, sugiriendo que los fotorreceptores en la CNE expresan BDNF, la confirmación de esta neurotrofina fue realizada mediante la expresión de ARNm durante el desarrollo larval (10-50 días post-fertilización) y en animales adultos.

4.2 Brn3a

Brn3 es un factor de transcripción que regula el desarrollo, morfología y función de las células ganglionares. Es expresado en el núcleo de las células que han finalizado su migración y comienzan a diferenciarse en células ganglionares. Brn3a, Brn3b y Brn3c son miembros altamente homólogos de la subfamilia de clase IV del dominio POU; expresado en células del ratón, conejo y mono. Después de completar su mitosis terminal, el 80% de las células precursoras de las células ganglionares expresan Brn3a y Brn3b. En ausencia de Brn3b se ha observado que células que se diferencian a ganglionares sufren una diferenciación a células amacrinas y horizontales. Estas células mueren prenatalmente o pueden

tener trayectorias aberrantes de los axones intra o extraoculares y en la edad adulta el número de células ganglionares pueden reducirse a un 30%, incluyendo aquellas células que expresan Brn3a o Brn3c. Ratones Brn3c^{-/-} no muestran defectos en la estructura de la retina. Sin embargo, ratones Brn3a^{-/-} mueren al nacimiento debido a defectos en la asta dorsal y neuronas trigeminas pero no demuestran defectos en la estructura de la retina (Badea *et al.*, 2009). En un estudio realizado por Doh (2010) observa la expresión de Brn3a durante el desarrollo del embrión de pollo, él observa que en la etapa embrionaria E6 la expresión es detectada desde en la CCG y conforme avanzó el desarrollo el marcador fue organizado en 3-4 capas celulares y su expresión aumentó en número e intensidad (E8 –E10).

4.3 Thy1

Thy1 es un gen perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Algunos miembros de la familia son expresados en el sistema inmune y nervioso central como Thy1, OX2 y CD4. En mamíferos se localiza sobre la superficie de todas las neuronas, abarcando a las células ganglionares de la retina y eliminando su expresión en las neuronas del bulbo olfatorio. La expresión de este marcador sobre las células ganglionares delimita perfectamente sobre sus dendritas en la CPI y sus axones sobre CFN, además descarta a las células amacrinas desplazadas localizadas también en la CCG. Se desconoce realmente cuál es su función, sin embargo podría estar participando en la reorganización e interacción celular durante la morfogénesis; además su disminución está relacionado con la reducción de células ganglionares, sugiriendo que interviene en la programación apoptótica de las células ganglionares (Vidal *et al.*, 1990; Raymond *et al.*, 2008).

II. JUSTIFICACIÓN

El glaucoma es un grupo de enfermedades oculares caracterizadas por un daño progresivo al nervio óptico debido a una muerte de células ganglionares, así como la pérdida de sus axones y como consecuencia la disminución visual (Ofri y Narfström, 2007; Gelatt, 2007).

El perro representa un modelo natural excelente para estudiar diversos desórdenes degenerativos de la retina por las similitudes que presenta con la retina humana con respecto a la biología de las células ganglionares. Debido a la incidencia del glaucoma en perros, la importancia clínica de encontrar células progenitoras llevará a plantear una terapia para la regeneración de la retina. Además, aún hay mucho que comprender sobre los mecanismos que regulan y/o llevan a la diferenciación de los tipos de neuronas que conforman la retina y de los aproximadamente 60 subtipos identificados en la retina de los mamíferos (Masland, 2004).

En el grupo de la Dra. Andrea Carvalho de la Facultad de Veterinaria en la Universidad Autónoma de Barcelona, se han aislado células progenitoras de la retina del perro adulto con las mismas características que las localizadas en el humano (comunicación personal), sugiriendo que la retina de humano y perro podrían presentar cierta capacidad regenerativa como en el caso de los anfibios y peces. No obstante, aún quedan muchas dudas en relación a la biología de las células progenitoras de la retina, lo que hace necesaria la investigación del desarrollo de la retina, con énfasis en la identificación de estas células y los factores tanto intrínsecos como extrínsecos que influyen en la diferenciación celular. De acuerdo con lo anterior la caracterización de células progenitoras durante el desarrollo de la retina del perro abrirá camino para futuros estudios enfocados en la regeneración neuronal.

III. HIPÓTESIS

Durante la retinogénesis canina, son expresados marcadores específicos de células progenitoras en la etapa embrionaria, fetal y neonatal.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Buscar la presencia de células progenitoras durante la retinogénesis en etapas pre-natal y post-natal del desarrollo canino.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Correlacionar el grado del desarrollo de la retina con la etapa del desarrollo canino empleando microscopía de luz.
2. Identificar por inmunohistoquímica la presencia de células progenitoras y células en proliferación de la retina canina.
3. Identificar por inmunohistoquímica el comienzo de la diferenciación celular en la retina canina.
4. Detectar la expresión de genes específicos de células progenitoras y ganglionares durante la retinogénesis por RT-PCR en la retina canina.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Durante las campañas de esterilización impartidas en el Centro de Control Canino de Ecatepec, Estado de México, así como en el departamento de enseñanza quirúrgica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma México. Se recolectaron nueve úteros de perras gestantes los cuales fueron colocados en solución salina fisiológica y transportados al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM para su estudio en el laboratorio. Todos los animales fueron sacrificados de acuerdo a las medidas éticas señaladas por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, que determina las “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio”. Posterior al sacrificio, se le realizó la enucleación basándonos en la metodología citada por Fossum y colaboradores (2004); se inició con una cantotomía lateral, posteriormente se seccionó hacia la región lateral de la unión de los márgenes palpebrales superiores e inferiores. Se realizó una incisión perilímbica de 360°, a continuación la conjuntiva fue separada; los cuatro músculos rectos fueron liberados y seccionados sobre la esclerótica; por último el nervio óptico fue seccionado. El número total de ojos incluidos en este estudio fue de 102; 41 fueron procesados para el análisis morfológico (23 incluidos en parafina y 18 en resina epóxica); 34 se procesaron para el análisis de inmunohistoquímica y 27 para la técnica de RT-PCR.

2. ESTUDIO HISTOLÓGICO

2.1 PARAFINA

Las muestras fueron fijadas en paraformaldehído al 4% (PFA 4%) durante 24 hrs a 4°C, una vez transcurrido el tiempo las muestras fueron deshidratadas utilizando cambios de una hora en diferentes concentraciones de alcohol (80%, 90%, 96%, 100%) y xilol. Posteriormente el tejido fue colocado en dos baños de parafina fundida (paraplast®) por una hora en cada baño y fueron incluidos dentro de las escuadras de Leukart. Se realizaron cortes de 15 µm en el micrótopo y fueron teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina. Los cortes obtenidos se desparafinaron con xilol y fueron rehidratados con alcohol al 100%, 96%, 80%, 70% y 50%. Posteriormente los cortes fueron colocados en agua destilada, teñidos con hematoxilina y lavados con agua corriente y agua destilada. Después, fueron colocados en alcohol al 70% y teñidos con eosina. Por último fueron deshidratados en alcohol al 70%, 80%, 90%, 96%, 100% y aclarados con xilol. Se montaron utilizando Cytoseal® para su observación al microscopio de campo claro.

2.2 RESINA DE EPON

Para el análisis del tejido en microscopía de alta resolución, los ojos fueron fijados en una solución de Karnovsky (Karnovsky, 1965) libre de calcio con pH 7.4 durante 12 hrs, transcurrido el tiempo fueron lavados en buffer de cacodilato de sodio 0.1 M durante 12 hrs. Posteriormente fueron post-fijados con 1% de tetróxido de osmio (OsO₄) al 1% en buffer de Zetterqvist (Zetterqvist, 1956) por 1 h y lavados con agua destilada. A continuación fueron deshidratados con una serie de alcoholes graduales (70%, 80%, 90%, 95% y 100%). Por último fueron incluidos en resina Epón 812. Se obtuvieron cortes de 1 µm en el ultramicrotomo, los cuales fueron contrastados con azul de toluidina. Los cortes fueron observados en el microscopio de campo claro y en el electrónico de transmisión.

3. ANALISIS INMUNOHISTOQUÍMICO

Cada ojo fue incubado en una solución amortiguadora de sacarosa (30% en buffer de fosfatos) durante toda la noche. Se incluyeron en Tissue-tek (OCT 4583 compound), se congelaron a -70°C y se crioseccionaron a $15\ \mu\text{m}$ de espesor. Los cortes fueron tratados con tritón X-100 al 1% en buffer de fosfatos (PBS) con pH 7.1 por 10 min, se lavaron en PBS y se incubaron en una solución de albúmina al 1% en PBS durante 2 hrs. Para este estudio se utilizaron anticuerpos específicos de células progenitoras, ganglionares y células en proliferación (Tabla 1).

Los cortes fueron incubados con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C . Posteriormente se lavaron con PBS y las secciones fueron nuevamente tratadas con la solución de albúmina al 1% en PBS durante 15 min, a continuación fueron incubados con anticuerpos secundarios durante una hora; los anticuerpos secundarios empleados fueron: Goat anti-rabbit IgG TRITC-conjugate (1:100; Zymed 81-6114), Goat anti-rabbit IgG Cy[™]5-conjugate (1:100; Zymed 81-6116), Goat anti-rabbit IgG FITC-conjugate (1:100; Zymed 81-6111), Rabbit anti-mouse TRITC-conjugate IgG (1:100; Zymed 81-6714), Rabbit anti-mouse IgG FITC-conjugate (1:100; Zymed 61-6511). Finalmente las muestras fueron lavadas con PBS; en el caso de la inmunohistoquímica doble o triple, posterior a este último lavado las muestras fueron post-fijadas con PFA 4%, lavadas con PBS y a continuación fue repetido todo el proceso de la inmunohistoquímica.

Como controles positivos se emplearon muestras de ojo de ratón CD1 de 1dpn para los marcadores de células progenitoras y ojos de animales adultos para los marcadores de células ganglionares.

Los cortes fueron montados en un medio hidrófilo permanente Paramount (Dako, S3025) para su observación al microscopio confocal (Zeiss LSM 5) equipado con láser de Ar, HeNe 543nm, HeNe 633nm.

TIPO CELULAR	ANTÍGENO	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
PROGENITORA	Pax6	1:250	Abcam ab5790
	Nestina	1:250	Abcam ab5968
	C-kit	1:200	Santa Cruz SC-168
GANGLIONAR	BDNF	1:250	Santa Cruz SC-546
	Thy1	1:200	Abcam ab65193
	Brn3a	1:50	Abcam ab23579
PROLIFERACIÓN	ρ H3	1:200	Upstate 06570

Tabla 1. Anticuerpos primarios empleados, con el tipo celular que marca, el nombre comercial, la dilución empleada y su casa comercial.

4. AISLAMIENTO DE ARN TOTAL

El globo ocular fue lavado con PBS y transferido a una caja de petri con agua Dietil pirocarbonato (DEPC). Con una navaja de bisturí se realizó una incisión perilímbica de 360°, se retiró el iris y cristalino. Se desprendió el cuerpo ciliar y el epitelio pigmentado de la retina neural por último se realizó un corte a la altura del nervio óptico con la finalidad de obtener solo la parte neurosensorial de la retina, inmediatamente fue colocada en tubos eppendorf con 100 μ l de TRIZOL, se congeló y almacenó a -70°C. Posteriormente, el tejido fue macerado a -70°C, se le agregaron 700 μ l de TRIZOL y se incubó por 15-20 min a una temperatura de entre 10-20°C. A continuación se agregó 140 μ l de cloroformo y se incubó por 15 min a 10-20°C, pasado este tiempo, se centrifugó a 14000 rpm durante 30 min a 4°C y se transfirió la fase acuosa a un tubo eppendorf tratado con agua DEPC.

Para precipitar el ARN se agregó isopropanol y se incubó durante toda la noche a 4°C; transcurrido este tiempo la muestra fue centrifugada a 14000 rpm durante 30 min a 4°C, se extrajo el sobrenadante y la pastilla obtenida fue lavada con etanol al 80% y centrifugada a 14000 rpm a 4°C durante 15 min. La pastilla obtenida se dejó secar a temperatura ambiente y el ARN total fue resuspendido en 10 µl de agua libre de RNAsas. La concentración del ARN total se cuantificó en el espectrofotómetro y se determinó su integridad en un gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE 1X en agua DEPC.

5. DETECCIÓN DEL GEN PAX6 Y BDNF POR RT-PCR

Para evitar la amplificación de ADN genómico, 1 µg de ARN total se trató con 1 µl (1U/ µl) de DNAsa I (Deoxyribonucleasa I, Invitrogen), 1 µl de Buffer de reacción de DNAsa I 10X y fue llevada a un volumen final de 10 µl con agua sin RNAsas.

La muestra se incubó por 10 min a temperatura ambiente, se adicionó 1 µl de EDTA (25 mM) y se incubó a 65°C durante 10 min para inactivar la acción de la DNAsa I.

Se empleó el Kit SuperScript™ One-Step RT-PCR (Invitrogen). Se utilizó una reacción conformada por lo siguientes reactivos: Buffer 2X mix (amortiguador que contiene 0.4 mM de cada dNTP, 2.4 mM MgSO₄), SuperScript™ II Transcriptasa reversa/Platinum® Taq DNA polimerasa, 300 ng de ARN total previamente tratado con DNAsa I y 10 µM de cada oligonucleótido:

Pax6: 5' TTCTGCAGACCCATGCAGATGCAA 3'

5'CTTCAGCTGAAGTCGCATTTGAGC 3'

BDNF: 5' AATCCCATGGGTTACACGAA 3'

5'GCCAGCCAATTCTCTTTTTG 3'

La reacción fue llevada a un volumen final de 20 µl con agua libre de RNAsas. β-actina fue usado como control positivo. Las muestras fueron colocadas en el termociclador programado bajo las siguientes condiciones:

Pax6

1. 50°C durante 30 min
2. 94°C durante 5 min
3.

94°C por 40 s	} 40 ciclos
58°C por 60 s	
72°C por 40 s	
4. 72°C por 5 min

BDNF

1. 50°C durante 30 min
2. 94°C durante 5 min
3.

94°C por 1 min	} 40 ciclos
51°C por 1 min	
72°C por 1 min	
4. 72°C por 5 min

Los productos de la PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1%, empleando un marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Molecular Weight Marker XIV. Roche). Las imágenes fueron analizadas empleando el software Quantity One 1-D (Bio-Rad) y los datos arrojados fueron analizados empleando el programa estadístico SPSS 17.0.

VI. RESULTADOS

1. DETERMINACIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO

Los organismos se clasificaron en diferentes etapas del desarrollo embrionario de acuerdo a los criterios descritos por Evans (1993). La edad de cada etapa fue corroborado por medio del análisis histológico de la retina empleando microscopia en campo claro (Figura 3 y 4) y electrónica de transmisión (Figura 4), y las estructuras fueron comparadas con los estudios realizados por Aguirre (1972), Spira (1973), Cook (1995) y Gelatt (2007). Las muestras se clasificaron como:

- A) Etapa embrionaria (embriones de 25 días de gestación [ddg]).
- B) Etapa fetal (fetos entre 35 y 60 ddg).
- C) Etapa neonatal (neonatos de un día post-natal [dpn]).

2. ETAPA EMBRIONARIA (25 días de gestación)

2.1 MORFOGÉNESIS

La etapa embrionaria fue corroborada con el estudio morfológico de cortes de los ojos procesados tanto en parafina (Figura 3 y 5) como epón (figura 4) y teñidos con hematoxilina-eosina y azul de toluidina respectivamente. Las observaciones a nivel de microscopia de campo claro mostraron estructuras morfológicas correspondientes a embriones de 25 días de gestación, en estos cortes se observó el cristalino con la presencia de fibras primarias y completamente separado del ectodermo superficial; en la parte posterior del ojo se localizó la retina constituida por una CNB que a su vez presenta dos zonas: una

marginal interna (anuclear) y otra germinativa externa (nuclear) (Figura 3a-h, 4a y b, 5). El núcleo de las células de la CNB abarca la mayoría del cuerpo celular y presenta una forma oval, su cromatina se observa homogénea y dispersa. El EPR está formado por varias hileras de células con pigmento melánico localizado en el extremo apical. Algunas células se encontraban en profase (2) y solo una se observó en metafase (1) (Figura 4c y d).

2.2 IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS Y EN PROLIFERACIÓN

En la etapa embrionaria se demostró la expresión de c-kit, Nestina y Pax6 localizado en el cristalino y en la CNB. La expresión de c-kit (Figura 6d, e y j) y Pax6 (Figura 6e, h y k) fue muy marcada en el núcleo de las células. Por su parte Nestina (Figura 6f, i, l), se observó en los filamentos de las células progenitoras.

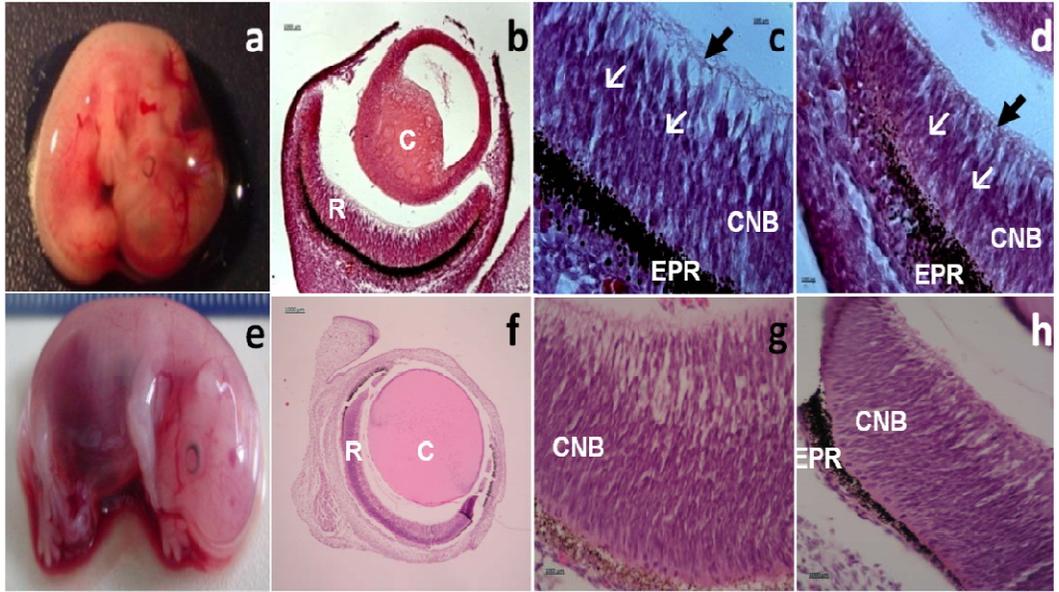
La actividad proliferativa de las células se conformó por la presencia de la proteína Fosfohistona H3 ($pH3$). De esta manera, se identificó una mayor expresión de $pH3$ en la zona proliferativa, tanto en la región central como en la periférica de la retina. También se observaron algunas células proliferando localizadas en la capa marginal de la CNB. Además algunas colocalizan con células positivas a los marcadores Nestina (Figura 7a-i) y c-kit (Figura 7d-f).

2.3 IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS GANGLIONARES

En esta etapa del desarrollo embrionario no fue evidente la expresión de los marcadores de células ganglionares BDNF, Thy1 y Brn3a.

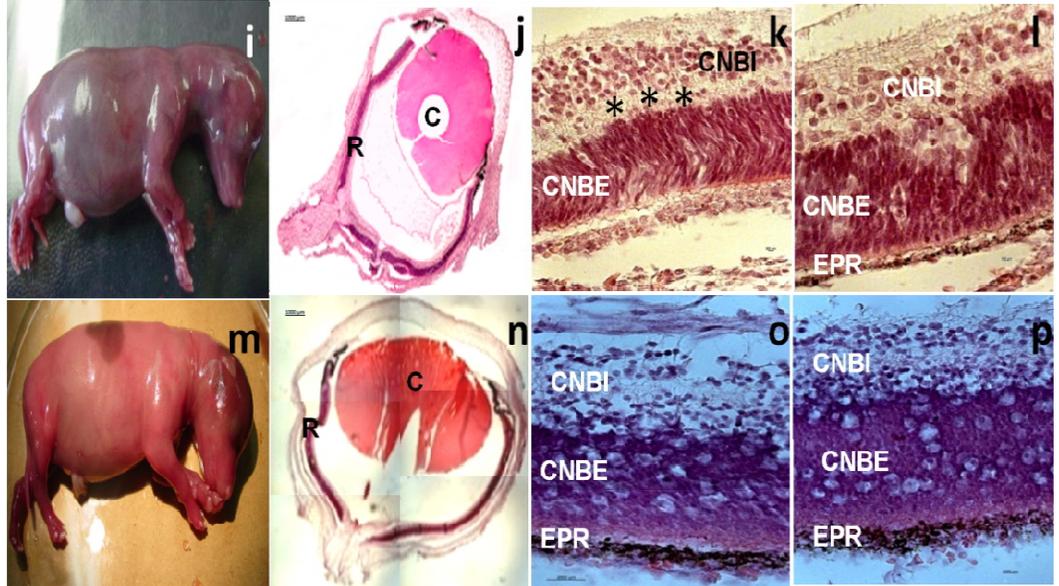
A) ETAPA EMBRIONARIA

25 dddg



B) ETAPA FETAL

35-60 dddg



C) ETAPA NEONATAL

1dpn

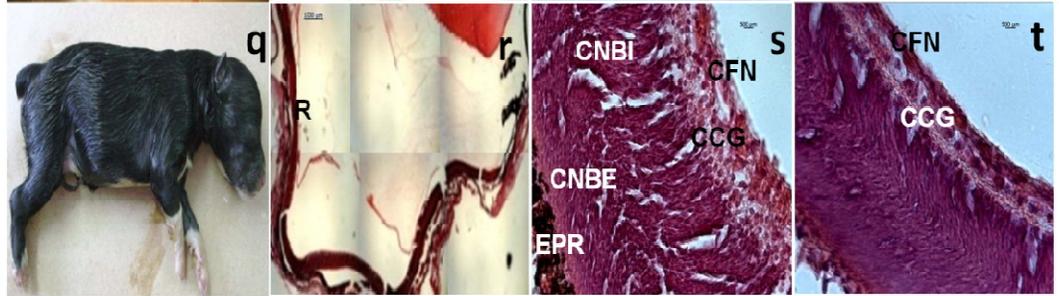
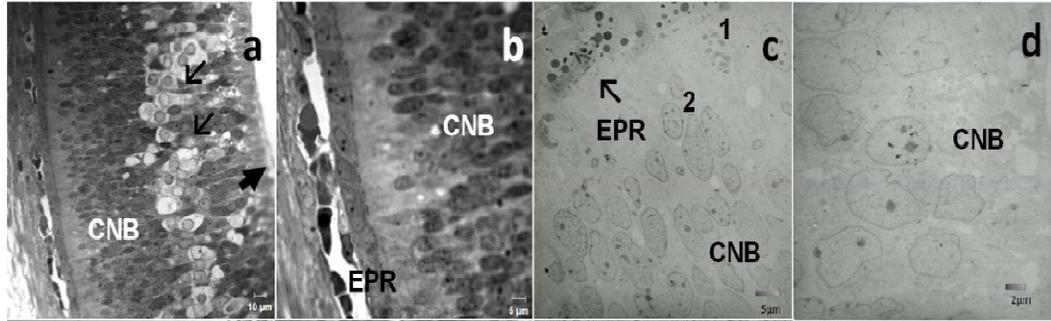
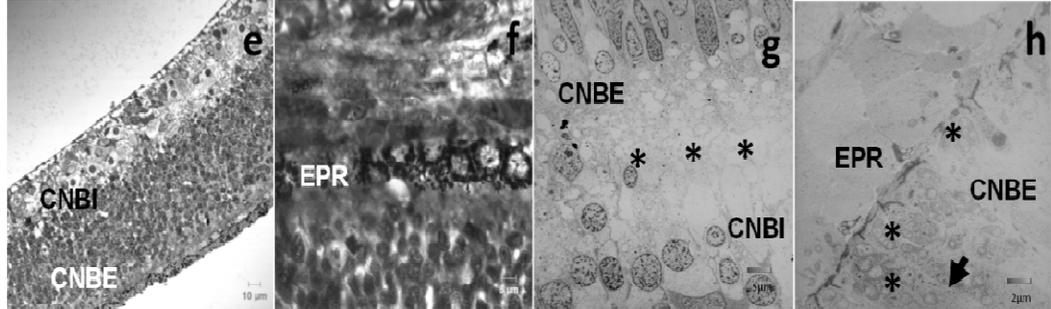


Figura 3. Desarrollo de la retina en etapas pre-natal y post-natal. A) Etapa embrionaria; a y e) embriones de 25 días de gestación (ddg); b y f) corte transversal del ojo, donde se observa la retina (R) y el cristalino (C), 10X; c y g) región central de la retina donde se aprecia el epitelio pigmentado de la retina (EPR) y la capa neuroblástica (CNB) con su zona marginal interna (flecha negra) y zona germinativa externa (flecha blanca) 40X; d y h) región periférica de la retina exhibe el EPR y la CNB con su zona germinativa externa (flecha blanca) y zona marginal interna (flecha negra) 40X. B) Etapa fetal; i, m) fetos entre los 35 y 65 ddg; j y n) corte transversal del ojo, donde se observa la retina (R) y el cristalino (C), 10X; k y o) en esta etapa, la células de la CNB de la región central de la retina migran y forman la capa neuroblástica externa (CNBE) y la capa neuroblástica interna (CNBI) separadas entre sí por el espacio transitorio de Chievitz (asterisco), 40X; l y p) la retina periférica, también muestra el EPR, CNBE y CNBI. C) Etapa neonatal; q) neonato de 1 día postnatal (dpn), r) corte transversal del ojo, donde se observa la retina (R), 10X; s) retina central, algunas células de la CNBI se diferencian a células ganglionares, formando la capa de células ganglionares (CCG) mientras que sus axones se dirigen al cerebro y constituyen la capa de fibras nerviosas (CFN), 40X; t) retina periférica donde se aprecia la CNBE, CCG y CFN, 40X.

A) ETAPA EMBRIONARIA
25 dddg



B) ETAPA FETAL
35-60 dddg



C) ETAPA NEONATAL
1dpn

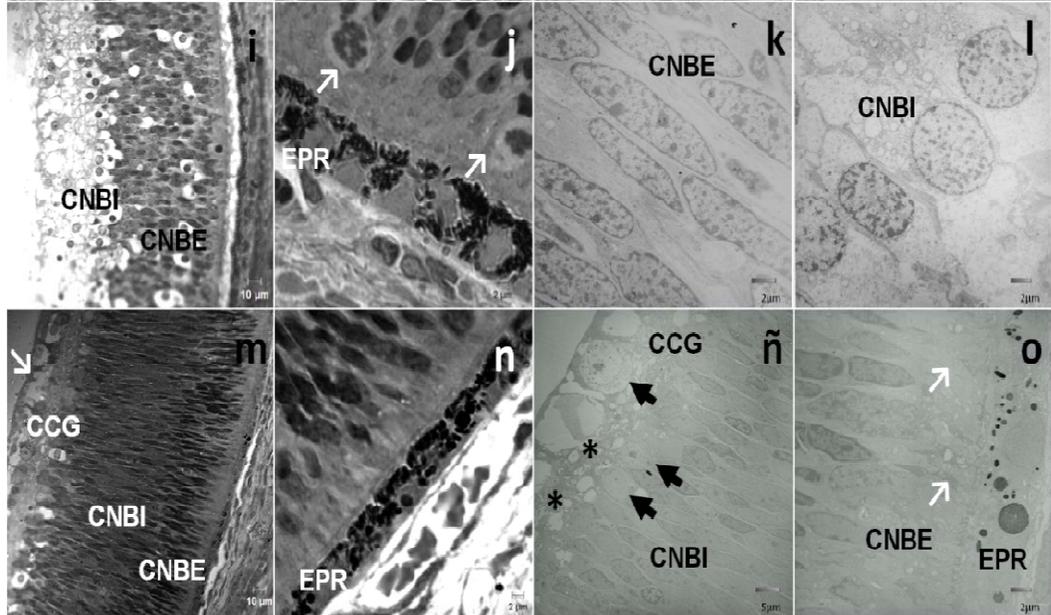


Figura 4. Fotomicrografías de la retina en la etapa pre-natal y post-natal. A) Etapa embrionaria, embriones de 25 días de gestación (ddg); a) en esta etapa se observa a la capa neuroblástica (CNB) con su zona marginal interna (flecha gruesa) y zona germinativa externa (flechas delgadas) 10X; b) aumento a 100X del epitelio pigmentado de la retina (EPR) y la CNB; c) las células del EPR presentan en su extremo apical el pigmento melánico (flecha), el núcleo de las células de la CNB se observó de forma oval, algunas células se identificaron en profase (2) y en metafase (1), X1500; d) células de la CNB, X2500. B) Etapa fetal, fetos entre 35 a 60 ddg; e, i) las células de la CNB han migrado y forman dos capas, neuroblástica externa (CNBE) e interna (CNBI), 10X; f y j) células del EPR se observan con un aumento del pigmento melánico y algunos precursores de fotorreceptores comienzan su diferenciación (flechas) 100X; g) los núcleos de las células de la CNBE presentan una forma oval en contraste los de la CNBI el núcleo es esférico, ambas capas se encuentran separadas por el espacio transitorio de Chievitz (asteriscos) X1500; h) células de la CNBE se observan abundantes mitocondrias (asteriscos) cerca de EPR y sus procesos citoplasmáticos (flecha), X8000; k) núcleos de la CNBE de forma oval con la cromatina homogénea y dispersa, X4000; l) núcleos de la CNBI de forma esférica con la cromatina homogénea y dispersa, X400; C) Etapa neonatal, neonatos de 1 día post-natal; m) se observa la CNBE, CNBI, cuyas células comienzan a diferenciarse y forman la capa de células ganglionares (CCG), mientras que sus axones la capa de fibras nerviosas (CFN), 10X; n) células de forma cuboidal con pigmento melánico en su interior, 100X; ñ) CCG donde se observan células ganglionares con un nucléolo prominente (flecha negra) y su axones (asterisco), X1500; o) prolongaciones citoplasmáticas de las células de la CNBE, células del EPR con el pigmento melánico en su citoplasma, X3000.

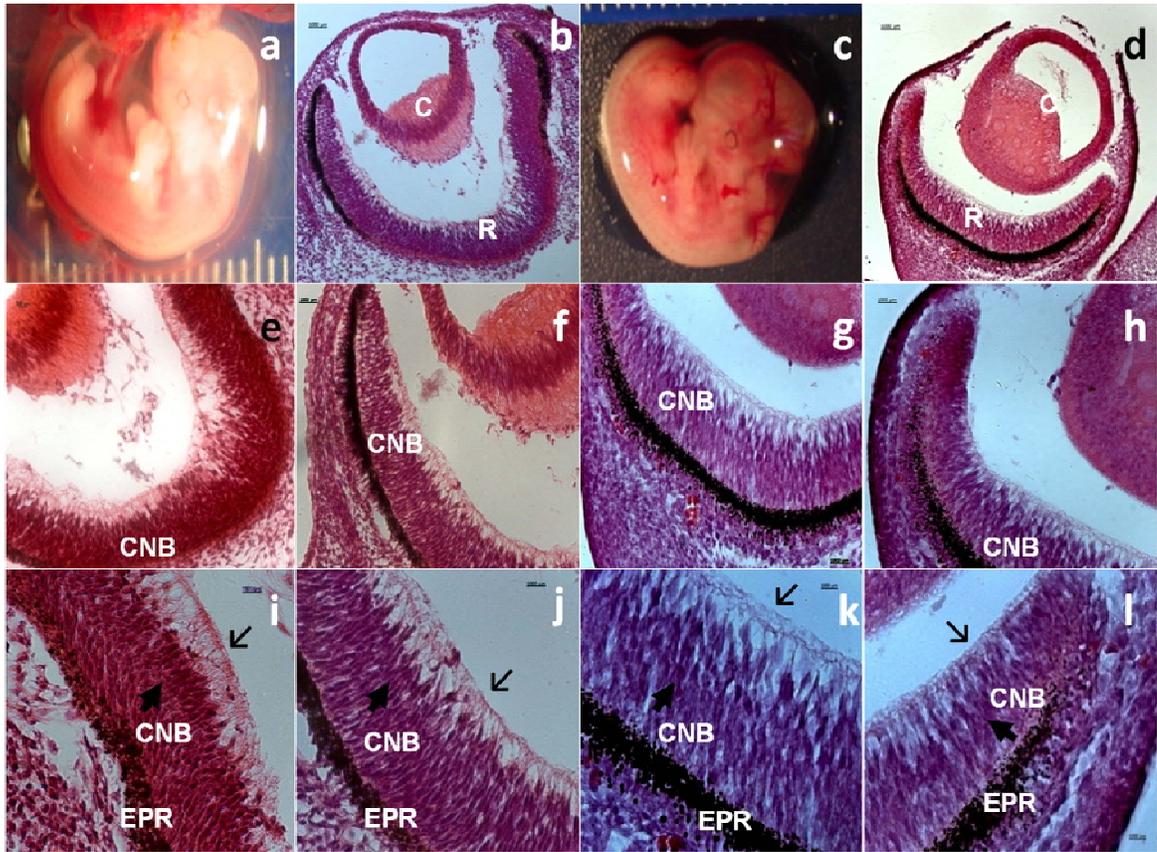


Figura 5. Morfología de la retina en la etapa embrionaria (25 días de gestación). a y c) embriones de 25 días de gestación; b y d) corte transversal del ojo, donde se observa la retina (R) y el cristalino (C), 10X; e y g) capa neuroblástica (CNB) en la región central de la retina, 20X; f y h) CNB en la región periférica de la retina, 20X; i, k) CNB en la región central de la retina, las flechas gruesas indican la zona germinativa externa y las flechas delgadas la zona marginal interna, 40X; j y l) CNB en la región periférica de la retina, las flechas gruesas muestran la zona germinativa externa y las flechas delgadas la zona marginal interna, 40X.

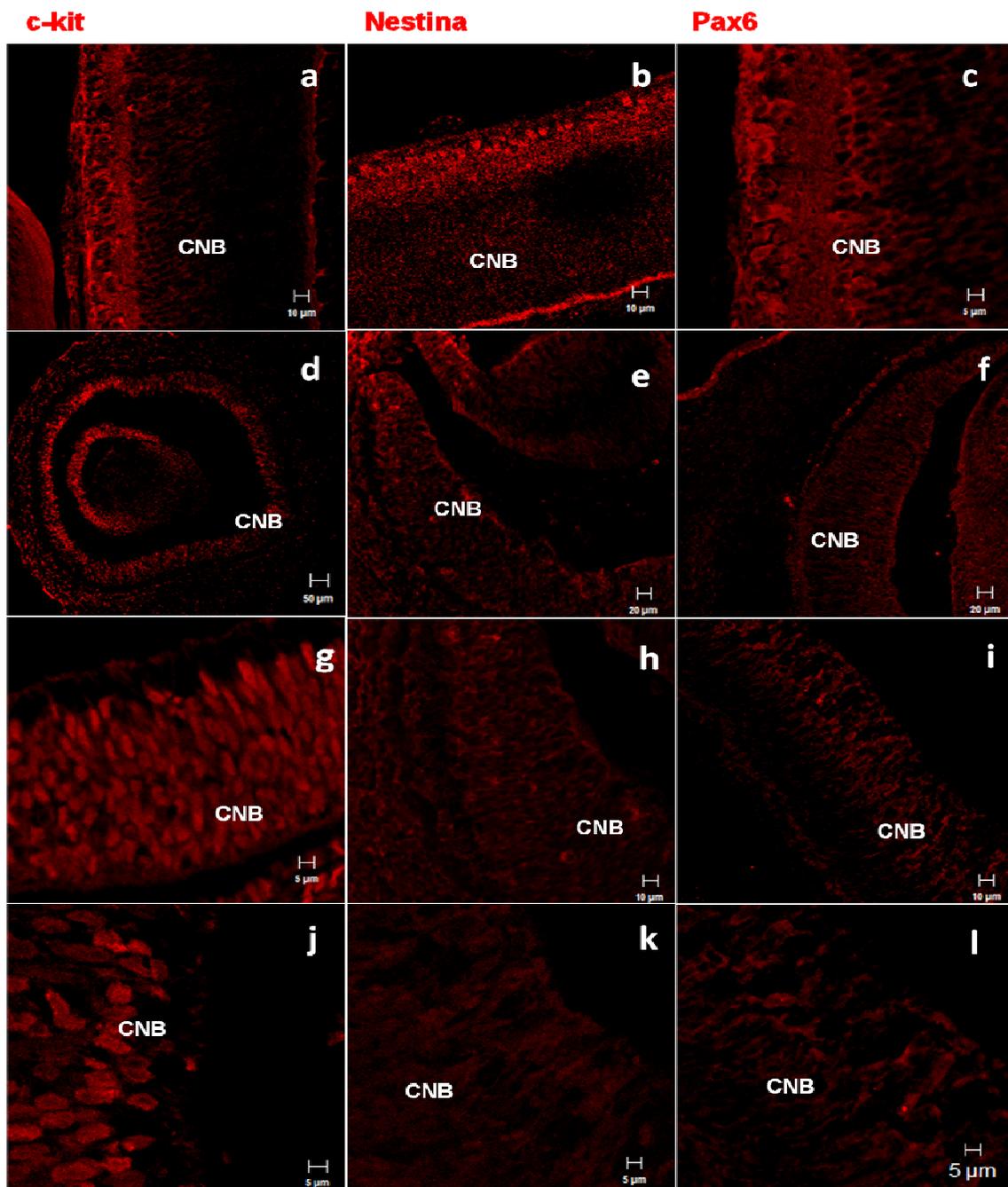


Figura 6. Expresión marcadores de células progenitoras durante la etapa embrionaria. Control positivo a) c-kit, 40X; b) Nestina, 40X; c) Pax6, 80X; d, g y j) células de la capa neuroblástica (CNB) marcadas con c-kit, 10X, 80X y 100X respectivamente; e, h y k) expresión de Nestina en la CNB, 20X, 40X y 40X respectivamente; f, i, l) células de la CNB marcadas con Pax6, 20X, 40X y 80X respectivamente.

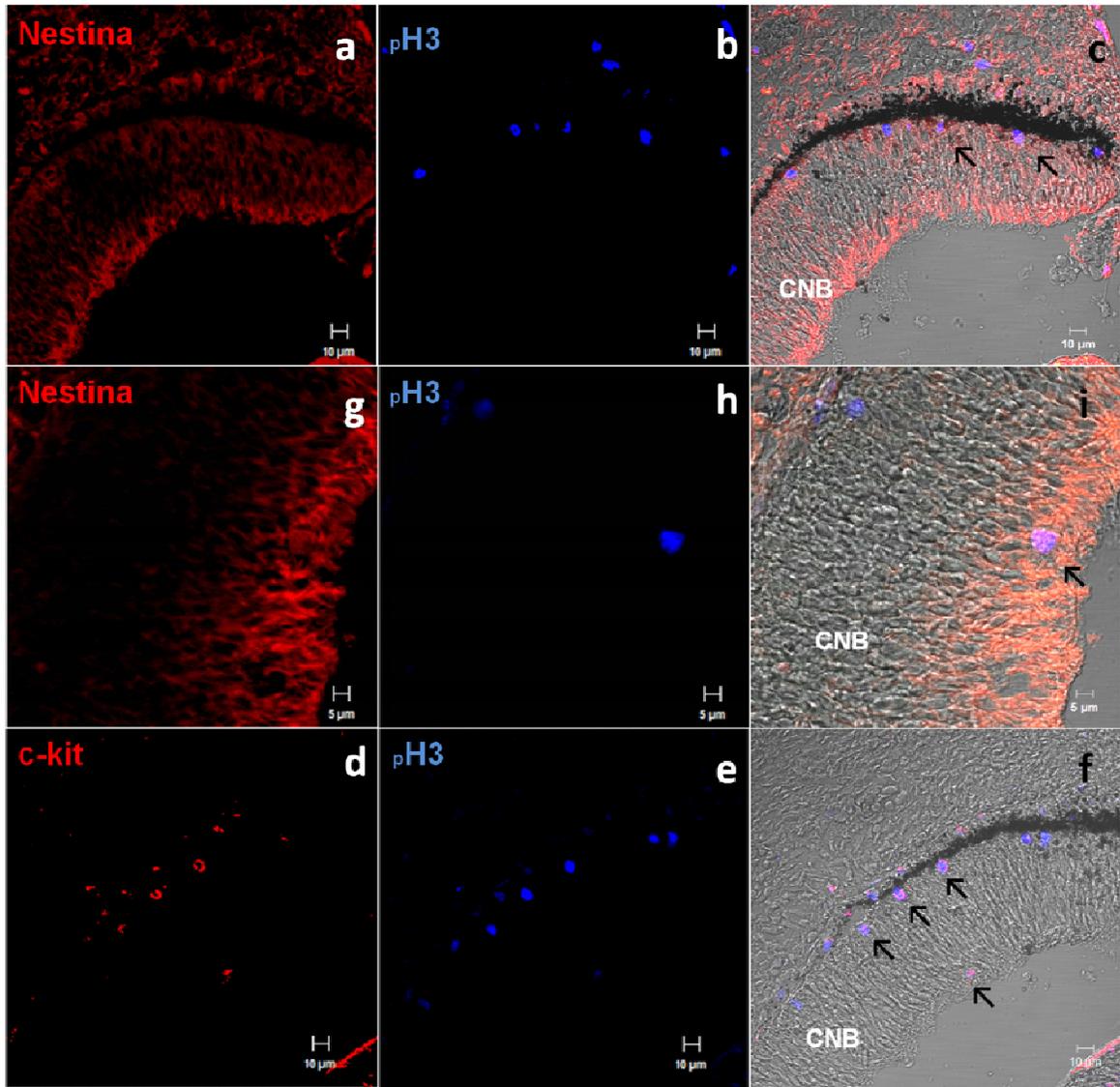


Figura 7. Células progenitoras proliferando durante retinogénesis canina en la etapa embrionaria. a y g) expresión de Nestina; b y h) células marcadas con $pH3$; c y j) células progenitoras en proliferación (flechas) marcadas con Nestina y $pH3$ en la capa neuroblástica (CNB), 40X, 80X; d) expresión de c-kit; e) expresión de $pH3$; f) colocalización de células progenitoras en proliferación (flechas) ubicadas en la CNB, marcadas con c-kit y $pH3$, 40X.

3. ETAPA FETAL (35-60 días de gestación)

3.1 MORFOGÉNESIS

En la etapa fetal, se clasificaron a los animales entre 35 y 60 días de gestación. Aunque presentaron un desarrollo evidente de diferentes estructuras que conforman la retina, no se logró delimitar con precisión el día exacto del desarrollo fetal. Sin embargo histológicamente se observó que las células de la zona nuclear migraron hacia la zona marginal interna, formando dos capas nucleadas, neuroblástica interna y externa. Ambas capas se encontraron separadas por el espacio transitorio de Chievitz que se identificó como un espacio libre de células. En la parte más interna de la CNBI algunas células ganglionares proyectaron sus axones para comenzar a formar el nervio óptico, formando la CFN. El EPR muestra varias capas de células y en algunas zonas se demostró la presencia de precursores de células fotorreceptoras rudimentarias (Figura 3i-p; 4e-f, i-j; 8). Por medio de microscopia electrónica se observó la presencia de cromatina homogénea y dispersa. En la CNBE las células mostraron núcleos en forma oval en contraste los ubicados en la CNBI tenían forma esférica. En el espacio transitorio de Chievitz no se observó la presencia celular y las prolongaciones citoplasmáticas de la CNBE presentaron un número notable de mitocondrias (figura 4g-h, k-l).

3.2 IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS Y EN PROLIFERACIÓN

Durante la etapa fetal las células fueron positivas a la proteína de los genes c-kit (Figura 9a, d y g), Nestina (Figura 9b, e y h) y Pax6 (Figura 9 c, f, i). La marca se localizó principalmente en la CNBI, sin embargo también se observó la presencia de señal en la CBNE aunque con menor intensidad. Células proliferando

marcadas con ρ H3 fueron situadas en la zona proliferativa, ubicada en la CNBE (Figura 10).

Para la identificación de células progenitoras con actividad proliferativa en etapas fetales, se realizaron dobles inmunofluorescencias empleando los marcadores Nestina y Pax6 combinados con el marcador de proliferación ρ H3. Apreciamos que algunas células positivas a Nestina (Figura 11a-f) se encontraban proliferando, su ubicación fue tanto en la zona proliferativa de la CNBE como en la CNBI. De la misma manera, células positivas a Pax6 con actividad proliferativa se encontraron en la CNBI (Figura 11g-i).

3.3 IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS GANGLIONARES

En etapas fetales se observó la diferenciación de células ganglionares, las cuales fueron evidentes con una marcada expresión de BDNF (Figura 12d, g y j) y Thy1 (Figura 12e, h y k). La presencia de esta señal se localizó en el citoplasma de células ganglionares ubicadas en la CCG. En contraste, sólo se identificó una ligera expresión de Brn3a en algunas células ganglionares (Figura 12f, i, l).

Dobles inmunofluorescencias empleando los marcadores BDNF y Thy1 combinados con ρ H3, evidenciaron que algunas células ganglionares se encuentran proliferando. Estas células se localizaron en la CNBI, donde ρ H3 se observó en el núcleo, mientras que BDNF (Figura 13a-c) y Thy1 (Figura 13d-f) se detectaron en el citoplasma de estas células, así como en el citoplasma de células no proliferando. La combinación de BDNF/Brn3a (Figura 13g-i) delimitó perfectamente a las células ganglionares localizadas en la CNBI, Brn3a se expresó en el núcleo, mientras que BDNF se situó en el citoplasma.

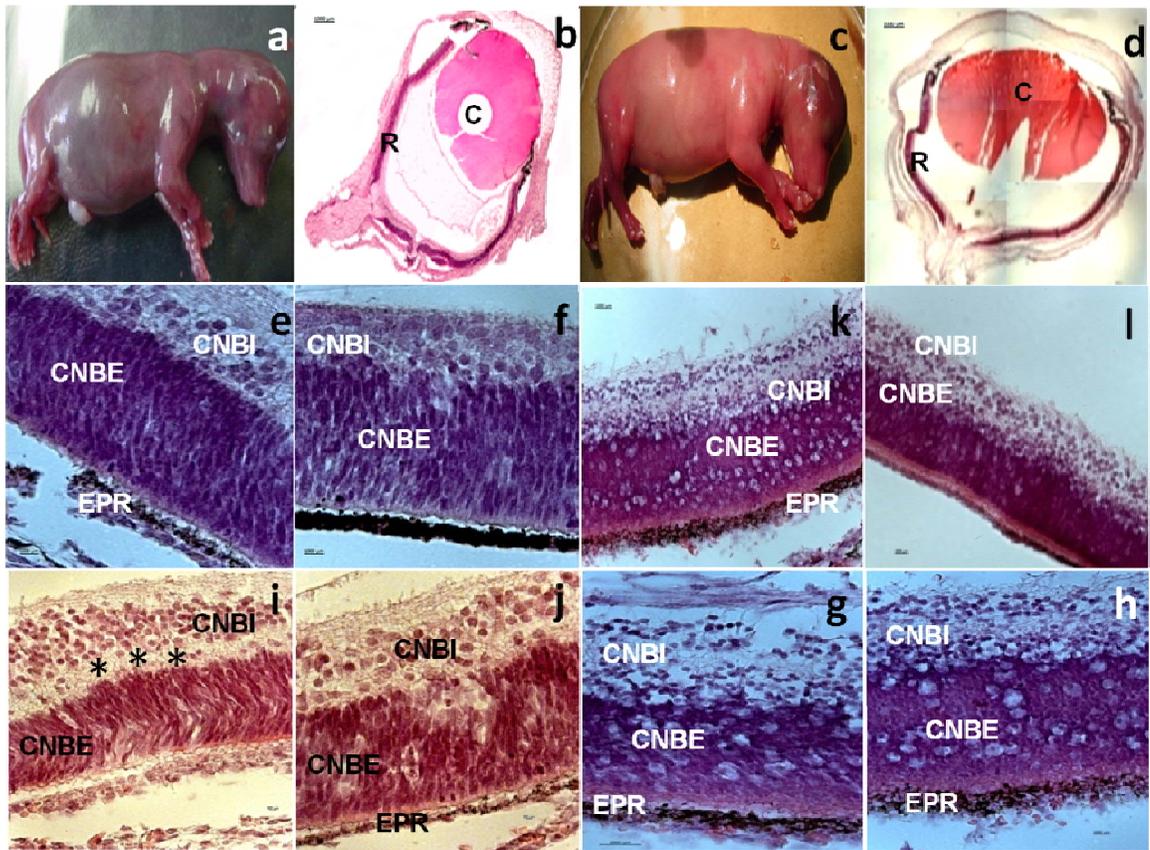


Figura 8. Morfología de la retina durante la etapa fetal (35-60 días de gestación). a y c) fetos de 35 a 60 días de gestación; b y d) corte transversal del ojo, donde se observa la retina (R) y el cristalino (C), 10X; e y k) la retina está integrada por el epitelio pigmentado de la retina (EPR) y las células de la capa neuroblástica las cuales en esta etapa han migrado y forman la capa neuroblástica externa (CNBE) y capa neuroblástica interna (CNBI) en la región central de la retina, 20X; f y l) CNBE y CNBI en la región periférica de la retina, 20X; i, g) EPR, CNBE y CNBI de la retina central, los asteriscos indican el espacio transitorio de Chievitz, 40X; EPR, CNBE y CNBI de la retina periférica, 40X.

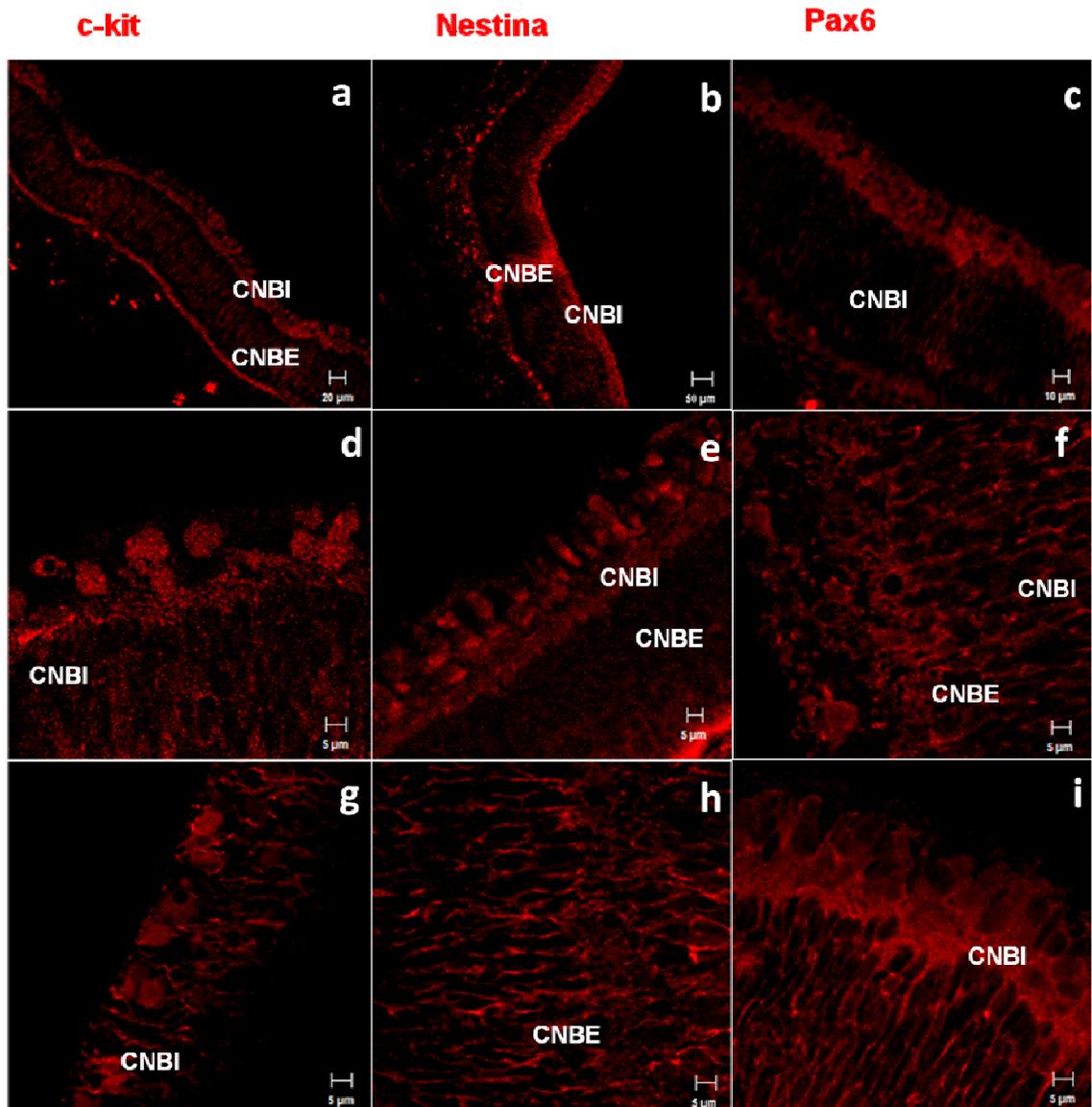


Figura 9. Expresión de marcadores de células progenitoras durante la etapa fetal. a, d y g) células de la capa neuroblástica interna (CNBI) marcadas con c-kit, 20X, 100X, 100X respectivamente; b, e y h) expresión de Nestina con mayor intensidad en la CNBI, mientras que fue débil en la capa neuroblástica externa (CNBE), 10X, 80X y 100X; c, f, i) células marcadas con Pax6 principalmente en la CNBI, 40X, 100X y 100X respectivamente.

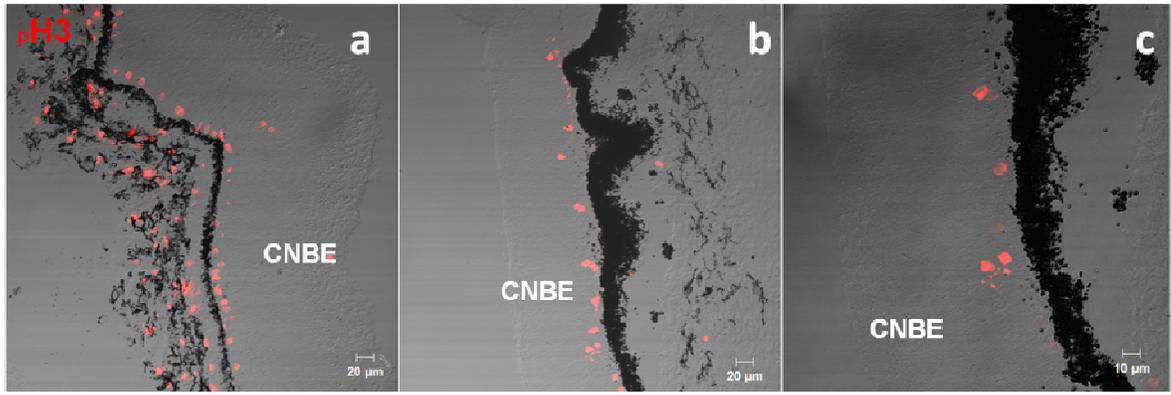


Figura 10. Expresión de células en proliferación en la etapa fetal. a, b y c) células marcadas con $pH3$ en la zona proliferativa, ubicada en la capa neuroblástica externa (CNBE), 20X, 20X y 40X.

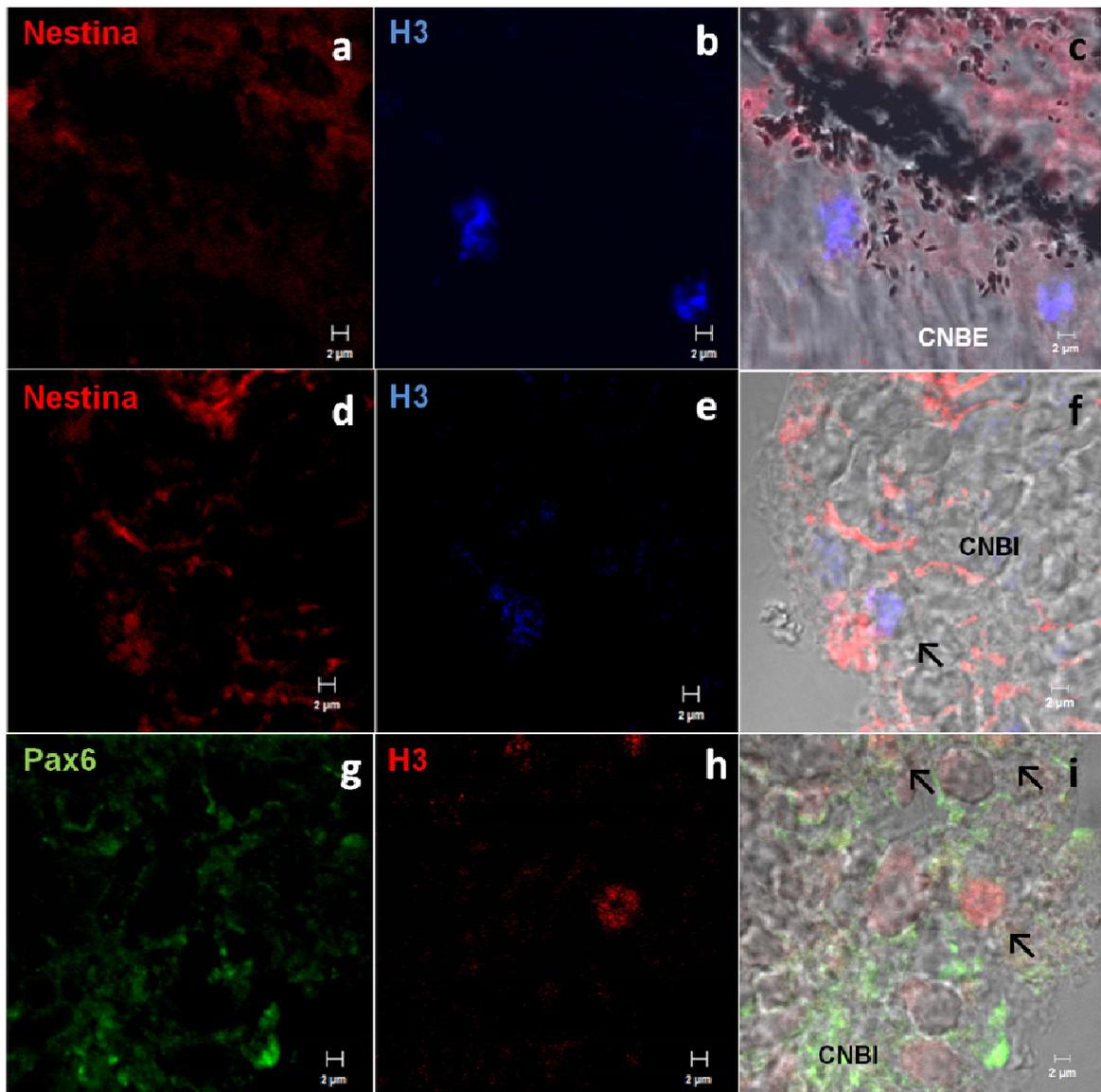


Figura 11. Colocalización de células progenitoras proliferando durante la etapa fetal. a-c) células progenitoras proliferando marcadas con Nestina/ ρ H3 se observaron en la capa neuroblástica externa (CNBE), 200X; d-f) células progenitoras expresan Nestina/ ρ H3 (flecha) en la capa neuroblástica interna (CNBI), 100X; g-i) células marcadas con Pax6/ ρ H3 (flechas) se localizaron en la CNBI, 100X.

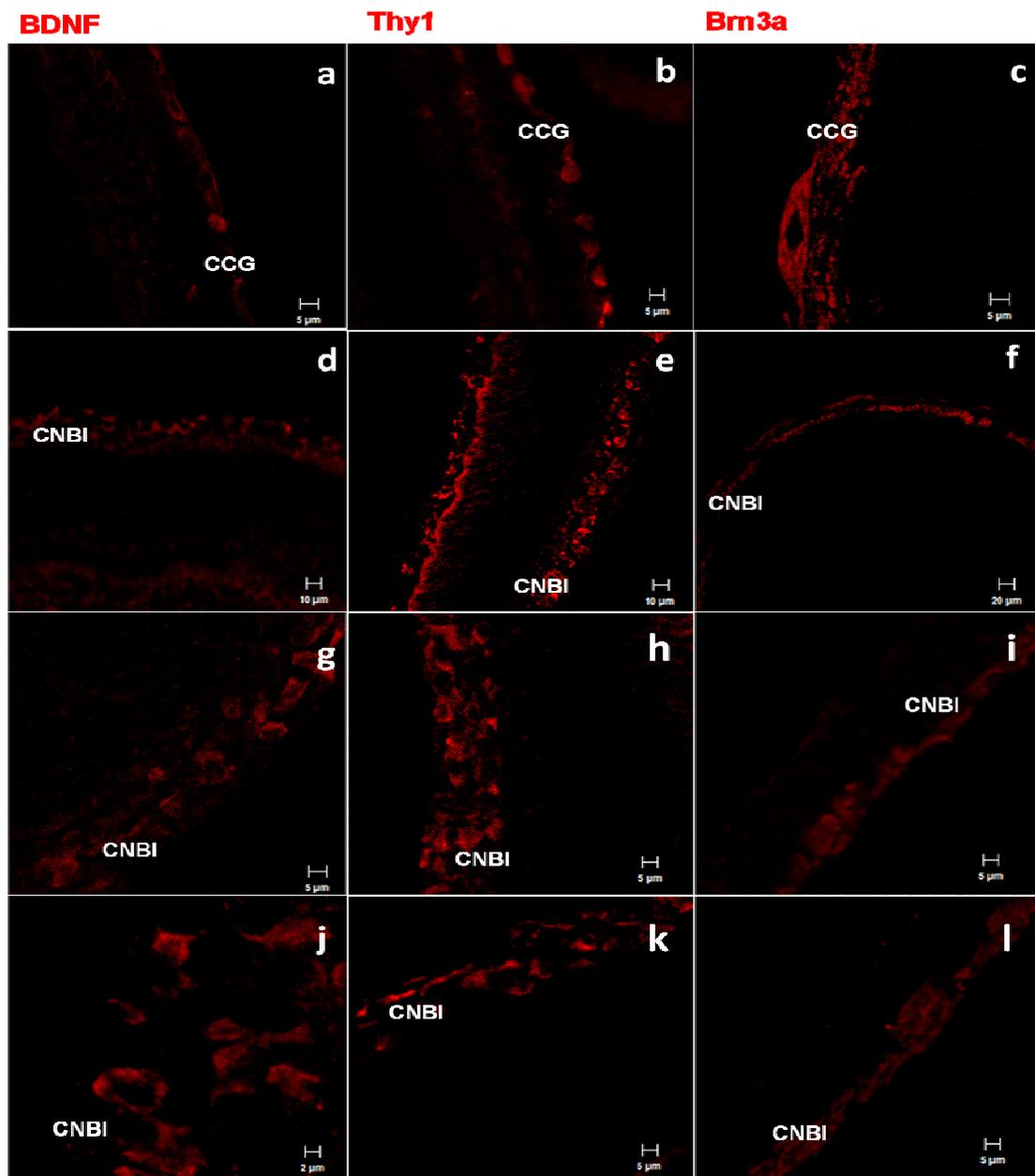


Figura 12. Expresión de marcadores de células ganglionares en etapa fetal. Control positivo a) BDNF, 100X; b) Thy1, 80X; c) Brn3a, 100X; La diferenciación celular inicia con las células ganglionares, células marcadas con BDNF se observaron en la capa neuroblástica interna (CNBI), d) en la región periférica, 40X; g) región media, 100X; j) región central, 200X; Thy1 también fue expresado, e) en la zona central; h-k) zona periférica, 80X; Brn3a se observó, f, l) en la región central, 20X, 80X; i) región periférica, 80X.

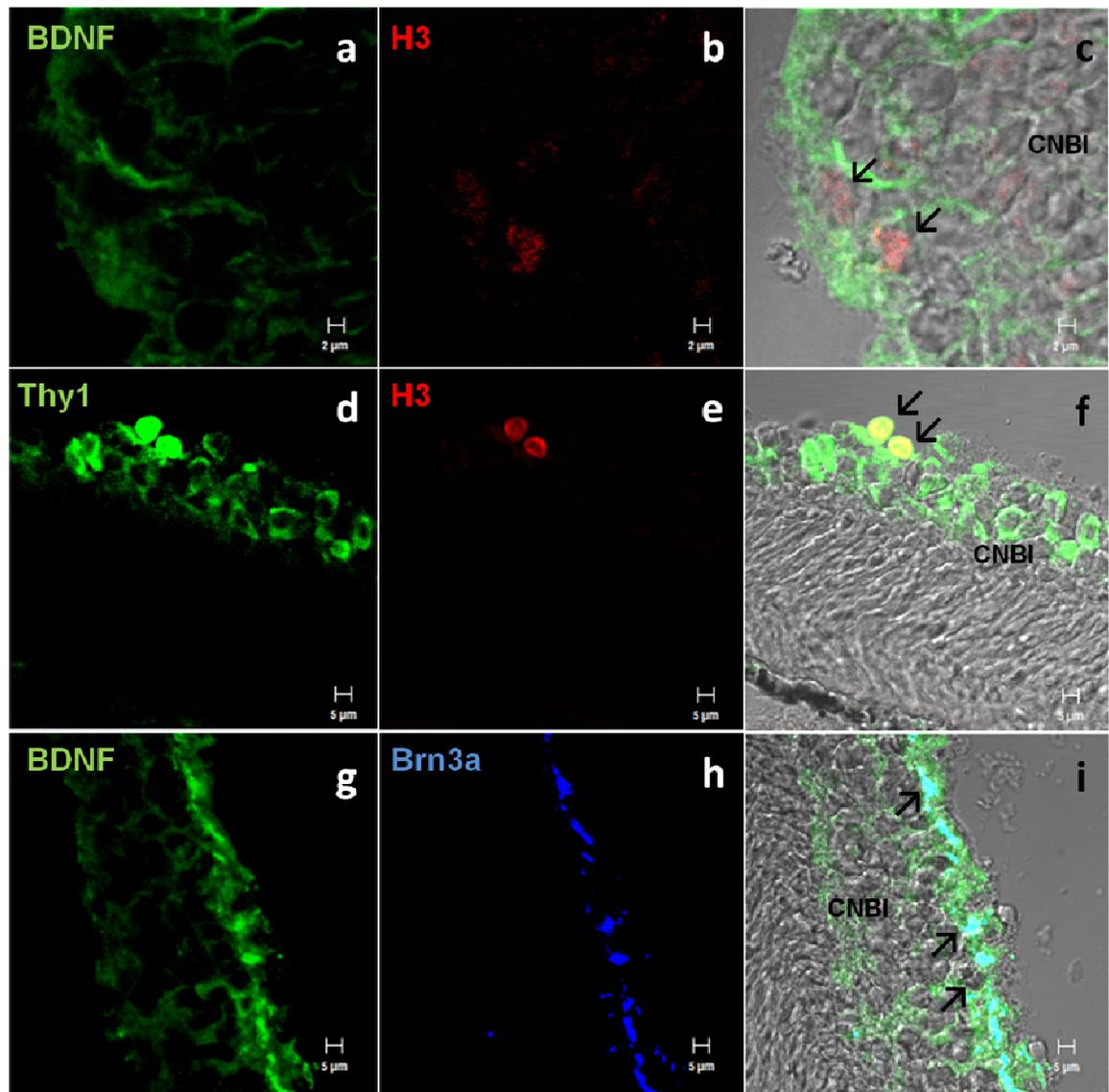


Figura 13. Células ganglionares proliferando en la etapa fetal. a-c) células marcadas con BDNF/ ρ H3 (flecha) sobre la capa neuroblástica interna (CNBI), en la región central de la retina 100X; d-f) colocalización de Thy1/ ρ H3 (flecha) en la CNBI, de la zona central de la retina, 80X; g-i) células ganglionares expresando BDNF/Brn3a (flechas) identificadas en la CNBI, 80X.

4. ETAPA NEONATAL (1 días post-natal)

4.1 MORFOGÉNESIS

La última etapa correspondiente a cachorros de 1 día post-natal, el desarrollo de las capas es más evidente. La retina se encuentra formada por la CFN y se observa un mayor número de células ganglionares y axones dirigidos hacia el cerebro formando el nervio óptico. La CCG se observó separada de la CNBI por la CPI. El EPR mostró una hilera de células cúbicas (Figuras 3k-t, 4m-n y 14). En el microscopio electrónico se observaron los núcleos de las células ganglionares, con cromatina homogénea y dispersa, también sus axones fueron evidentes formando la CFN. En la CNBE, procesos citoplasmáticos delimitaron las células (Figura 4ñ y o).

4.2 IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS Y EN PROLIFERACIÓN

La expresión de Nestina (Figura 15a-c) y Pax6 (Figura 15d-f) fue observada en la CNBI principalmente y una baja expresión se detectó en la CBNE. No se identificó la presencia de c-kit en esta etapa además la colocalización de marcadores de células progenitoras con proliferación no fue evidente.

4.3 IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS GANGLIONARES

La expresión de la proteína de los genes específicos de células ganglionares Brn3a (Figura 16a, d y g), Thy1 (Figura 16b, e y h) y BDNF (Figura 16c, f, i) se presentó en la CCG, tanto porción central como en la periférica de la retina. Además se demostró la presencia de células ganglionares proliferando, marcadas con BDNF/ ρ H3 (Figura 17a-c) y Thy1/ ρ H3 (Figura 17d-f); también se

identificó una colocación de BDNF/Brn3a (Figura 17g-i), la presencia de la señal de Brn3a se delimitó al núcleo mientras que BDNF se situó tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células ganglionares.

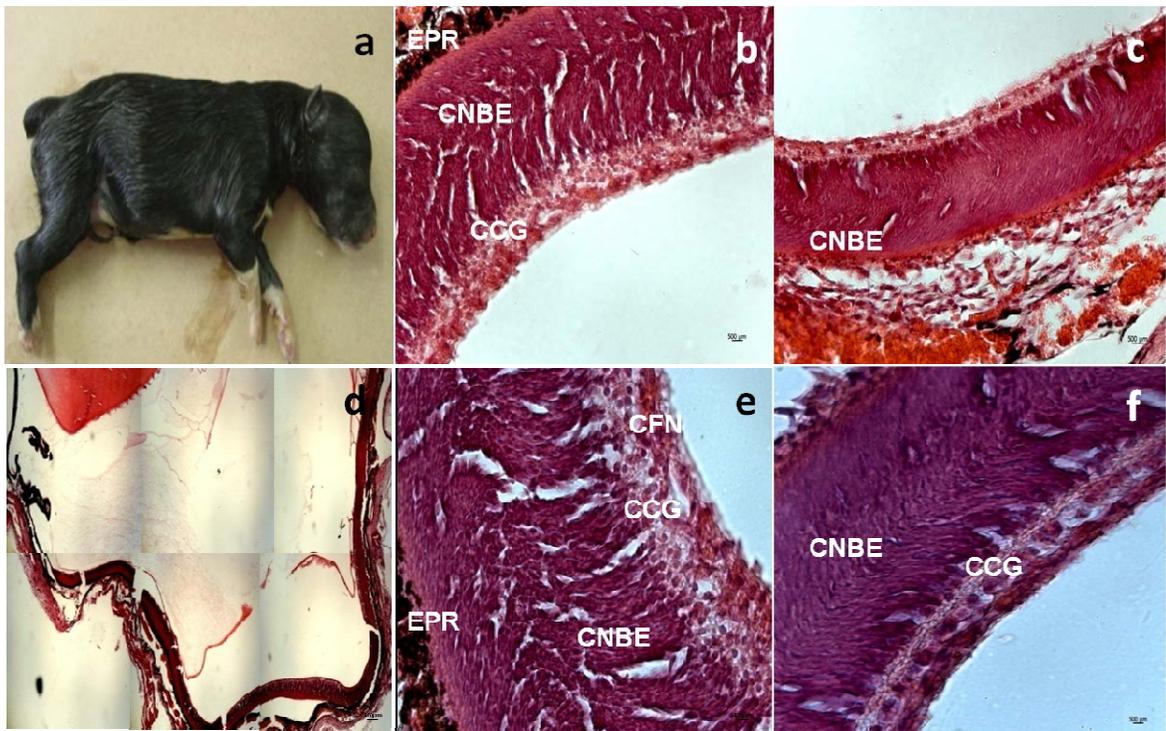
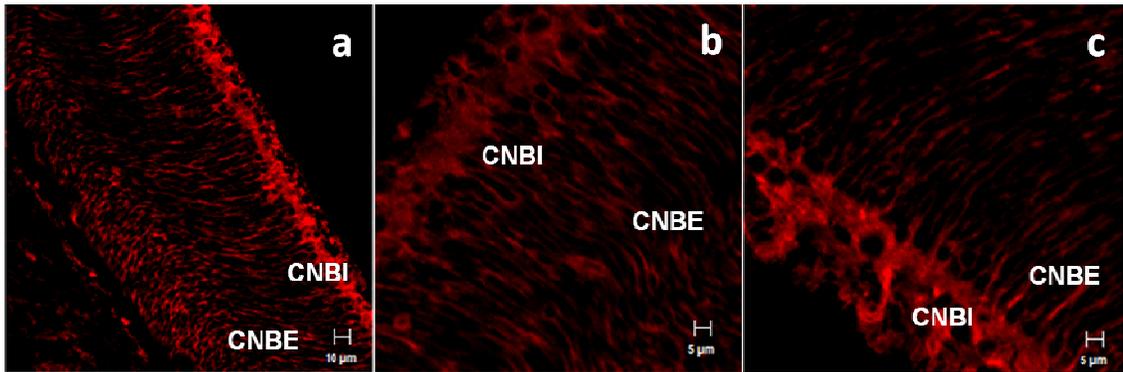


Figura 14. Morfología de la retina en la etapa neonatal (1 día post- natal). a) neonato de 1 día post-natal; d) corte transversal del ojo, donde se observa la retina (R) y el cristalino (C), 10X; b, e) la zona central de la retina está integrada por el epitelio pigmentado de la retina (EPR), la capa neuroblástica externa (CNBE), la capa de células ganglionares (CCG) y la capa de fibras nerviosas (CFN), 20X y 40X; c, f) zona periférica de la retina donde se observa la CNBE y CCG, 20X y 40X.

Nestina



Pax6

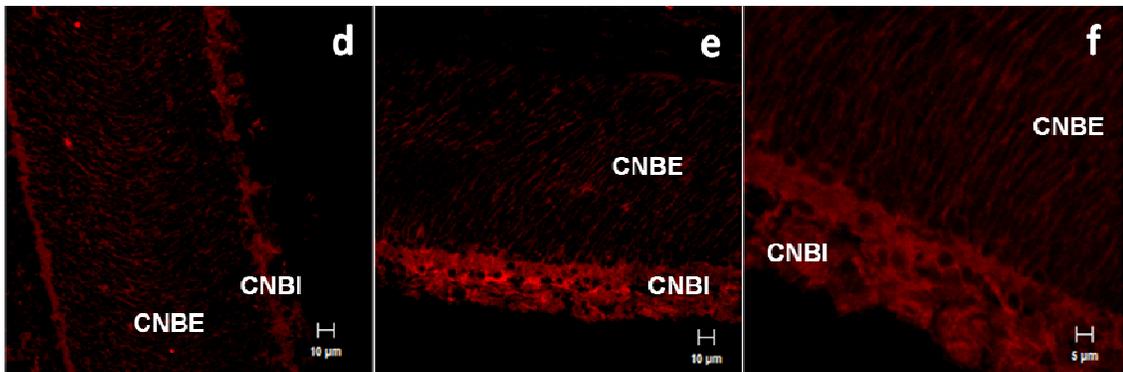


Figura 15. Células progenitoras neurales en la etapa neonatal. Células marcadas con Nestina ubicadas en la capa neuroblástica interna (CNBI) principalmente, a, c) en la región central de la retina, 40X y 80X; b) en la región periférica, 80X. Células progenitoras neurales las cuales expresaron Pax6 en la CNBI de la retina, d, f) en su zona central, 40X, 100X y e) en la periférica, 40X.

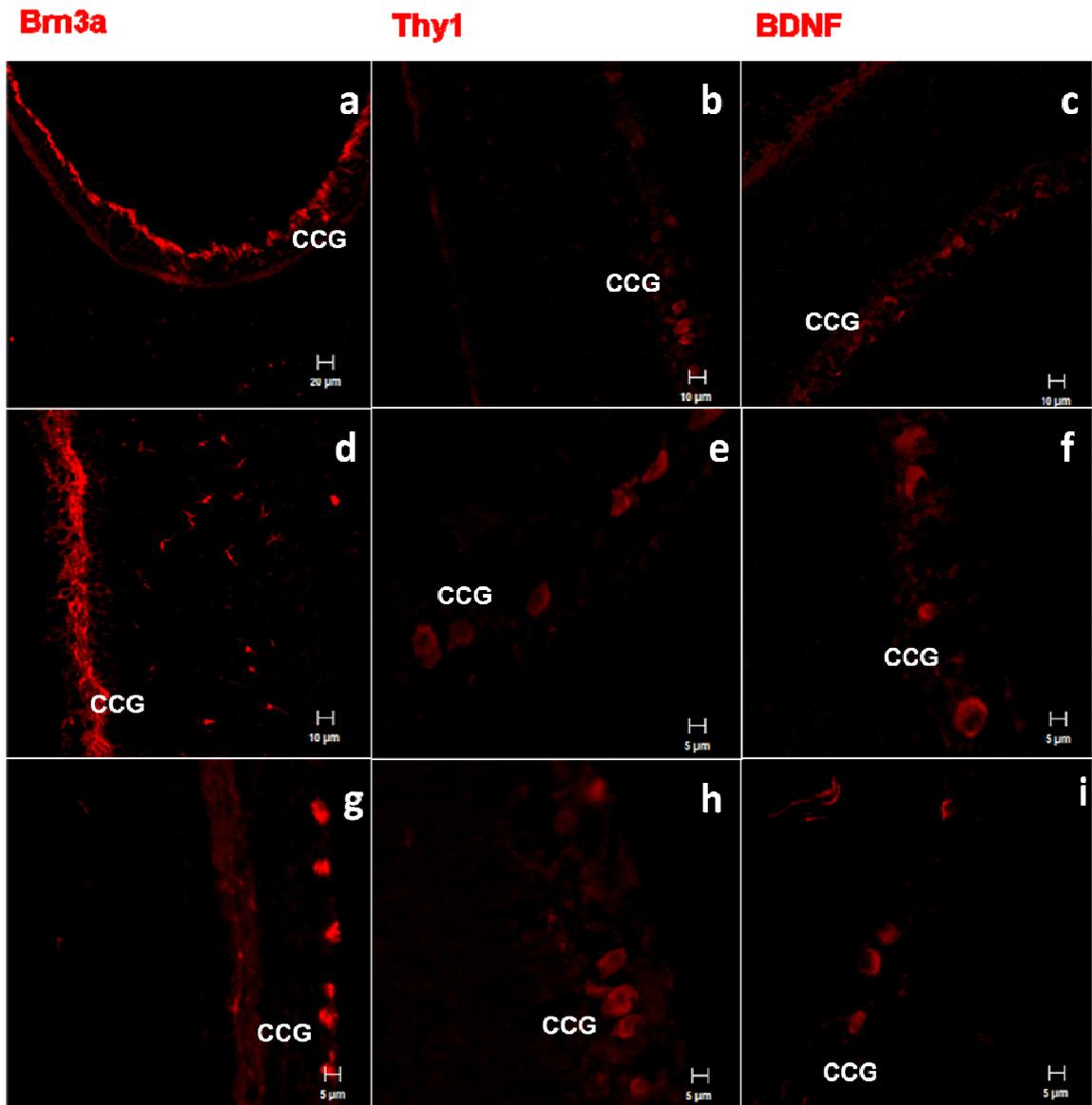


Figura 16. Expresión de células ganglionares en la etapa neonatal. Células ganglionares marcadas con Brn3a, a y g) en la capa de células ganglionares (CCG) en la región central de la retina, 20X y 80X; d) región periférica, 40X; Células con expresión de Thy1 sobre la CCG, b y e) región central, 40X y 80X; h) región periférica de la retina, 80X; células marcadas con BDNF localizadas en la CCG, c y f) en la región periférica, 40X y 80X; i) región central, 80X.

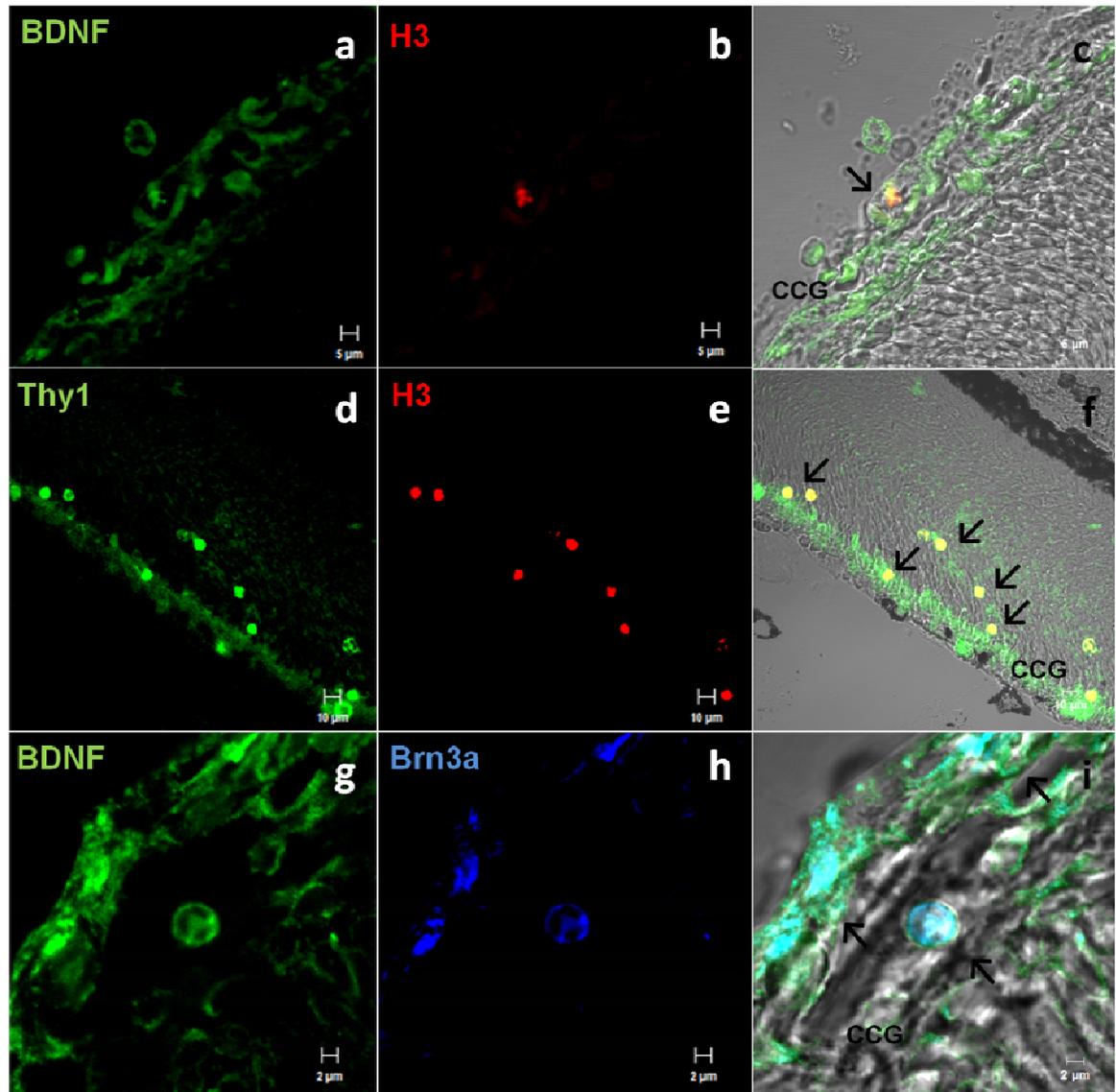


Figura 17. Células ganglionares en proliferación en la etapa neonatal. a-c) células marcadas con BDNF/ ρ H3 (flecha) en la capa de células ganglionares (CCG) sobre la región central de la retina, 80x; d-f) células ganglionares en proliferación que expresaron Thy1/ ρ H3 (flecha) en la CCG en la zona central de la retina, 80X; g-i) Colocalización de BDNF/Brn3a en células ganglionares (flechas) de la CCG, 200X.

5. DETECCIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS Y GANGLIONARES POR RT-PCR

Se observó la presencia de los genes Pax6 y BDNF, específicos para células progenitoras y ganglionares respectivamente en las tres etapas analizadas.

En el amplificado de la RT-PCR se obtuvieron dos bandas (una de ellas de 350 pb y otra de 550 pb) del gen Pax6 en la etapa embrionaria y fetal, mientras que en la neonatal solo se encontró un amplificado de 350 pb (Figura 18a). Por análisis estadístico se determinó la media \pm desviación estándar de la expresión relativa del gen Pax6 (350 pb) con respecto a β -actina arrojando los siguientes datos: 49.75 ± 14.8 en la etapa embrionaria, 83.37 ± 10.56 en la etapa fetal y 103.24 ± 9.7 en la etapa neonatal, observando un aumento estadísticamente significativo de este gen conforme progresa la retinogénesis (Fig. 18b). En contraste en el amplificado de 550pb la media \pm desviación estándar fue de 50.85 ± 15.54 en la etapa embrionaria y 53.14 ± 12.57 en la etapa fetal sin embargo para este fragmento el aumento no fue estadísticamente significativo (Fig.18c).

En la RT-PCR para el gen BDNF se observó un amplificado de 150pb de en las tres etapas (Fig.19a). La media \pm desviación obtenida de la expresión relativa del gen BDNF con respecto a β -actina fue: 78.79 ± 11.19 en la etapa embrionaria, 90.63 ± 7.16 en la etapa fetal y 95.28 ± 5.26 en la etapa neo-natal observando un aumento estadísticamente significativo del gen durante las tres etapas analizadas (Fig.19b).

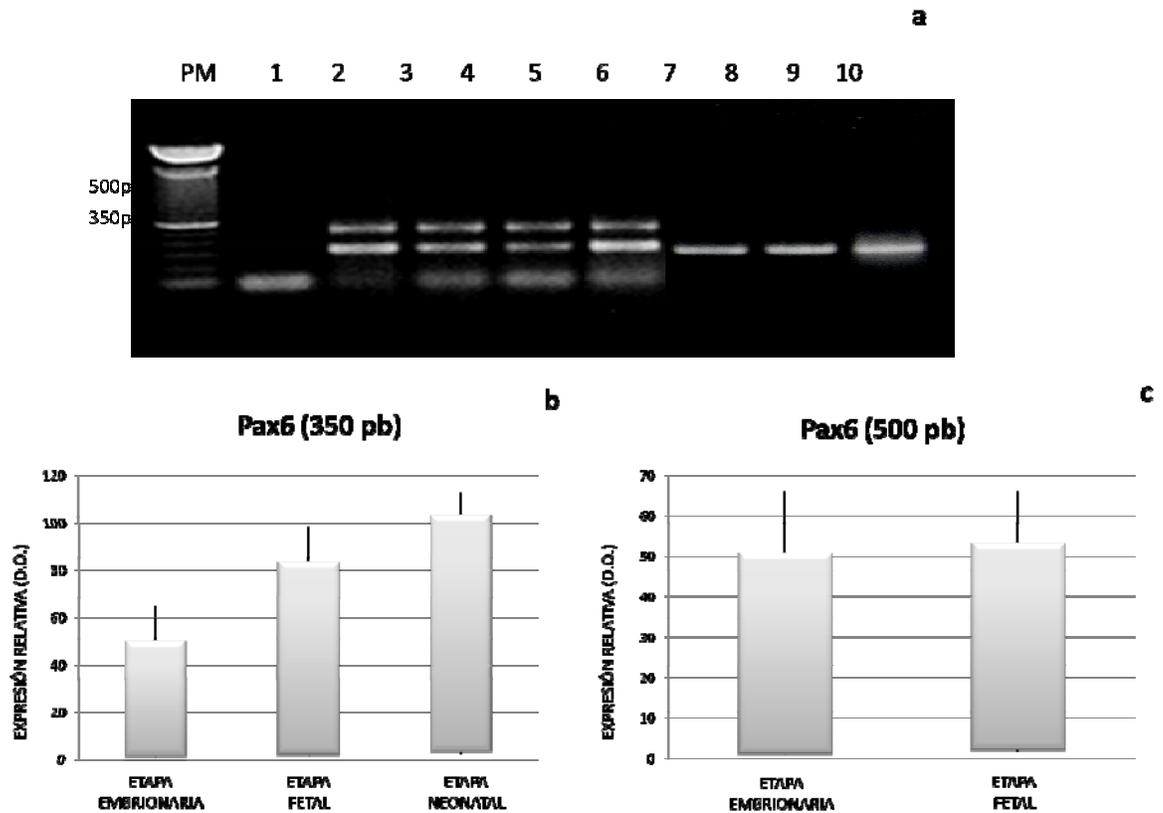


Figura 18. Comparación de los patrones de expresión genética de células progenitoras detectadas por RT-PCR durante la etapa embrionaria, fetal y neonatal en la retina canina. La expresión relativa de Pax6 con respecto a β -actina se observó en forma ascendente durante las tres etapas analizadas. Los productos fueron comparados con un marcador de peso molecular de 100 pb (PM), de izquierda a derecha: control negativo (1), etapa embrionaria (2-3), fetal (4-5), neonatal (6-7), control positivo β -actina de embrión (8), control positivo β -actina de feto (9), control positivo β -actina de neonato (10).

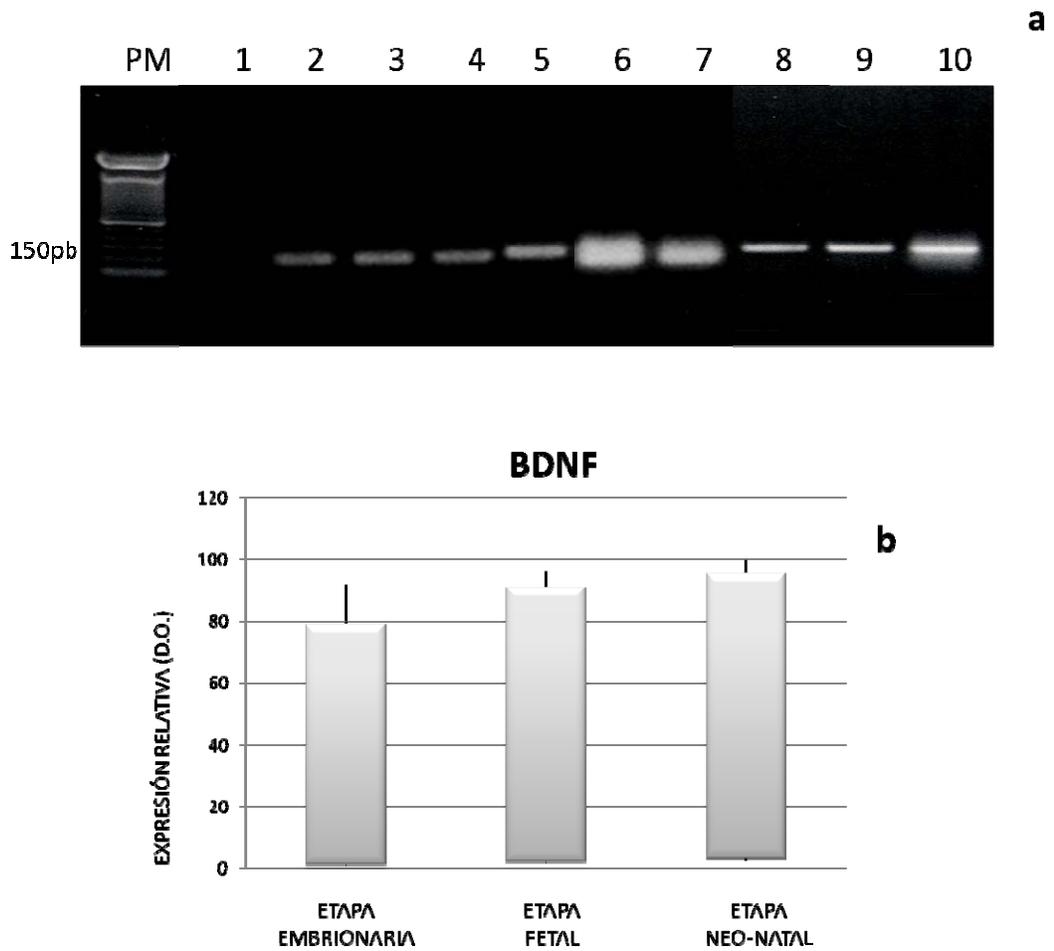


Figura 19. Comparación de los patrones de expresión genética de células ganglionares detectadas por RT-PCR durante la etapa embrionaria, fetal y neonatal de la retinogénesis canina. La gráfica muestra la expresión relativa de BDNF con respecto a β -actina. Los productos fueron comparados con un marcador de peso molecular de 100 pb (PM), de izquierda a derecha: control negativo (1), etapa embrionaria (2-3), fetal (4-5), neonatal (6-7), control positivo β -actina de embrión (8), control positivo β -actina de feto (9), control positivo β -actina de neonato (10).

VII. DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue marcar a las células progenitoras durante la retinogénesis canina, la edad de los animales se determinó de acuerdo a las características externas del animal y se compararon con lo descrito por Evans (1993) además se observaron los hallazgos microscópicos de la retina y fueron comparados con los encontrados por Aguirre (1972), Cook (1995) y Gelatt (2007).

Determinación de las etapas neo- y post-natal durante el desarrollo

Dentro de las características externas en la etapa embrionarias observamos una placenta de forma esférica con presencia de la membrana corio-alantoidea; el embrión presentaba una prominente flexura cefálica, el conducto ótico y el globo ocular desarrollados, características similares a reportadas por Evans (1993). Mediante el análisis histológico se observó que la retina en esta etapa, presentaba una capa neuroblástica perfectamente delimitada en dos zonas. Hacia el espacio vítreo se ubicó a la zona marginal interna, caracterizada por ser anuclear. En la zona nuclear externa se identificaron células con un patrón de profase y metafase similar a lo descrito por Hinds y Hinds (1974), estos hallazgos apoyan proceso de migración nuclear interquinética, en el cual las células migran del lado apical al basal de la neuro-retina conforme avanza el ciclo celular (Baye y Link, 2007; Baye y Link, 2008). Tomando en cuenta estos hallazgos y comparándolos con lo reportado por Aguirre *et al.* (1972) y Cook (1995), se determinó que los embriones incluidos en esta etapa presentaban una edad de 25 días de gestación.

En la etapa fetal las características externas fueron: placenta del tamaño de los fetos, los animales presentaban una elongación del tronco, diferenciación sexual, desarrollo del oído externo, crecimiento de pelo y uñas, además en los ojos se observó el cierre y fusión de los párpados. Como resultado de la migración celular, en la retina encontramos dos capas neuroblásticas: interna y externa

separadas entre sí por un espacio libre de células denominado espacio transitorio de Chievitz. En esta etapa el comienzo de la diferenciación celular fue evidente, algunas células de la capa neuroblástica interna se diferenciaron en células ganglionares y sus axones establecieron la capa de fibras nerviosas del nervio óptico. Además algunos fotorreceptores rudimentarios se evidenciaron en la capa neuroblástica externa colindante con el epitelio pigmentado de la retina estos hallazgos concuerdan con los trabajos histológicos realizados por Aguirre *et al.* (1972), Cook (1995) y Gelatt (2007) en la etapa fetal del desarrollo embrionario. Al microscopio electrónico Spira y Hollenberg (1973) observaron una diferencia entre los núcleos de la capa neuroblástica externa y la interna. En este estudio estas diferencias fueron evidentes, se observó que en la capa neuroblastica externa las células presentaron núcleos ovalados en contraste en la capa neuroblástica interna los núcleos fueron esféricos.

En el día 1 postnatal, histológicamente la retina presenta las mismas características ya descritas en la etapa fetal; sin embargo se observó un número mayor de células ganglionares. La estructura de las células ganglionares fue observada mediante microscopia electrónica, estas células presentaron un núcleo muy grande el cual abarcaba la mayor parte del cuerpo celular y sus axones se encontraron formando la capa de fibras nerviosas. Estos hallazgos fueron comparados con lo descrito por Spira y Hollenberg (1973) y Cook (1995).

Caracterización de células progenitoras

Diferentes marcadores de células progenitoras se han empleado con gran éxito para la identificación de células progenitoras, Pax6 un gen clave durante el desarrollo del ojo participa activamente en la diferenciación del cristalino y retina en diferentes modelos de vertebrados. Su mutación conlleva a la presencia de diferentes desordenes durante el desarrollo dentro de los cuales encontramos anomalías en iris, retina, cristalino y córnea. Durante la edad adulta su expresión

continua conservada en cristalino, córnea, así como, en células amacrinas y ganglionares de la retina (Strachan y Read, 1994; Marquardt *et al.*, 2001). En las tres etapas incluidas, Pax6 presentó un patrón similar abarcando tanto la retina central como la periférica; sin embargo su expresión fue mayor en la CNBI en la etapa fetal y neonatal, similar a lo reportado por Doh *et al.* (2010) quien observó la expresión de Pax6 en embriones de pollo; este gen fue detectado en las células progenitoras de la CNBI durante la etapa E4, conforme avanzó el desarrollo (E8) su incremento fue evidente en la capa nuclear interna (CNI). Finalmente en etapas tardías del desarrollo (E10), células ganglionares y amacrinas expresaron este gen. Para confirmar la presencia del ARN mensajero se aisló RNA total de la retina y se amplificó un fragmento del gen Pax6 por RT-PCR. Del amplificado de la RT-PCR se observó una banda de 500 pb en la etapa embrionaria y fetal, además otra banda de 350 pb fue observada en las tres etapas incluidas. La relación de este patrón de bandeo fue del 99% de identidad con la banda de 500 pb y 100% con la de 350 pb con respecto a la secuencia reportada en el Genbank para: *Canis lupus familiaris* paired box 6 (PAX6), confirmando la similitud de ambas bandas. Recientemente, Thummel *et al.*, 2010 reporta la presencia de dos genes parálogos de Pax6 (Pax6a, Pax6b) en el pez cebra, los cuales codifican para proteínas funcionales que regulan la formación y diferenciación de la retina y el cristalino. El Knockdown de Pax6b inhibe la subsecuente división de los progenitores derivados de la glía de Müller neurales de la CNI, en contraste la disminución de Pax6a permite su división temprana pero evita la tardía. Esta reducción de las células progenitoras en la CNI tiene como consecuencia una pérdida de conos regenerados pero no de bastones. Aunque falta mucho por comprender sobre la expresión de este gen, la presencia de dos bandas en la etapa embrionaria y fetal podrían indicar la presencia de un gen parálogo similar al descrito por Thummel en pez cebra.

Por su parte, Nestina una proteína de filamentos intermedarios que es expresada en células progenitoras mitóticamente activas que se diferenciarán a

neuronas y glía dentro del sistema nervioso central (SNC) y del sistema nervioso periférico (SNP); se ha encontrado que juega un papel importante en el movimiento celular, incluyendo desplazamiento, contracción y citocinesis (Michalczyk y Ziman, 2005). Durante el desarrollo embrionario del pollo, *transitina*, un homólogo de *Nestina*, presentó una restricción gradual (E12-E18). Células *transitina*⁺ (E16) se observaron en la región periférica principalmente en la capa de células ganglionares (CCG) y en la capa de fibras nerviosas (CFN), posiblemente marcando las terminaciones de la glía de Müller; sin embargo intensa inmunoreactividad se presentó en la zona marginal ciliar (ZMC) y en el cuerpo ciliar. La regulación a la baja en el E21 se restringió a la ZMC antes de la eclosión (Ghal *et al.*, 2008). En el perro la expresión de *Nestina* presentó un patrón similar al pollo reportado por Ghal (2008), donde la inmunoreactividad fue mayor en la CCG y CFN, sin embargo no se observó una expresión superior cerca del cuerpo ciliar, con lo que se descarta la existencia de un nicho de células progenitoras como el presentado en los pollos, sugiriendo que en el perro no existe un nicho como tal y que la expresión de células progenitoras comienza a decrecer conforme avanza el desarrollo del animal.

Otro marcador de células progenitoras de la retina es *c-kit* cuya participación está ampliamente estudiada en la gametogénesis, hematopoyesis, melanogénesis y en la neurogénesis; en esta última se ha observado que interviene en el establecimiento de conexiones neuronales además de promover la sobrevivencia, proliferación y diferenciación celular (Hirata *et al.*, 1993; Das *et al.*, 2004). *c-kit* se ha localizado en la retina neural, epitelio pigmentado de la retina y del cuerpo ciliar, sobre su expresión durante la retinogénesis se conoce poco. Koso y colaboradores (2007), reportan la presencia de *c-kit* en la CNB y CCG durante la etapa embrionaria. Al día 5 postnatal ellos observan una dramática disminución, la cual concuerda con la salida del ciclo celular y el comienzo de la diferenciación. En este estudio observamos la expresión de la proteína de *C-kit* durante la etapa embrionaria y fetal en las células de la CNB y conforme estas

células se ubicaron en dos capas, el marcador se observó principalmente en la CNBI, sin embargo no se encontró en neonatos. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Koso en el 2007.

Una característica importante que evidencia la presencia de células progenitoras es que estas presenten actividad mitótica. En el caso particular de la retina, Bayer (2008) propone un modelo de migración nuclear durante el desarrollo de la retina, en donde los núcleos de las células neuroepiteliales migran de apical a basal y de basal a apical conforme avanza el ciclo celular, ubicando a las células en G1, G2 y M en la zona apical colindante con el epitelio pigmentado, mientras que las células en fase S permanecen en la zona basal. Prigent en el 2003 observó que la expresión de H3, como un marcador mitótico, inicia durante la fase G2 y tiene un pico máximo durante la metafase de la mitosis. En este estudio nosotros encontramos la presencia de células en proliferación ubicadas cerca del epitelio pigmentado de la retina, confirmando que en la retina existe una migración celular conforme avanza el ciclo celular. Estos hallazgos también confirman la presencia de una zona germinal ubicada cerca del epitelio pigmentado como lo describe Cook (1995) y Gelatt (2007).

Diferenciación de células ganglionares

Durante la diferenciación celular, células progenitoras de la retina comienzan a expresar genes como: Brn3a, Thy1 y BDNF cuya función exacta se desconoce, sin embargo podrían desempeñar un papel importante durante la diferenciación de las células progenitoras a ganglionares. En este estudio encontramos la expresión de los tres marcadores en CCG a partir de la etapa fetal por medio de inmunohistoquímica, aunque se ha reportado que las células ganglionares son abundantes en la zona central, nosotros observamos la presencia de células ganglionares tanto en la zona central como en la periférica, sin embargo no pudimos distinguir el tipo de células que se marcaron, sugiriendo la presencia de células beta y alfa que son las células más abundantes en la retina

del perro. Brooks *et al.*, 1999 encuentra que las primeras células ganglionares que hacen una conexión sináptica con el cerebro, transportan BDNF al ojo por un flujo retrógrado. A pesar de que en la etapa embrionaria y fetal, las células ganglionares no requieren BDNF para su sobrevivencia, todas las células requieren de este factor una vez que la primera conexión sináptica está hecha. Cuando estas células fracasan en sus conexiones mueren por apoptosis por falta de neurotrofinas, esto concuerda con lo encontrado en nuestro estudio en donde observamos la expresión de BDNF a por RT-PCR en las tres etapas incluidas.

Una vez que estas células salieron del ciclo celular y se han diferenciado, algunas células ganglionares pueden en una fase de mitosis y expresar ρ H3, lo que concuerda con los presentes hallazgos, donde encontramos algunas células ganglionares en proliferación de acuerdo con lo descrito por Bayer en el 2008.

VIII. CONCLUSIONES

1. Las células progenitoras de la retina canina expresan marcadores específicos (Pax6 y Nestina) en la capa neuroblástica en las etapas pre- y post-natal.
2. La expresión de c-kit se limitó a la etapa embrionaria y fetal, probablemente su ausencia fue debido a la diferenciación celular.
3. El gen específico de células progenitoras Pax6 presentó un patrón ascendente durante la retinogénesis canina.
4. Células progenitoras con actividad mitótica se detectan en las etapas embrionaria y fetal, en contraste con la etapa neonatal, donde la actividad mitótica se presenta en células ganglionares.
5. La presencia de la proteína de los genes Brn3a, Thy1 y BDNF fue detectada a partir de la etapa fetal correspondiente al inicio la diferenciación celular.
6. El transcrito del gen BDNF se detectó desde la etapa embrionaria y su expresión aumenta conforme progresa la retinogenesis canina.

IX. REFERENCIAS

Ahmad I. Stem cells: new opportunities to treat eye diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42(12):2743-2748.

Ahmad I, Das AV, James J, Bhattacharya S y Zhao X. Neural stem cells in the mammalian eye: types and regulation. *Semin Cell Dev Biol.* 2004; 15(1):53-62.

Antúnez L. Anatomía funcional del sistema nervioso. 10ª ed. México. Limusa 2003.

Aguirre GD, Rubin LF y Bistner SI. Development of de canine eye. *Am. J. Vet. Res.* 1972; 33(12): 2399-2413.

Ashery-Padan R, Marquardt T, Zhou X y Gruss P. Pax6 activity in the lens primordium is required for lens formation and for correct placement of a single retina in the eye. *Genes Dev.* 2000; 14(21):2701-2711.

Badea TC, Cahill H, Ecker J, Hattar S y Nathans J. Distinct roles of transcription factors Brn3a and Brn3b in controlling the development, morphology, and function of retinal ganglion cells. *Neuron.* 2009; 61(6):825-864.

Baye LM y Link BA. Interkinetic nuclear migration and the selection of neurogenic cell divisions during vertebrate retinogenesis. *J Neurosci.* 2007; 27(38):10143-10152.

Baye LM y Link BA. Nuclear migration during retinal development. *Brain Res.* 2008; 1192:29-36.

Brooks DE, Komáromy AM y Källberg ME. Comparative retinal ganglion cell and optic nerve morphology. *Vet Ophthalmol.* 1999; 2(1):3-11.

Caminos E, Becker E, Martín-Zanca D y Vecino E. Neurotrophins and their receptors in the tench retina during optic nerve regeneration. *J Comp Neurol.* 1999; 404(3):321-331.

Chen HL, Yuh CH y Wu KK. Nestin is essential for Zebrafish brain and eye development through control of progenitor cell apoptosis. *PLoS One.* 2010; 5(2):e9318.

Cook CS. Embryogenesis of congenital eye malformations. *Veterinary & comparative ophthalmology.* 1995; 5(2):109-121.

Dahmann-Noor A, Vijay S, Jayaram H, Limb A y Khaw PT. Current approaches and future prospects for stem cell rescue and regeneration of the retina and optic nerve. *Can J Ophthalmol.* 2010; 45(4):333-341.

Das AV, James J, Zhao X, Rahnenführer J y Ahmad I. Identification of c-kit as a regulator of adult neural stem cells in the mammalian eye: interactions with Notch signaling. *Dev Biol.* 2004; 273(1):87-105.

De Lahunta. *Veterinary neuroanatomy and clinical neurology.* 2^a ed. Japan: Saunders 1983.

Doh SH, Hao H, Loh SC, Patel T, Tawil HY, Chen DK, Pashkova A, Shen A, Wang H y Cai L. Analysis of retinal cell development in chick embryo by

immunohistochemistry and in ovo electroporation techniques. *Dev Biol.* 2010; 10(8):1-16.

Evans HE. *Miller's anatomy of the dog.* 3^a ed. Ithaca, New York: Saunders 1993.

Fischer AJ, McGuire CR, Dierks BD y Reh TA. Insulin and fibroblast growth factor 2 activate a neurogenic program in Müller glia of the chicken retina. *J Neurosci.* 2002; 22(21):9387-9398.

Fossum TW, Hedlund CS, Johnson AL, Schulz KS, Seim HB, Willard MD, Bahr A y Carroll GL. *Small animal surgery.* 3^a ed. USA: Mosby Elsevier, 2007.

Ghal K, Stanker JJ y Fischer AJ. Patterning of the circumferential marginal zone of progenitors in the chicken retina. *Brain Res.* 2008; 1192:76-89.

Gelatt K. *Essentials of veterinary ophthalmology.* 2^a ed. Florida, USA: Wiley-Blackwell 2007.

Germanà A, Sánchez-Ramos C, Guerrero MC, Calavia MG, Navarro M, Zichichi R, García-Suárez O, Pérez-Piñera P y Vega JA. Expression and cell localization of brain-derived neurotrophic factor and TrkB during zebrafish retinal development. *J Anat.* 2010; 217(3):214-222.

Gilyarov AV. Nestin in central nervous system cells. *Neurosci Behav Physiol.* 2008; 38(2):85-90.

Gu P, Harwood LJ, Zhang X, Wylie M, Curry WJ y Cogliati T. Isolation of retinal progenitor and stem cells from the porcine eye. *Mol Vis.* 2007; 13:1045-1057.

Hever AM, Williamson KA y Van Heyningen V. Developmental malformations of the eye: the role of PAX6, SOX2 and OTX2. *Clin Genet.* 2006; 69(6):459-70.

Hinds JW y Hinds LP. Early ganglion cell differentiation in the mouse retina: an electron microscopic analysis utilizing serial sections. *Dev Biol.* 1974; 37(2):381-416.

Hirata T, Morii E, Morimoto M, Kasugai T, Tsujimura T, Hirota S, Kanakura Y, Nomura S y Kitamura Y. Stem cell factor outgrowth of c-kit neurites and supports the survival of c-kit-positive neurons in dorsal root ganglia of mouse embryos. *Development.* 1993; 119(1):45-56.

Jagatha B, Divya MS, Sanalkumar R, Indulekha C, Vidyanand S, Divya TS, Das AV y James J. In vitro differentiation of retinal ganglion-like cells from embryonic stem cell derived neural progenitors. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 380(2): 230–235.

Keshet E, Lyman SD, Williams DE, Anderson DM, Jenkins NA, Copeland NG y Parada LF. Embryonic RNA expression patterns of the receptor and its cognate ligand suggest multiple functional roles in mouse development. 1991; 10(9);2425-2435.

Klassen H y Reubinoff B. Stem cells in a new light. *Nat Biotechnol.* 2008; 26(2):187-188.

Koso H, Satoh S y Watanabe S. c-kit marks late retinal progenitors cells and regulates their differentiation in developing mouse retina. *Dev Biol.* 2007; 301(1): 141-154.

Li L y Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005; 21:605-631.

MacLaren RE, Pearson RA, MacNeill A, Douglas RH, Salt TE, Akimoto M, Swaroop A, Sowden JC y Ali RR. Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursor. *Nature.* 2006; 444(9):203-207.

Mahler J y Driever W. Expression of the zebrafish intermediate neurofilament Nestin in the developing nervous system and in neural proliferation zones at postembryonic stages. *BMC Dev Biol.* 2007; 7: 98-109.

Marquardt T, Ashery-Padan R, Andrejewski N, Scardigli R, Guillemot F y Gruss P. Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell.* 2001; 105(1):43-55.

Marquardt T. y Gruss P. Generating neuronal diversity in the retina: one nearly all. *Trends Neurosci.* 2002; 25(1):32-38.

Masland RH. Neuronal cell types. *Curr Biol.* 2004; 14(13):497-500.

Mayer EJ, Carter DA, Ren Y, Hughes EH, Rice CM, Halfpenny CA, Scolding NJ y Dink AD. Neural progenitor cells from postmortem adult human retina. *Br J Ophthalmol.* 2005; 89(1):102-106.

McCulloch EA y Till JE. Perspectives on the properties of stem cells. *Nat Med*. 2005; 11(10):1026-1028.

Michalczyk K y Ziman M. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol Histopathol*. 2005; 20(2):665-671.

Moshiri A, Close J y Reh TA. Retinal stem cell and regeneration. *Int J Dev Biol*. 2004; 48(8-9):1003-1014.

Nistor G, Seiler M, Yan F, Ferguson D y Keirstead HS. Three-dimensional early retinal progenitor 3D tissue constructs derived from human embryonic stem cells. *J Neurosci Methods*. 2010;190(1):63-70.

Ofri R. y Narfström K. Light at the end of the tunnel? Advances in the understanding and treatment of glaucoma and inherited retinal degeneration. *Vet J*. 2007; 174(1):10-22.

Okuda T, Tagawa K, Qi ML, Hoshio M, Ueda H, Kawano H, Kanazawa I, Muramatsu M y Okazawa H. Oct-3/4 repression accelerates differentiation of neural progenitor cells in vitro and in vivo. *Brain Res Mol Brain Res*. 2004; 132(1): 18–30.

Osumi N, Shinohara H, Numayama-Tsuruta y Maekawa M. Concise review: Pax6 Transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator. *Stem Cells*. 2008; 26(7):1663-1669.

Park CM y Hollenberg MJ. Basic fibroblast growth factor induces retinal regeneration in vivo. *Dev Biol*. 1989; 134(1):201-205.

Pesce M y Schöler HR. Oct-4: Gatekeeper in the Beginnings of Mammalian Development. *Stem Cells*. 2001; 19(4):271-278.

Prigent C y Dimitrov S. Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J Cell Sci*. 2003; 116:3677-3685.

Quinn JC, West JD y Hill RE. Multiple functions for Pax6 in mouse eye and nasal development. *Genes Dev*. 1996. 10(4):435-46.

Quiroz H, Ochoa D, Morales V, Dalma J y Jiménez J. 2ª ed. México: Mc Graw Hill 2004.

Raymond PA, Barthel LK, Bernardos RL y Perkowski JJ. Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish. *BMC Dev Biol*. 2006; 26(6):1-17.

Raymond ID, Vila A, Huynh UC y Brecha NC. Cyan fluorescent protein expression in ganglion and amacrine cells in a thy1-CFP transgenic mouse retina. *Mol Vis*. 2008; 14:1559-1574.

Reh TA y Fischer AJ. Stem cells in the vertebrate retina. *Brain Behav Evol*. 2001; 58(5):296-305.

Reh TA y Fischer AJ. Retinal Stem Cells. *Methods Enzymol*. 2006; 419:52-73.

Reh TA y Levine E.M. Multipotential stem cells and progenitors in the vertebrate retina. *J Neurobiol*. 1998; 36(2):206-220.

Salem HK y Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells*. 2010; 28(3):585-596.

Schlamp CL, Johnson EC, Li Y, Morrison JC y Nickells RW. Changes in Thy1 gene expression associated with damaged retinal ganglion cells. *Mol Vis*. 2001; 7:192-201.

Spira AW y Hollenberg MJ. Human retinal development: ultrastructure of the inner retinal layers. *Dev Biol*. 1973; 31:1-21.

Strachan T y Read AP. PAX genes. *Curr Opin Genet Dev*. 1994; 4(3):427-438.

Takahashi M, Palmer TD, Takanashi J y Gage FH. Widespread integration and survival of adult-derived neural progenitor cells in the developing optic retina. *Mol Cell Neurosci*. 1998; 12(6):340-348.

Tasman W y Jaeger E. Duane's Foundations of clinical ophthalmology. In: Cook C, Ozanics, Jakobiec, editors. Philadelphia: J.B. Lippincott company, 1994: 47-65.

Thummel R, Enright JM, Kassen SC, Montgomery JE, Bailey TJ y Hyde DR. Pax6a and Pax6b are required at different points in neuronal progenitor cell proliferation during zebrafish photoreceptor regeneration. *Exp Eye Res*. 2010; 90(5):572-582.

Tosaki H, Kunisada T, Motohashi T, Aoki H, Yoshida H y Kitajima Y. Mice transgenic for kit V620A: recapitulation of piebaldism but not progressive

depigmentation seen in humans with this mutation. *J Invest Dermatol.* 2006; 126(5):1111-1118.

Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR y Van Der Kooy D. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science.* 2000; 287(5460):2032-2036.

Vidal M, Morris R, Grosveld F y Spanopoulou E. Tissue-specific control elements of the Thy-1 gene. *EMBO J.* 1990; 9(3):833-840.

Weber AJ y Harman CD. BDNF preserves the dendritic morphology of α and β ganglion cells in the cat retina after optic nerve injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49(6):2456-2463.

Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, Wersto RP, Boheler KR y Wobus AM. Nestin expression -a property of multi-lineage progenitor cells?. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61(19-20):2510-2522.

Wohl SG, Schmeer CW, Kretz A, Witte OW y Isenmann S. Optic nerve lesion increases cell proliferation and nestin expression in the mouse eye in vivo. *Exp Neurol.* 2009; 219(1):175-186.

Zaghloul NA, Yan B y Moody SA. Step - wise specification of retinal stem cells during normal embryogenesis. *Biol Cell.* 2005; 97(5):321-337.