



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Exploración de la respuesta de células aisladas de pulpa dental ante señales
neurogénicas de la retina: papel del daño celular

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

ALEJANDRA LIZBETH FLORES BRAY

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Karlen Gazarian – Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Jesús Chimal Monroy – Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dra. Mónica Lamas Gregori – Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

MÉXICO, D. F. Diciembre, 2014



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.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a la Dra. Mónica Lamas Gregori el haberme permitido trabajar en su laboratorio y dirigir esta tesis con paciencia y sabiduría.

Al Dr. Jesús Chimal por sus valiosos consejos,

A los miembros del jurado por tomarse el tiempo de revisar la tesis,

A mis compañeros de laboratorio por hacer más divertido el camino,

A mi familia por su apoyo incondicional.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

ÍNDICE

Resumen	iv
Introducción	
1. Células Troncales	1
2. Células Troncales de Pulpa Dental	1
2.1 Potencial regenerativo de las células troncales de pulpa dental	3
3. Retina	4
3.1 Organización y función de sus componentes celulares	4
3.2 Retinopatías degenerativas	7
4. Potencial de células troncales en retinopatías degenerativas	8
4.1 Estudios <i>in vitro</i>	8
4.2 Estudios <i>in vivo</i>	9
5. Activación de señales neurogénicas en la retina luego del daño celular	9
Justificación	12
Hipótesis	12
Objetivos	12
1. General	12
2. Particulares	12
Metodología	
1. Cultivo de células troncales de pulpa dental	14
2. Cultivo organotípico de retina	14
3. Modelo de daño retinal con N-Metil-nitroso urea (MNU)	15
4. Cultivo de células troncales de pulpa dental con medio condicionado de explante organotípico de retina	16
5. Ensayo colorimétrico de viabilidad celular	17
6. Extracción de RNA total	18
7. RT-qPCR	18

8. RT-PCR	19
9. Inmunofluorescencia	20
Resultados	
1. Mantenimiento del cultivo organotípico de retina	21
2. Modelo de daño retinal: Determinación de la dosis de MNU <i>in vitro</i>	21
3. Las células humanas de pulpa dental desarrollan cambios morfológicos luego del cultivo con medio condicionado de explante organotípico de retina.	23
4. El medio condicionado de retina modifica el crecimiento de las DPSC	27
5. Las DPSC expresan marcadores neurales al cultivarse con medio condicionado de retina	28
Discusión	
1. Determinación de la dosis de MNU <i>in vitro</i>	34
2. Cinética de crecimiento	35
3. Cambios morfológicos	36
4. Expresión de marcadores neurales	38
Conclusiones	41
Apéndices	
I. Cultivo de fibroblastos de prepucio neonatal	42
II. Índice de tablas y figuras	43
III. Abreviaturas	45
IV. Material y equipo	48
V. Carta de consentimiento informado	49
Referencias	51

RESUMEN

Las células troncales derivadas de pulpa dental se originan de la cresta neural y migran durante el desarrollo embrionario, para formar distintas estructuras craneofaciales y tejidos incluyendo la pulpa dental, compuesta de células diferenciadas e indiferenciadas que conservan su multipotencialidad hasta la etapa adulta y se diferencian *in vitro* a linajes mesenquimales y neuronales. Se ha establecido su valiosa relación con los componentes del SNC en virtud de que promueven la supervivencia de neuronas dopaminérgicas del ganglio trigémino, y motoneuronas de la médula espinal en diferentes modelos de lesión a través de la producción de factores neurotróficos, inhibición de la apoptosis, inhibición de la señalización de inhibidores del crecimiento axonal y, reemplazo de los oligodendrocitos dañados mediante diferenciación. Además, su capacidad de diferenciarse *in vivo* a neuronas funcionalmente activas en modelos de embrión de pollo e hipocampo de rata, nos llevó a evaluar su potencial regenerativo en otro sitio del sistema nervioso: la retina. Este tejido, incapaz de regenerarse en mamíferos, es responsable de la fototransducción, está compuesto de tres capas de núcleos y dos de sinapsis con diversos tipos neuronales (células ganglionares, amacrinas, horizontales, bipolares y fotorreceptoras) y gliales (células de Müller, astrogliá y microgliá). Bajo la hipótesis de que las células ectomesenquimales de pulpa dental son capaces de diferenciarse a elementos neuronales de la retina, cultivamos células humanas de pulpa dental con medio condicionado de explantes organotípicos de retina control y dañada con N-metil nitroso urea, observando que, cambian su potencial de proliferación y desarrollan proyecciones citoplasmáticas delgadas y bien definidas que les confieren morfología unipolar, bipolar o estrellada, similar a la forma de las neuronas. Además de expresar marcadores neurales como: la molécula polisialicilada de adhesión de célula neural (PSA-NCAM), *NEUROD-1*, los factores de transcripción *OTX2* y *CRX*, y marcadores de neuronas de la retina; *POU4F1*, de células ganglionares y *NRL* y RODOPSINA, de fotorreceptores.

INTRODUCCIÓN

1. Células Troncales

La auto renovación (división asimétrica o simétrica que mantiene el estado indiferenciado a la vez que da origen a células progenitoras o maduras) y el potencial para diferenciarse en diversos tipos celulares son las características principales de las células troncales (SC). Según su origen, las SC se clasifican en: embrionarias (ESC) que dan lugar a todo el organismo durante el desarrollo; fetales (FSC); amnióticas (AFSC) y adultas (ASC) [1]. Actualmente es posible obtener células troncales pluripotentes inducidas (iPSC) a partir de células somáticas utilizando factores de transcripción [2]. Respecto a su potencial, las SC se clasifican en totipotentes, aquellas que forman la mórula y pueden dar lugar a un organismo completo, incluyendo el tejido placentario; pluripotentes, que integran la masa celular interna del blastocisto y forman las tres capas embrionarias (mesodermo, endodermo y ectodermo); multipotentes, si se diferencian a tipos celulares del mismo linaje; oligopotentes, que se diferencian en pocos tipos celulares y unipotentes, si dan lugar a un solo tipo celular [1].

2. Células Troncales de Pulpa Dental

Las células troncales de pulpa dental, DPSCs por su nombre en inglés (Dental Pulp Stem Cells), son células troncales adultas que se originan de la cresta neural craneal y participan en la dentinogénesis e inervación de los dientes. Bajo las condiciones apropiadas, pueden diferenciarse a condrocitos, osteoblastos, adipocitos, neuronas, células de músculo liso [3] y hepatocitos [4]. Su capacidad para diferenciarse a linajes mesenquimales, clonogenicidad y alta proliferación fue reportada inicialmente en el año 2000 por Gronthos y colaboradores [5]. Estas células se aíslan de la cámara interior de dientes primarios o bien de terceros molares permanentes y constituyen un cultivo heterogéneo de apariencia fibroblástica, que carece de marcadores endoteliales y hematopoyéticos (CD45, CD34, CD11b/c, HLA-DR), pero presenta marcadores mesenquimales

(CD44,CD90, CD73 ,CD105) y neurales (Dcx, nestina, GFAP, β III tubulina, NeuN, A2B5 y CNPasa) [6].

Durante la invasión de la pulpa dental y, en co-cultivo con células neuronales, las DPSCs producen factores neurotróficos como: factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado de glía (GDNF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y factor neurotrófico ciliar (CNTF). Estas características permiten que las DPSCs promuevan la supervivencia de neuronas dopaminérgicas embrionarias [7], neuronas sensoriales del ganglio trigémino y motoneuronas de la médula espinal [6]. También se ha observado que las DPSCs dirigen la orientación de los axones a través de la quimiocina CXCL12 [8] y se diferencian a neuronas funcionales en estudios *in vivo* con embriones de pollo [9] y en hipocampo de ratón adulto [10]. Además, poseen una mayor capacidad para diferenciarse en neuronas y células epiteliales en comparación con las células troncales mesenquimales de médula ósea (BM-MSC) [11] ya que bajo condiciones ambientales adecuadas, las células troncales de pulpa dental no solo expresan marcadores de diferenciación neuronal como β -III tubulina, NeuN, PSA-NCAM, NF-M y NF-H sino que también producen corrientes de sodio comparables con las reportadas para neuronas [9] y se sabe que la expresión de canales de sodio es crítica para el desarrollo de potenciales de acción [64] e incluso es utilizada como herramienta para evaluar la maduración neuronal de células troncales neurales (NSC) [65]. Su origen embrionario, la capacidad de mantener su troncalidad aun en la etapa adulta y la relativa facilidad con que se diferencian hacia el linaje neuronal podrían conferirles un alto potencial regenerativo en el campo de la neuro-reparación.

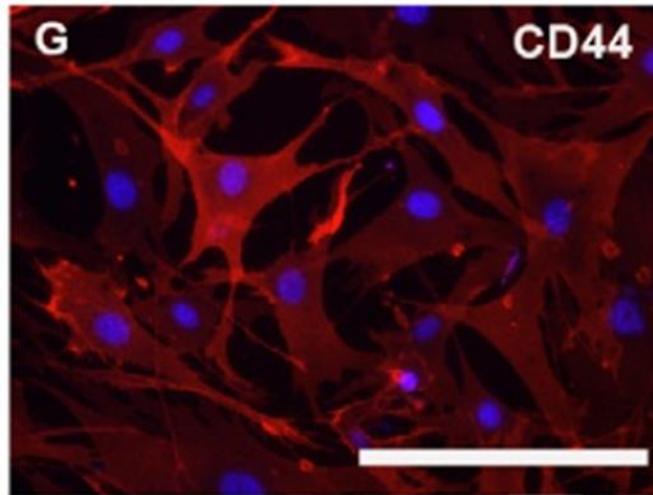


Figura 1. Morfología *in vitro* de células troncales de pulpa dental (DPSCs) marcadas por inmunofluorescencia, que expresan el marcador mesenquimal CD44 (rojo), los núcleos fueron marcados con DAPI (azul). Barra de calibración = 50 μ m [3].

2.1 Potencial regenerativo de las células troncales de pulpa dental

Las células troncales derivadas de la pulpa dental interactúan con su entorno a través de dos mecanismos regenerativos: secreción de factores neurotróficos [63] y diferenciación [7]. Por ejemplo; en modelos de lesión de médula espinal, inhiben la señales de inhibición del crecimiento axonal (AGI) generadas por oligodendrocitos y astrocitos reactivos preservando los axones e inhibiendo la degradación de mielina. Además se diferencian para reemplazar los oligodendrocitos perdidos e inhiben la apoptosis de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos mediante soporte neurotrófico [6].

Las DPSCs también contribuyen al mejoramiento de la función hepática en fibrosis inducida por tetracloruro de carbono y logran diferenciarse *in vivo* a hepatocitos, si son cultivadas en condiciones de inducción hepática antes del trasplante [4]. En modelos de infarto al miocardio, se han trasplantado DPSCs mejorando la función sistólica y disminuyendo el tamaño de la lesión a través de la secreción de factores anti-apoptóticos y pro-angiogénicos como VEGF, conservando su fenotipo [40].

Naturalmente, se ha investigado su potencial en la regeneración de piezas dentales encontrando que al combinarse con matrices biocompatibles de

hidroxiapatita y fosfato de calcio generan un complejo de dentina y pulpa que contiene odontoblastos [5]. Además cuando se cultivan con células de la yema apical dental (ABC) y son trasplantadas en cápsulas renales, se obtienen estructuras muy ordenadas, compuestas de ameloblastos, esmalte, dentina, predentina, odontoblastos y pulpa dental [39].

Debido a la facilidad con que pueden obtenerse y su alta capacidad proliferativa [1,21] han despertado un gran interés en el campo de las células troncales por su posible aplicación clínica. Sin embargo, antes de trasladarlas al campo de la medicina regenerativa, debemos superar la inestabilidad citogenética que resulta de la manipulación *in vitro* [13] e identificar mecanismos, protocolos y estímulos de diferenciación específicos.

Aunque la plasticidad de las células troncales de pulpa dental es muy amplia y podríamos estudiarla en diferentes campos del conocimiento, decidimos realizar un primer acercamiento a la forma en que estas células interactúan con una parte fundamental del sistema nervioso central; la retina.

3. Retina

3.1 Organización y función de sus componentes celulares

La retina es un tejido sensible a la luz que forma parte del sistema nervioso central, se deriva del tubo neural a partir de las vesículas ópticas que al doblarse sobre si mismas forman el cáliz óptico en cuyo interior se desarrollará la retina y al exterior el epitelio pigmentado, ocupa el 72% de la superficie interna del ojo y se compone de varios tipos neuronales organizados en tres capas de somas y dos de sinapsis (ver figura 2). La retina constituye el tejido con mayor densidad de células en el cuerpo humano pudiéndose distinguir, en virtud del número y tipo de fotorreceptores, a la retina central -que es la zona circular alrededor del nervio óptico con mayor densidad de conos- de la retina periférica, que tiene un menor número de células y predominan los bastones. Entre el humor vítreo y las células ganglionares de la retina (RGC), que constituyen la primer capa de cuerpos neuronales, se encuentra la membrana limitante interna (ILM), que no es propiamente una membrana, sino una barrera formada por astrocitos y

proyecciones de las células de Müller; después se encuentra la capa plexiforme interna (IPL) que corresponde a las sinapsis entre las células ganglionares con las células horizontales, amacrinas y bipolares de la capa nuclear interna (INL); luego se encuentra la capa plexiforme externa (OPL) formada por las sinapsis de las células de la INL con los fotorreceptores de la capa nuclear externa (ONL); en la ONL se encuentran los núcleos de los fotorreceptores ; después, se encuentra la membrana limitante externa (OLM), constituida principalmente por uniones de las células de Müller y los segmentos interiores de los fotorreceptores; finalmente se encuentran los segmentos exteriores de los fotorreceptores (en forma de conos y bastones) y las células del epitelio pigmentado de la retina [14].

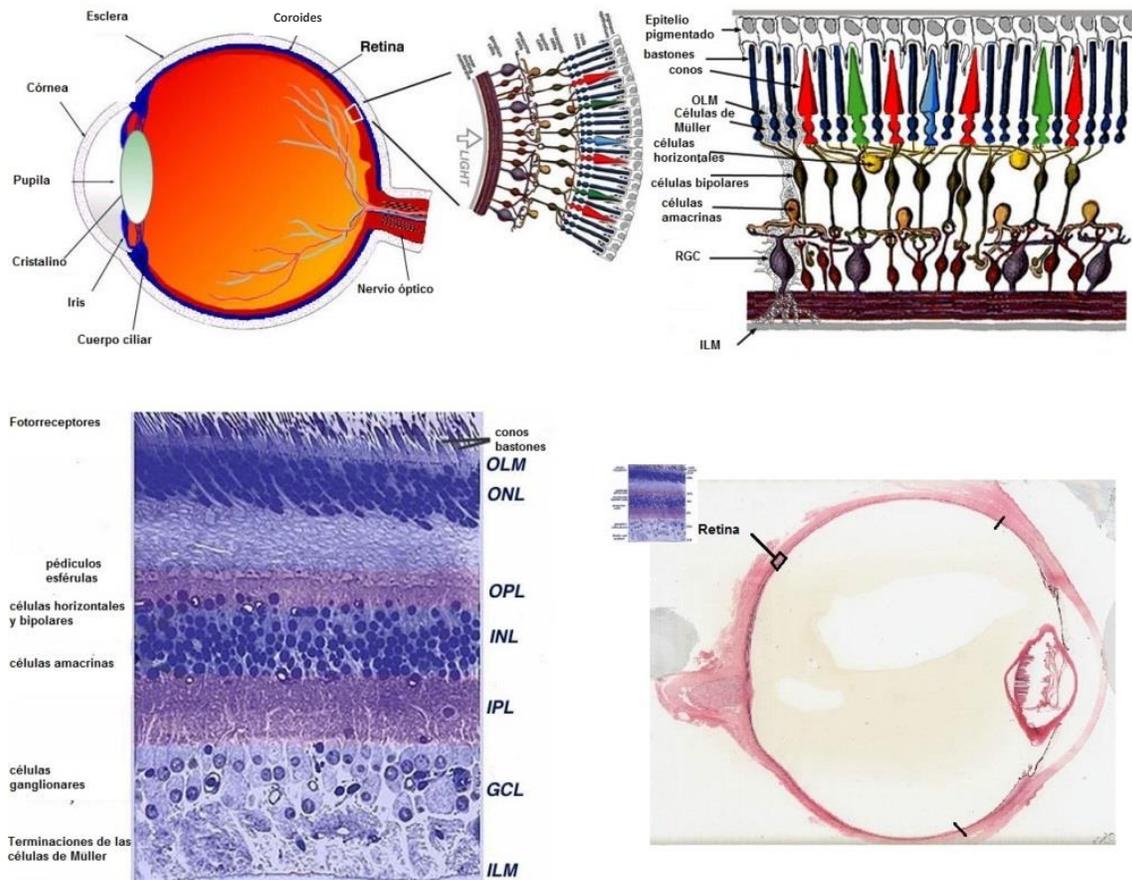


Figura 2. Esquema y microfotografía de la localización de la retina en el ojo y organización de sus componentes celulares. Modificado de [14]. OLM, membrana limitante externa; ONL, capa nuclear externa; OPL, capa plexiforme externa; INL, capa nuclear interna; IPL, capa plexiforme interna; GCL, capa de células ganglionares; ILM, membrana limitante interna.

A continuación se describe brevemente la función de los componentes celulares de la retina, comenzando con el epitelio pigmentado, seguido de los elementos que integran la retina neural (fotorreceptores, células bipolares, amacrinas, horizontales y ganglionares), para finalizar con la glía de Müller.

El epitelio pigmentado de la retina se desarrolla paralelamente a la retina neural; participa en la absorción de luz, transporte epitelial (retinal, glucosa, ácidos grasos ω 3, otros nutrientes y metabolitos) regulación espacial de iones, ciclo visual, fagocitosis de los segmentos exteriores de los fotorreceptores, secreción de antioxidantes para prevenir el daño resultante de la foto oxidación e interacción con el sistema inmune.

Los fotorreceptores se encargan de convertir los cuantos de luz que captan, en señales eléctricas a través de un proceso llamado fototransducción. Existen dos tipos de fotorreceptores: los bastones, cuyo pigmento es la rodopsina (proteína sensible a longitudes de onda de 500nm), se utilizan para ver en condiciones de baja iluminación y los conos, clasificados en L, M y S, según la variedad de opsina que contengan (sensible a 564nm, 533nm y 437nm respectivamente), responsables de la visión tricromática en el humano.

Las células bipolares son las interneuronas de la retina que transmiten las señales de los fotorreceptores a las células ganglionares, de manera que existen células bipolares específicas para los bastones y para los conos, tan solo en la retina humana se conocen 11 tipos de ellas.

Las células horizontales intercomunican a los conos y bastones. En todos los mamíferos se conocen al menos dos tipos de células horizontales, según las poblaciones que comunican ya sean bastones con los diferentes conos o conos L, M y S con S, (HI y HII respectivamente). Recientemente se encontró un tercer tipo de célula horizontal en humanos (HIII) que conecta específicamente conos M y S.

Las interneuronas amacrinas integran, modulan e interponen un dominio temporal al mensaje enviado a las células ganglionares mediante vías de inhibición lateral, hacen sinapsis en la IPL, se clasifican por el tamaño del soma, ramificación y

estratificación del árbol dendrítico, neurotransmisor y participación en la visión escotópica y fotópica.

Las células ganglionares envían el mensaje eléctrico de la señal visual hasta el cerebro ya que sus axones integran el nervio óptico. Aproximadamente, la cantidad de neuronas que convergen en cada célula ganglionar es de 15 000 conos o 75 000 bastones. Son más grandes que las demás neuronas de la retina y se clasifican bajo los mismos criterios morfológicos de las células amacrinas.

Finalmente, el principal componente glial de la retina, las células de Müller, cuyos núcleos se encuentran en la INL extendiendo procesos hacia los dos extremos de la retina; la capa limitante externa e interna (OLM e ILM). Se encargan del reciclamiento de neurotransmisores, degradación del glucógeno, fagocitosis, mantenimiento de la homeostasis y liberación de sustancias neuroactivas como GABA, taurina y dopamina [14]. Además de sus funciones homeostáticas, la glía de Müller es responsable de la regeneración de la retina en pez, anfibio y pollo [15] y, de manera limitada, en ratas [26,27], sin embargo, no es posible la regeneración de retina en mamíferos, ni existen tratamientos que detengan el curso de las retinopatías degenerativas.

3.2 Retinopatías degenerativas

Dada la compleja organización de la retina, la falla en alguno de sus elementos compromete el funcionamiento de los otros y paulatinamente, conduce a la pérdida de la visión, constituyendo un problema de salud global que afecta a más de 15 millones de personas [33]. En México hay alrededor de 700 mil personas con discapacidad ocular; se calcula que entre 40 y 50 % de los casos de ceguera se deben a la formación de cataratas, 20 a 30% a la retinopatía diabética, 15 a 25 % al glaucoma, 6 % al desprendimiento de retina, 5 % a la miopía degenerativa y 4 % a malformaciones congénitas [34]. El glaucoma, por ejemplo, es una enfermedad asociada al envejecimiento, caracterizada por el aumento en la presión intraocular que progresivamente destruye el nervio óptico integrado por los axones de las células ganglionares de la retina (RGC) en donde se ha observado una disminución del transporte retrogrado de BDNF que contribuye a su deterioro

y muerte [16]. Otra retinopatía asociada a la edad es la degeneración macular (DMAE), principal causa de ceguera en el mundo que inicia con la pérdida del epitelio pigmentado de la retina, lo cual permite el paso de fluidos hacia la fovea propiciando la muerte de los conos. La retinitis pigmentosa, en cambio, es una enfermedad hereditaria que comienza afectando a los bastones de la retina periférica, se caracteriza por la presencia de un pigmento negro y el adelgazamiento de los vasos sanguíneos cercanos al nervio óptico. Actualmente no existe una cura para estas enfermedades, simplemente son controladas mediante la administración directa de fármacos, factores neurotróficos [25,35] y cirugías láser [14].

4. Potencial de las células troncales en retinopatías degenerativas

Durante el desarrollo embrionario, las células troncales neurales (Neural Stem Cells) se diferencian en células troncales de la retina (Retinal Stem Cells) y éstas en células progenitoras (Retinal Progenitor Cells) que dan lugar a los componentes celulares de la retina. Los progenitores retinales y otras células troncales del ojo han sido utilizadas en modelos de trasplantes y diferenciación que buscan reparar y regenerar la retina, por ejemplo; las células troncales y progenitoras de la zona ciliar marginal (Ciliary Marginal Zone), del epitelio pigmentado del cuerpo ciliar (Ciliary Body Pigmented Epithelium) y del epitelio pigmentado de la retina (Retinal Pigmented Epithelium) dado que éstas células participan en la retinogénesis post natal de peces y anfibios, sin embargo, permanecen quiescentes en roedores y sólo se activan después del daño con neurotoxinas o en modelos de isquemia y lesión del nervio óptico [17]. Por ello, se han realizado estudios *in vitro* e *in vivo* con otros tipos de células troncales:

4.1 Estudios *in vitro*

El uso de células troncales *in vitro* ha logrado la diferenciación hacia progenitores de conos y bastones, glía de Müller, epitelio pigmentado de la retina, interneuronas bipolares y fotorreceptores que forman conexiones sinápticas en

cultivo [21], sin embargo el estudio de trasplantes *in vivo* proporciona información más cercana a lo que ocurre en el interior de la retina.

4.2 Estudios *in vivo*

Se ha intentado reparar la retina con células troncales embrionarias (Embryonic Stem Cells) [18], que son capaces de integrarse a la retina pero su multipotencialidad favorece la formación de tumores [23] y su uso genera polémica. Para eliminar esta disyuntiva se han trasplantado células pluripotentes inducidas [20] y células troncales de fuentes autólogas como las células mesenquimales de médula ósea (Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells) que promueven la supervivencia de fotorreceptores [24] y de células ganglionares [25] a través de la producción de factores neurotróficos, pero que no logran permanecer en la retina durante periodos prolongados [19]. Además de sobrevivir, las células trasplantadas deben establecer conexiones sinápticas funcionales con las demás neuronas de la retina para transmitir el estímulo a los centros visuales del cerebro. Esto es posible, ya que en 2012 se reportó la restauración de la función visual luego del trasplante de fotorreceptores en ratones con ceguera nocturna congénita estacionaria (*Gnat1^{-/-}*) [22]. Y en 2014 se reportó el trasplante de células de Müller humanas a ratas P23H (modelo de degeneración de fotorreceptores), obteniendo una eficiencia del 60% en la diferenciación y una mejora en la función de bastones (visión escotópica) [57].

A pesar de los importantes avances científicos, aún quedan pendientes por resolver como la integración de las células trasplantadas en la retina, la elección de una fuente apropiada de células troncales para trasplante, y la comprensión del ambiente molecular y celular de la retina después del daño.

5. Activación de señales neurogénicas en la retina luego del daño celular

La regeneración de la retina luego del daño celular ocurre normalmente en anfibios y peces, y de manera limitada en aves a través de las células de Müller, que se diferencian en los tipos neuronales perdidos. Sin embargo, existen ciertos

impedimentos para la regeneración de la retina en mamíferos, tales como la disminución en la expresión del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF) con la edad [46] y la incapacidad de expresar el factor de transcripción achaete-scute 1 (ASCL1), anteriormente conocido como MASH1 (achaete-scute 1 de mamíferos), necesario para iniciar la regeneración en retina [47] y pionero en la reprogramación directa de fibroblastos a neuronas [44].

A pesar de las limitaciones previamente descritas, la retina de rata y ratón responde al daño celular a través de diversos mecanismos que involucran la participación activa de las células de Müller, por ejemplo: 1) luego del daño provocado por una alta exposición a la luz los fotorreceptores liberan endotelina 2 (EDN2) que activa a la glía de Müller e induce la sobre-expresión del receptor a endotelina 2 (EDN2r) como indicador de estrés en respuesta al estímulo nocivo [48]; 2) después del daño con N-metil-nitroso-urea ocurre la activación de *Sonic hedgehog* (SHH) y *wingless 3* (WNT3) en las células de Müller dando lugar a la diferenciación hacia fotorreceptores [49,50] y 3) cuando se utiliza N-metil-D-aspartato para dañar la retina aumenta la expresión del factor de crecimiento insulínico (IGF) y del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) favoreciendo la diferenciación de las células de Müller en interneuronas amacrinas [46, 51, 52].

Sin embargo la presencia de estas señales neurogénicas y reparadoras no es suficiente para consumar la regeneración de la retina en mamíferos, puesto que se requiere de células que sean capaces de responder a dichas señales, diferenciarse a los diversos tipos neuronales de la retina e integrarse estableciendo conexiones funcionales con las demás células. Las DPSCs, por ejemplo, tienen receptores para FGF e IGF, además expresan endotelina 1, frizzled 4 (*FZD4* receptor de WNT), neuritina 1 (*NRN1*) [12] y factores neurotróficos [7].

En la siguiente tabla se muestra un conjunto de señales paracrinas que se acumulan en la retina luego del daño y podrían intervenir en los mecanismos de neuro-reparación.

Señales paracrinas de la retina luego del daño celular en mamíferos		
Componente de la retina / señal que sintetiza	Función	Ref.
Fotorreceptores		
Endotelina 2 (EDN2)	Indicador de estrés	48
Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF*)	Supervivencia, induce la proliferación de células de Müller	46,48
Glía de Müller		
Factor de crecimiento insulínico (IGF)	Generación de fuerzas traccionales en la retina, proliferación de células de Müller	48,66
Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)	Neuroprotección, diferenciación neuronal, anti-apoptótico	59
Factor neurotrófico ciliar (CNTF)	Neuroprotección	51
Factor de crecimiento nervioso (NGF)	Neuroprotección, regula negativamente a Bax y c-jun (apoptóticas) y positivamente a Bcl-2 (anti-apoptótica).	60
Factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF)	Neuroprotección, regula positivamente a FGF	61
Astrocitos		
Lipocalina 2*	Activación glial, regulación positiva de GFAP, BDNF	48,67
Serpina 3*	Inhibidor de proteasa de serina o cisteína	48,68
CD44	Forma parte de la ILM, involucrado en proliferación, diferenciación y migración, interacciona con osteopontina	53
Ceruloplasmina	Disminuye la producción de OH ⁻	53
Fosfoproteína secretada 1 (SPP1)	Cicatrización y remodelación tisular	53

Tabla 1. Señales paracrinas de la retina luego del daño celular en roedores. *Esta molécula también es sintetizada por la glía de Müller.

JUSTIFICACIÓN

Desde el descubrimiento de las células troncales de pulpa dental en 2000 [5] se han publicado numerosos artículos que sugieren la posibilidad de utilizarlas para trasplantes autólogos en distintas patologías y sistemas en virtud de su multipotencialidad y accesibilidad, pero no está descrito si interaccionan con la retina dañada, secretando factores neurotróficos o diferenciándose, como en otros tejidos del sistema nervioso.

HIPÓTESIS

Las células troncales de pulpa dental iniciarán un proceso de diferenciación neuronal al cultivarse en medio condicionado de retina dañada.

OBJETIVOS

1. General

Explorar la respuesta de células troncales de pulpa dental a los factores solubles del medio condicionado de explante organotípico de retina.

2. Particulares

- Mantener células troncales de pulpa dental en cultivo *in vitro*.
- Disecar la retina de ratas Long Evans para mantenerla en cultivo organotípico.
- Aislar RNA total de células troncales de pulpa dental cultivadas en medio condicionado de explante organotípico de retina.
- Establecer un modelo de daño *in vitro* para fotorreceptores en cultivo organotípico con N-metil-N-nitroso urea (MNU).
- Detectar, mediante inmunofluorescencia la expresión de GFAP, PSA-NCAM y RODOPSINA en células troncales de pulpa dental luego del cultivo con medio condicionado de explantes de retina control y dañada con MNU.
- Analizar por RT-PCR y RT-qPCR la expresión de *PAX6*, *ASCL1*, *βIII-TUBULINA*, *OTX2*, *CRX*, *NEUROD1*, *POU4F1*, *NRL*, *RODOPSINA* y *CINASA DE RODOPSINA*.

METODOLOGÍA

Se utilizaron ratas Long Evans de 14 días de edad para la obtención de cultivos organotípicos de retina, de los cuales se recolectó medio condicionado para cultivar células troncales de pulpa dental de humano. Posteriormente, se analizó la expresión de marcadores de diferenciación neural en DPSCs mediante RT-PCR, RT-qPCR e inmunofluorescencia.

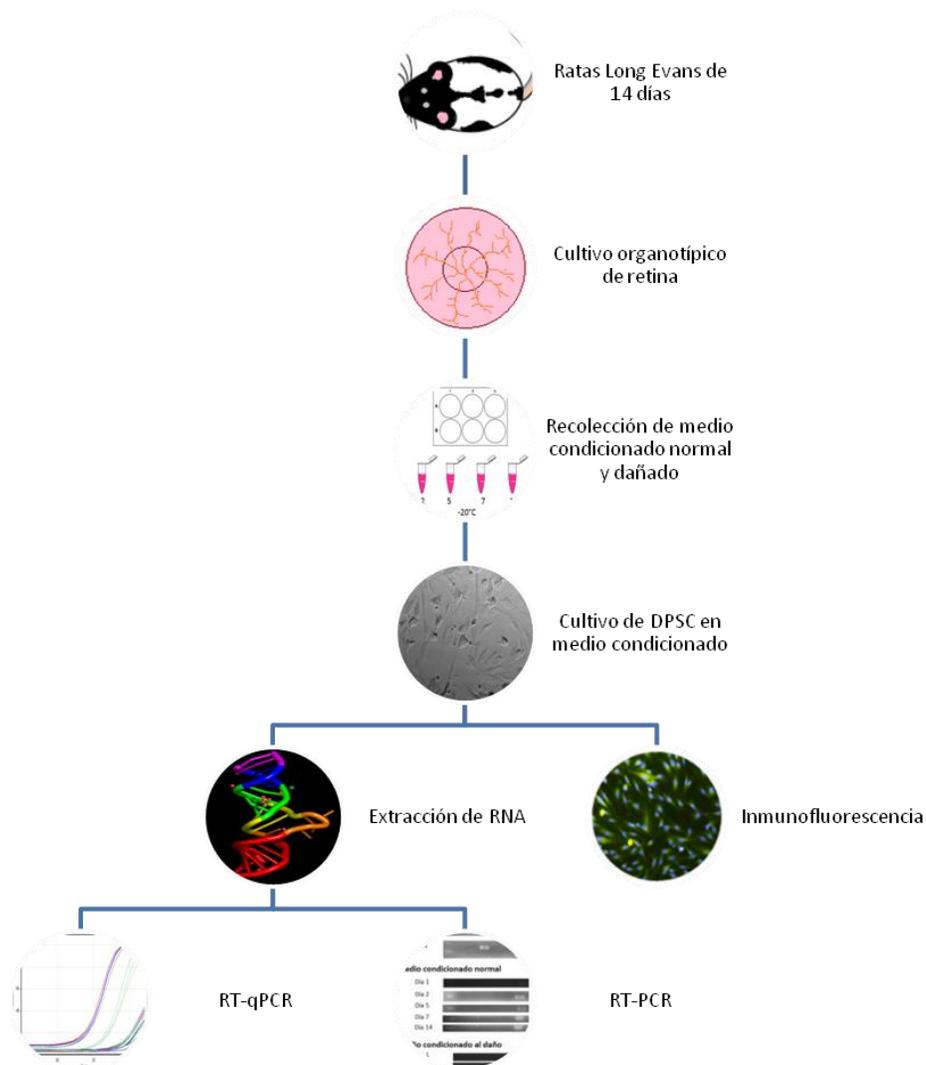


Figura 3. Esquema general de la secuencia experimental.

1. Cultivo de células troncales de pulpa dental

El aislamiento de células troncales de pulpa dental fue realizado por el personal de INDEBIOC © (Licencia de COFEPRIS 12 TR 09 011 003) previa carta de consentimiento informado (apéndice V) y la aprobación del Comité de Bioética del Instituto de Investigaciones Biomédicas. De acuerdo a la siguiente metodología:

Se colectaron terceros molares de adultos sanos entre 19 y 35 años de edad previo consentimiento informado. Los dientes fueron sumergidos en solución estéril de Hank (HBSS) con antibiótico-antimicótico (Anti-Anti Invitrogen ®, penicilina 100 U/ ml, estreptomina 100 µg/ ml y anfotericina B 0.25 µg/ ml). Se separó el tejido gingival y desinfectó la superficie dental con solución oral antiséptica baja en alcohol. Posteriormente la pulpa dental fue expuesta utilizando fórceps debidamente esterilizados y sumergida en medio DMEM suplementado con antibiótico (penicilina 100 U/ ml, estreptomina 100 µg/ ml y anfotericina B 0.25 µg/ ml). Se cortó la pulpa dental en pequeños trozos utilizando un bisturí y fue digerida parcialmente en una solución de colagenasa I 3 mg/ml durante 30 minutos a 37° C. Se inactivó la colagenasa con una solución de suero bovino fetal al 20% en medio de cultivo DMEM. La suspensión fue centrifugada a 300 g durante 10 minutos y el pellet se resuspendió en medio de cultivo Opti-MEM I ® suplementado con EGF y FGF (10µg/ ml), suero fetal bovino (2%) y antibiótico-antimicótico (penicilina 100 U/ ml, estreptomina 100 µg/ ml y anfotericina B 0.25 µg/ ml). El cultivo se mantuvo a 37°C con 5% de CO₂ y se cambió el medio de cultivo cada 2 días.

2. Cultivo organotípico de retina

El cultivo organotípico de retina se ha utilizado para estudiar al sistema nervioso central en diferentes aspectos; desarrollo, regeneración, muerte celular, neuroprotección, electrofisiología, modificaciones genéticas y trasplante celular. Debe realizarse en campana de flujo laminar y es posible mantenerlo en la incubadora hasta los 17 días *ex vivo* [36].

Para obtener este cultivo se sacrificaron ratas Long Evans de 14 días de edad con pentobarbital sódico vía IP. Los ojos fueron enucleados y colocados en una caja Petri con medio Opti-MEM I a 4°C. Sosteniendo el ojo con el cristalino hacia arriba se realizó un corte transversal a la altura del limbo y se removió la cámara anterior del ojo. La retina fue separada del cristalino y humor vítreo utilizando pinzas debidamente esterilizadas. Se transfirió la retina a un filtro para cultivo de tejidos (Millipore, no. de catálogo PICM03050) utilizando una pipeta pasteur y una perilla de succión. El filtro para cultivo de tejidos fue colocado en una placa de 6 pozos con 1 ml de medio Neurobasal suplementado con B27 (1X), N2 (1X), L-Glutamina (0.8 mM) y antibiótico-antimicótico (penicilina 100 U/ ml, estreptomina 100 µg/ ml y anfotericina B 0.25 µg/ ml). El cultivo se mantuvo a 37°C con 5% de CO₂ y cada 3 días se cambió la mitad del medio de cultivo.

3. Modelo de daño retinal con N-metil-N-nitroso urea (MNU)

La N-metil-N-nitroso urea, es un agente alquilante, que actúa por transferencia de un grupo metilo a las bases de los ácidos nucleicos, es carcinogénico, mutagénico y teratogénico [28]. Se utiliza en modelos animales de retinitis pigmentosa porque conduce a la apoptosis de fotorreceptores luego de una sola administración intraperitoneal de 60 mg/kg reduciendo drásticamente la capa nuclear externa (ONL) de la retina después de 7 días del tratamiento con MNU (ver figura 5). Actúa de manera independiente a p53 [29] e impide la translocación del factor nuclear NF-Kb, que regula genes pro- y anti-apoptóticos, mediante su degradación en un proceso en el que intervienen las enzimas Caspasa 1, 8 [30] y 12 [31]. En modelos *in vitro* se ha observado que el estrés oxidante inducido por MNU también contribuye a la eliminación de fotorreceptores [32].

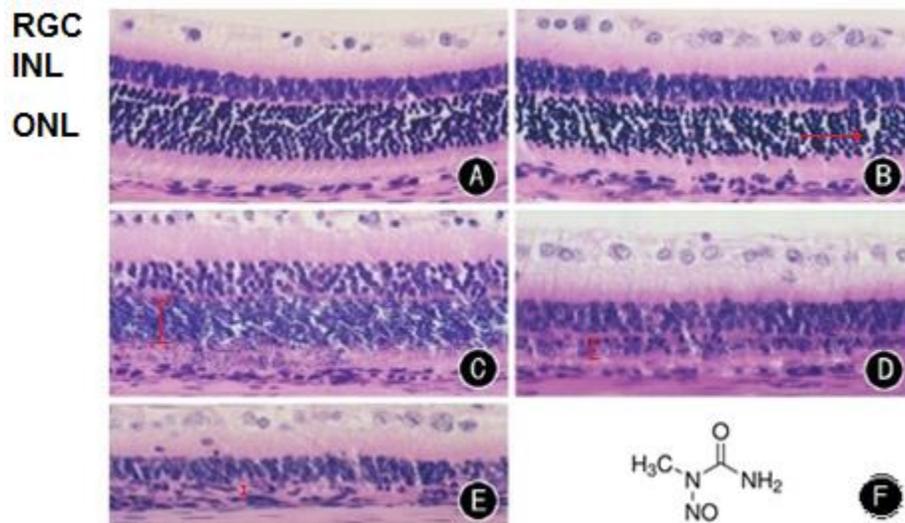


Figura 4. Progresión del daño a fotorreceptores con MNU *in vivo*. A: retina normal, B: Desorganización de los fotorreceptores a las 24 horas de la administración de MNU, C: Adelgazamiento de la ONL al tercer día de la administración, D y E: Eliminación de fotorreceptores a los 5 y 7 días del tratamiento con MNU respectivamente, F: Estructura de la N-metil-N-nitroso urea. Modificado de [30].

Este procedimiento se realizó en campana de flujo laminar. El cultivo organotípico de retina se incubó a 37°C con 5% de CO₂ con 100µg/ml de MNU en 1 ml de medio Neurobasal suplementado con B27 (1X), N2 (1X), L-Glutamina (0.8 mM) y antibiótico-antimicótico (penicilina 100 U/ ml, estreptomina 100 µg/ ml y anfotericina B 0.25 µg/ ml), después de 24 horas de incubación con MNU se recolectó el medio condicionado del cultivo organotípico de retina y se almacenó a -20° C. El medio de cultivo se reemplazó con medio nuevo sin MNU y el cultivo se mantuvo a 37°C con 5% de CO₂. Cada 3 días se cambió la mitad del medio de cultivo (Neurobasal suplementado con B27 (1X), N2 (1X), L-Glutamina (0.8 mM) y antibiótico-antimicótico).

4. Cultivo de células troncales de pulpa dental con medio condicionado de explante organotípico de retina

Este procedimiento se realizó en campana de flujo laminar. Se sembraron 10,000 células de pulpa dental por pozo en placas de 24 pozos y se cultivaron con 0.5 ml de medio condicionado de cultivo organotípico de retina control y dañada con MNU (del día 1,2,5,7 y 14 por separado, como aparece en la figura 6) y 0.5 ml de

medio Neurobasal suplementado con B27 (1X), N2 (1X), L-Glutamina (0.8 mM) y antibiótico-antimicótico (penicilina 100 U/ ml, estreptomicina 100 µg/ ml y anfotericina B 0.25 µg/ ml). El cultivo se mantuvo a 37°C con 5% de CO₂ y se cambió el medio de cultivo cada tercer día.

Se utilizó medio de cultivo para explante organotípico de retina (Neurobasal suplementado con B27, N2, L-Glutamina y antibiótico-antimicótico) como control de los experimentos. Debido a que las DPSC pueden ser susceptibles a la diferenciación neural utilizando medios de composición similar se utilizó el medio condicionado de retina (CN) como control de los factores solubles presentes normalmente en la retina (sin estímulos adversos) y el medio condicionado de retina dañada *in vitro* (CD) para incorporar los factores solubles liberados por las células de la retina cuando es dañada.

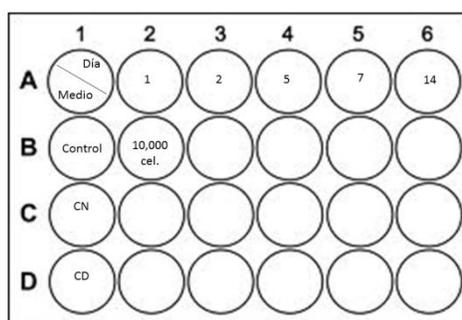


Figura 5. Representación del cultivo de células de pulpa dental con medio condicionado de explante organotípico de retina en placas de 24 pozos.

5. Ensayo colorimétrico de viabilidad celular

Este procedimiento se realizó en campana de flujo laminar. Se sembraron 150 células de pulpa dental en cajas de cultivo planas de 96 pozos con 100 µl de medio de cultivo Opti-MEM I ® suplementado con EGF y FGF (10µg/ ml), suero fetal bovino (2%) y antibiótico-antimicótico (penicilina 100 U/ ml, estreptomicina 100 µg/ ml y anfotericina B 0.25 µg/ ml). Al día siguiente se inició el tratamiento con medio condicionado de explante organotípico de retina del día 1 y 24 horas después se retiró el medio de cultivo y se agregaron 90 µl de medio de cultivo Opti-MEM I ® nuevo y 10 µl de 2-(4-yodofenil)-3-(4-Nitrofenil)-5-(2,4-Disulfofenil)-2H-Tetrazolio (WST-1) de Roche. Se incubó por 4 horas a 37 °C y 5% CO₂ y se

retiró el medio de cultivo para registrar su absorbancia a 440 nm en espectrofotómetro UV. Las DPSCs se conservaron para realizar la determinación de viabilidad con los medios condicionados de los días 2,5, 7 y 14 de manera secuencial.

6. Extracción de RNA total con Trizol ®

Para extraer RNA de células troncales de pulpa dental se retiró el medio de cultivo y se agregó 1 ml de trizol para homogeneizar las células. Luego de 5 minutos a temperatura ambiente se añadieron 0.2 ml de cloroformo y se agitó manualmente durante 15 segundos. Después de 3 minutos a temperatura ambiente se centrifugó a 12 000 x g durante 15 min a 4°C. La fase acuosa fue transferida a otro tubo y se agregaron 0.5 ml de isopropanol al 100%. Después de 10 minutos a temperatura ambiente se centrifugó a 12 000 x g durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente se retiró el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 ml de etanol al 75%. Se agitó en vórtex y centrifugó a 7500 x g durante 5 minutos a 4°C. Se decantó el etanol y el pellet fue resuspendido en 20 µl de agua libre de RNasas. Finalmente se evaporaron los restos de etanol a 55-60°C durante 15 minutos y el RNA fue almacenado a -80°C.

7. RT-qPCR

Este procedimiento se realizó utilizando el kit KAPA SYBR FAST® para RT-PCR en tiempo real de un solo paso, cada reacción tuvo un volumen final de 10µl y se preparó de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La reacción inició con la síntesis de cDNA a 42° C durante 5 min., seguida de la inactivación de la retro transcriptasa a 95° C durante 5 min. Finalmente, 40 ciclos de 95° C 30 s y 60° C 30 s.

En la siguiente página se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para el análisis por RT-qPCR de *GAPDH*, *NEUROD1*, *OTX2* y *POU4F1*.

Gen blanco	Secuencia		Producto (pb)	Función
<i>GAPDH</i>	F	AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA	108	Gen constitutivo
	R	AATGAAGGGGTCATTGATGG		
<i>NEUROD1</i>	F	ATCAATCTTCTCAGGCACCG	141	FT dif. neuronal
	R	AAACTGGCGTGCCTCTAATC		
<i>POU4F1</i>	F	TTCCAATGAGAGGCCTATGG	139	Des. de neuronas sensoriales, RGC maduras
	R	CACCAGAGTATAGGCAGGGC		
<i>OTX2</i>	F	AATCGAAGAGCTAAGTGCCG	130	FT en precursores de fotorreceptores
	R	ATTGGCCACTTGTCCACTC		

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la detección de RNAm de marcadores de diferenciación neuronal por RT-qPCR. F, cebador directo; R, cebador inverso; FT, factor de transcripción; Dif., diferenciación; Des., desarrollo; RGC, células ganglionares de la retina.

8. RT-PCR

Este procedimiento se realizó utilizando el kit Revert Aid™ para la síntesis de cDNA y el kit GoTaq® para la PCR de punto final, cada reacción tuvo un volumen final de 20µl y se preparó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La reacción se llevó a cabo en 30 ciclos de 95°C 20 s, 60°C 20 s y 72°C 20 s.

Gen blanco	Secuencia		Producto (pb)	Función
<i>ASCL1</i>	F	GAGCAACTGGGACCTGAGTC	132	FT des. neuroblastos
	R	CAAGAACTTTCAGCTGTGCG		
<i>PAX6</i>	F	CCAGCCAGACCTCCTCATAC	138	FT des. ojo y cerebro
	R	GTGAAGTGGTGCCCGAG		
<i>β3TUBULINA</i>	F	CAACAGCACGGCCATCCAGG	244	Microtúbulo neuronal
	R	CTTGGGGCCCTGGGCCTCCGA		
<i>CRX</i>	F	AGAGGGCAGGGAGCCAAATC	218	FT des. conos y bastones
	R	GCCAGTGTGTGGGGAAGAGG		
<i>NRL</i>	F	AGTCTGGAAACCTGGGTCCT	397	Des. de bastones
	R	AAGTCTCACCTCAGCCCTCA		
<i>RODOPSINA</i>	F	GCTTCCCCATCAACTTCCTCA	156	Bastones maduros
	R	AGTATCCATGCAGAGAGGTGTAG		
<i>CINASA DE RODOPSINA</i>	F	GAGGGGATAGTGGCGAAGTTT	141	Bastones maduros
	R	GAACCTCAGGAAGTACAGGCT		

Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la detección de marcadores de diferenciación neuronal por RT-PCR. F, cebador directo; R, cebador inverso; FT, factor de transcripción; Des., desarrollo.

9. Inmunofluorescencia

Las células troncales de pulpa dental y los fibroblastos de prepucio fueron fijados con para-formaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se permeabilizaron con tritón al 0.1% en solución reguladora de fosfatos (PBS) por 10 minutos y se bloquearon con una solución de albúmina de suero bovino al 3% y suero de cabra al 5% en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de retirar la solución de bloqueo se incubó el anticuerpo primario durante una noche a 4°C diluido en solución de bloqueo como se indica en la tabla 3. Se retiró el anticuerpo primario y se realizaron cinco lavados de 10 minutos con PBS. Posteriormente se incubó el anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente diluido en solución de bloqueo como se indica en la tabla 3. Después de retirar el anticuerpo secundario se realizaron cuatro lavados de 10 minutos con PBS y se tiñeron los núcleos celulares con 4-6-diamidino-2-fenilindol 142 nM (DAPI) durante 10 minutos. Se realizaron dos lavados de 10 minutos con PBS y 1 lavado de 10 minutos con agua bi-destilada. Finalmente se agregaron 20 µl de medio de montaje VectaShield y se selló la laminilla para observarla en microscopio de epifluorescencia.

Anticuerpo primario	No. de Catalogo	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
GFAP	Millipore, AB5541	1:1000	Alexafluor® cabra anti-pollo IgG 546	1:500
PSA-NCAM	Millipore, MAB5324	1:500	Alexafluor® cabra anti-ratón IgM 488	1:500
RODOPSINA	Millipore, MAB5356	1:200	Alexafluor® cabra anti-ratón IgG 488	1:500

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en la detección de GFAP, PSA-NCAM y Rodopsina.

RESULTADOS

1. Mantenimiento del cultivo organotípico de retina

Luego de disecar la retina es importante mantenerla en condiciones que le permitan conservar su estructura durante el mayor tiempo posible. Como se observa en la siguiente figura, en los primeros 9 días *ex vivo* se conservan las tres capas nucleares de la retina, sin embargo, al día 14 se ha perdido parcialmente la definición de las capas que conforman la estructura laminar.

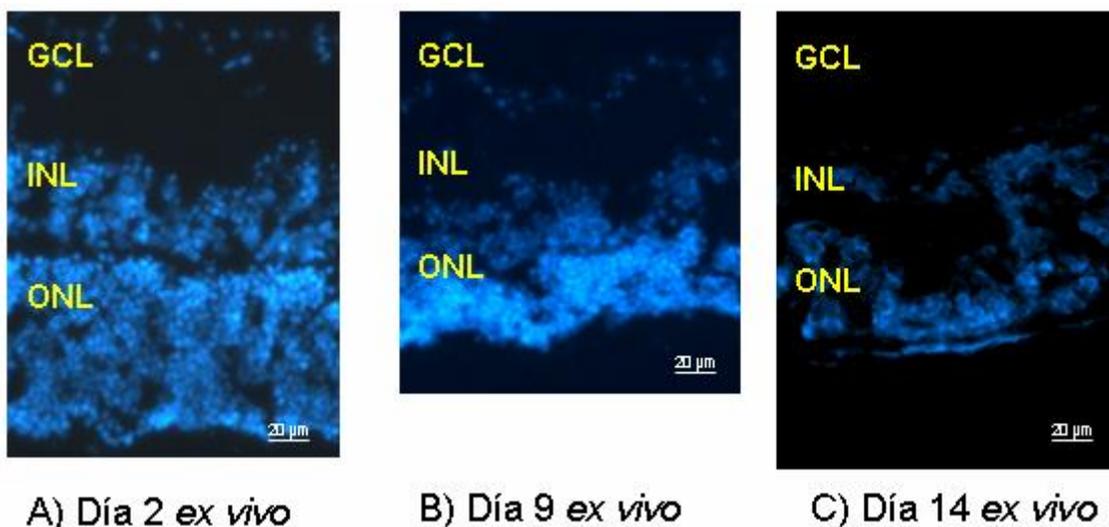


Figura 6. Seguimiento del cultivo organotípico de retina. Tinción nuclear con DAPI que muestra la progresión del cultivo organotípico de retina en medio neurobasal suplementado con B27, N2, L-Glutamina y antibiótico-antimicótico, a los 2, 9 y 14 días *ex vivo* (A, B, C). GCL capa de células ganglionares, INL capa nuclear interna, ONL capa nuclear externa. Del día 2 al 9 (A y B) se mantiene la estructura aunque disminuye la cantidad de núcleos en cada capa. Al día 14 (C) se ha perdido la estructura y es difícil distinguir las capas.

2. Modelo de daño retinal: Determinación de la dosis de MNU *in vitro*

El uso de N-metil nitroso urea para dañar la capa de fotorreceptores se ha reportado ampliamente en estudios *in vivo* [29] e *in vitro* con líneas celulares [32], sin embargo no se tenían datos de haberlo utilizado en cultivo organotípico por lo cual se determinó la dosis que produjera una disminución significativa en la cantidad de células de la capa de fotorreceptores del cultivo organotípico. Se

probaron 3 concentraciones; 100, 250 y 500 $\mu\text{g/ml}$ (figura 7 panel 1) y se cuantificó el número de núcleos en la capa de fotorreceptores luego de 24 horas en contacto con MNU (figura 7 gráfica 2C). El conteo se realizó en tres zonas de la porción central del explante (superior, media e inferior), y mediante una prueba de Fisher se determinó la dosis estadísticamente significativa. La figura 7 muestra que la dosis de 100 μg de MNU por ml de medio es suficiente para producir una desorganización y reducción evidente del número de células en las capas retinales (micrografías 1B y 2B).

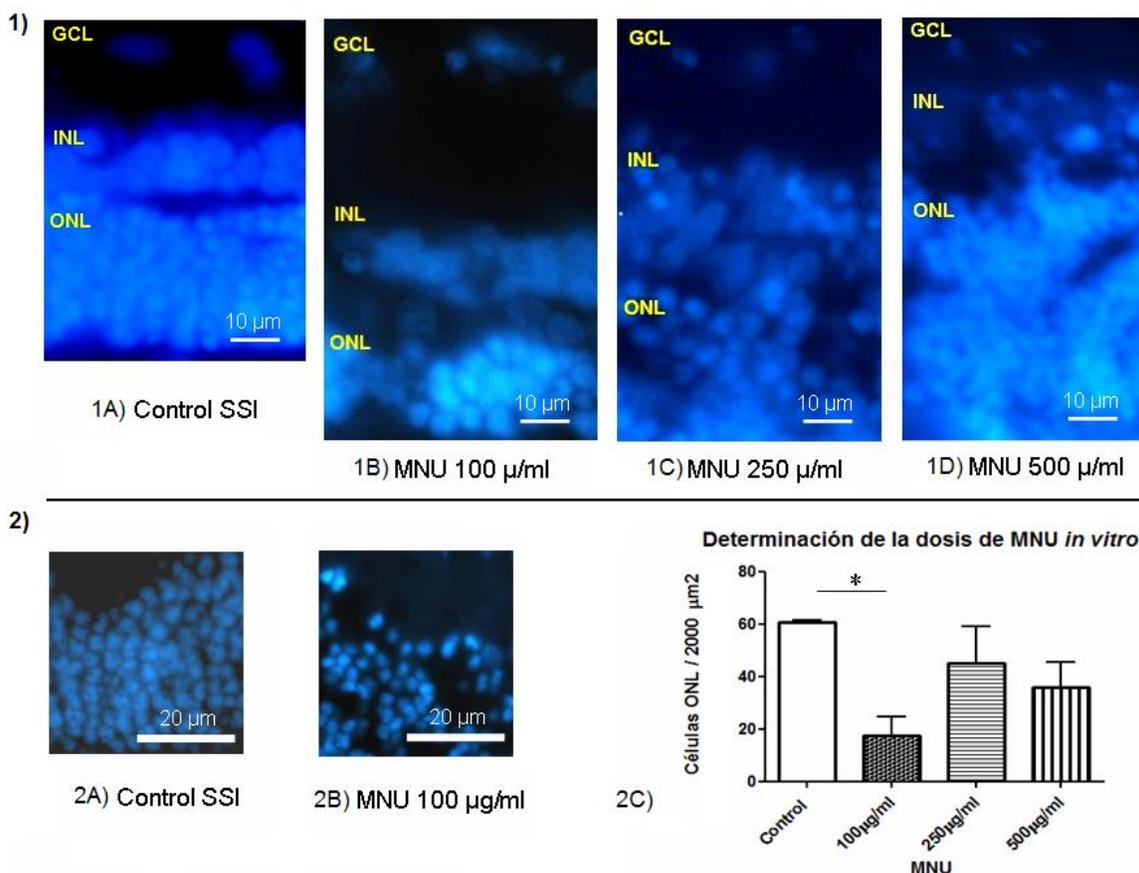


Figura 7. Determinación de la concentración de MNU *in vitro*. Panel 1) Tinción nuclear con DAPI señalando el efecto de MNU en la estructura de la retina luego de 24 horas de exposición a 3 concentraciones distintas; 1B) 100 $\mu\text{g/ml}$, 1C) 250 $\mu\text{g/ml}$ y 1D) 500 $\mu\text{g/ml}$. 1A) Control, solución salina isotónica. Magnificación 200X. Panel 2B) Efecto de 100 $\mu\text{g/ml}$ de MNU después de 24 horas de exposición Magnificación 400X. 2A) Control solución salina isotónica. 2C) Número de células en 2000 μm^2 de la capa nuclear externa (ONL) del explante organotípico de retina luego de 24 horas con 100 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$ y 500 $\mu\text{g/ml}$ de MNU (*, $p < 0.05$, prueba de Fisher, $n=3$.)

3. Las células humanas de pulpa dental desarrollan cambios morfológicos al cultivarse con medio condicionado de explante organotípico de retina

Para simular el ambiente de la retina, en condiciones control y después del daño con MNU, se recolectó el medio de cultivo de explante organotípico del día 1, 2, 5, 7 y 14 *ex vivo*, y se utilizó para cultivar células aisladas de pulpa dental durante 1 semana. Bajo estas condiciones experimentales se observaron cambios en la morfología de las células de pulpa dental cultivadas con medio condicionado de retina control (CN) y dañada (CD) tal como aparece en la figura 8.

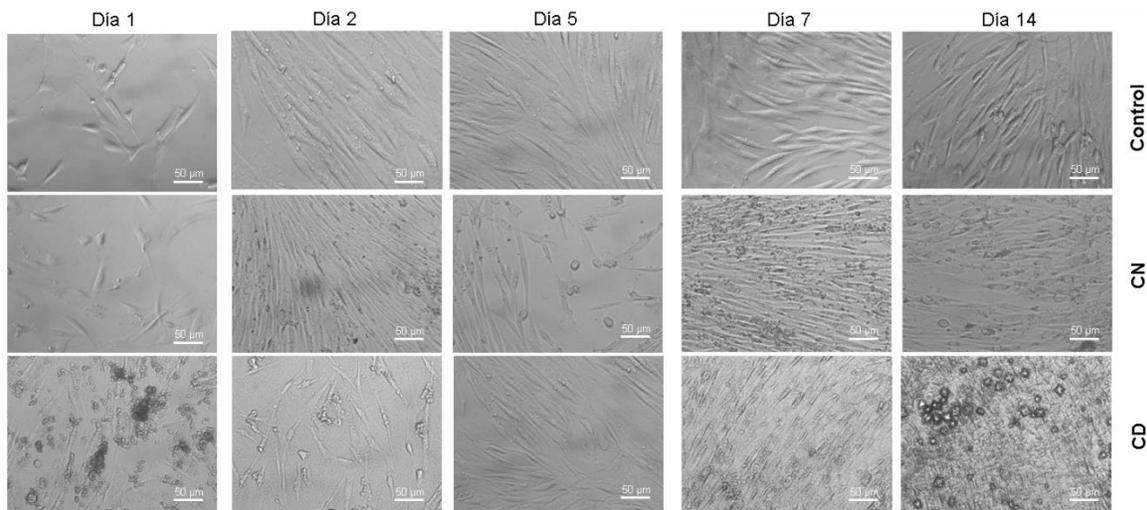


Figura 8. Fotomicrografías representativas de células aisladas de pulpa dental (DPSC) cultivadas en medio condicionado de explante organotípico de retina. Panel superior, medio para cultivo organotípico recién preparado (Control); panel central, medio condicionado de retina control (CN); panel inferior, medio condicionado de retina dañada (CD).

Como se observa en las figura 8, las células troncales de pulpa dental constituyen un cultivo heterogéneo compuesto principalmente de células fusiformes de tipo mesenquimal y, en menor proporción, de células redondas de tipo epitelial. Luego de cultivar las DPSCs en medio condicionado de retina se encontraron células de morfología poligonal, unipolar, bipolar, multipolar, y con proyecciones citoplasmáticas definidas, además de una fracción de agregados esféricos, principalmente en las DPSCs cultivadas con medio condicionado de retina dañada. El análisis cuantitativo de microscopía reveló cambios notables en la

morfología de las DPSCs cultivadas con medio condicionado de retina control (CN) y dañada (CD), con los datos de este análisis se construyó la figura 9 donde se puede observar que; 1) las DPSCs en medio para cultivo organotípico de retina (Control, figura 9 panel 'a') conservan alrededor del 60% de células fusiformes hasta el día 7, al día 5 aparece una fracción pequeña de células con proyecciones definidas (2.8 %) que aumenta hasta alcanzar un 16% al día 14, también se encontraron células de morfología esférica, poligonal, unipolar, bipolar y multipolar, pero no hubo agregados esféricos como en el cultivo de DPSCs con medio condicionado de retina; 2) en el cultivo de DPSCs con medio condicionado de retina control (CN, figura 9 panel 'b') la fracción de células fusiformes disminuye al 40% después de 1 semana en cultivo con el medio condicionado de los días 1, 2 y 5 (20% menos que el grupo control), 23% con el medio condicionado del día 7 y 16% con el medio condicionado del día 14 (al día 14 el grupo control tenía un 29 % de células fusiformes), además de la reducción en el porcentaje de células fusiformes se observó la aparición de células con proyecciones definidas en las DPSCs cultivadas con medio condicionado de retina control (CN) de los días 1,2,5,7 y 14 y la formación de agregados esféricos con el medio condicionado de los días 7 y 14 (los porcentajes aparecen en la figura 9 panel 'd' sección 'Condicionado de retina control'), y 3) en el cultivo de DPSCs con medio condicionado de retina dañada (CD, figura 9 panel 'c') la fracción de células fusiformes disminuye al 16% con el medio condicionado de retina dañada del día 2 (40% menos que el grupo control) y se observa el 35% de células con proyecciones definidas (27% más que en el grupo cultivado con medio condicionado de retina control), esta fracción disminuye al 15% en el cultivo de DPSCs con medio condicionado de retina dañada del día 5 y alcanza el 29% con medio condicionado de retina dañada del día 7 pero no se encontraron células con proyecciones definidas al cultivar DPSCs con medio condicionado de retina dañada del día 14, en este grupo experimental cabe destacar la aparición de agregados esféricos en las DPSCs cultivadas con medio condicionado de retina dañada (CD) de los días 1,2,5,7 y 14 y células esféricas en las DPSCs cultivadas con medio condicionado de retina dañada (CD) de los días 1,2,7 y 14 (los

porcentajes aparecen en la figura 9 panel 'd' sección 'Condicionado de retina dañada').

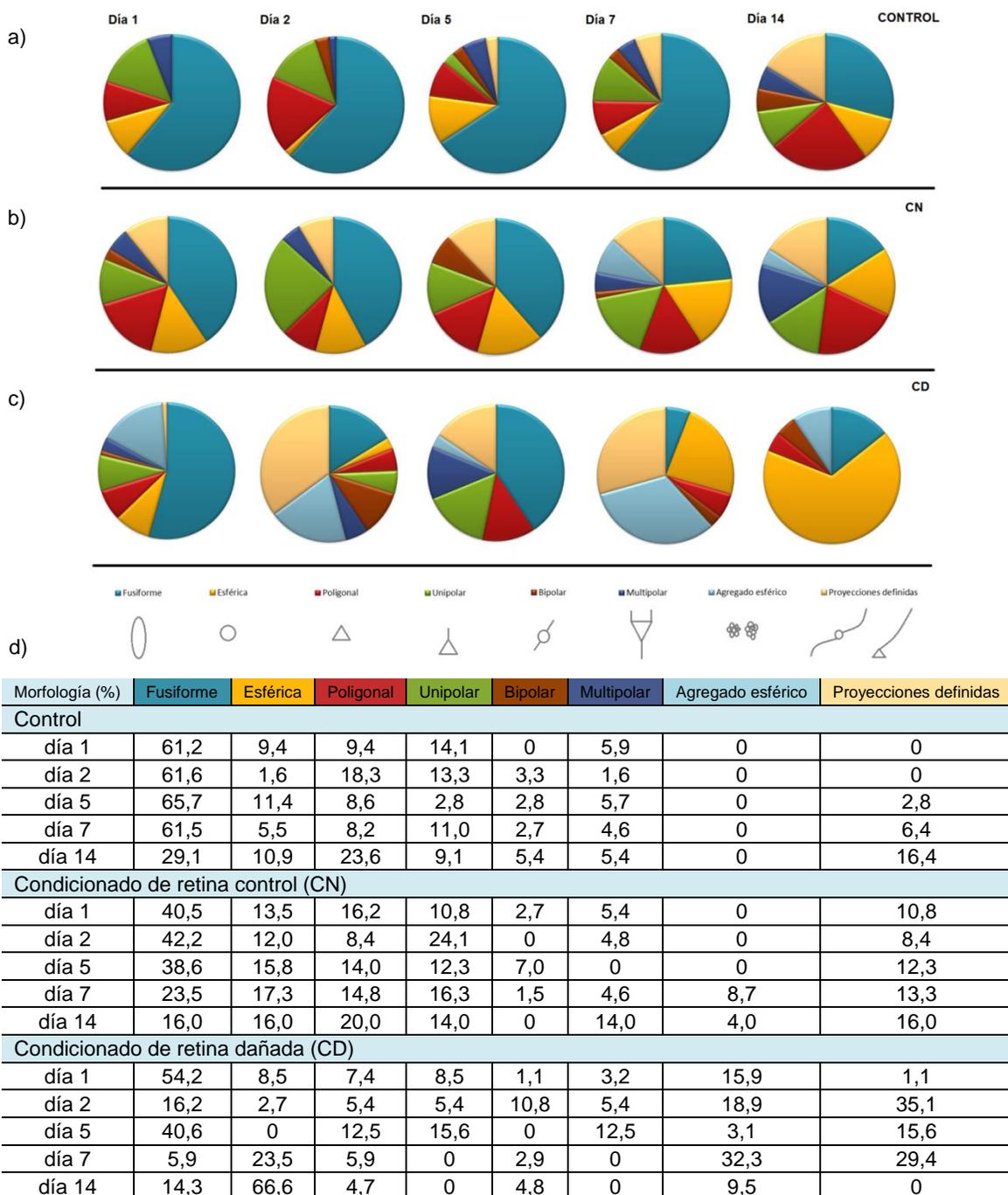


Figura 9. Morfología de las DPSCs cultivadas con medio condicionado de retina de diferentes días *ex vivo*. Se distinguen 8 categorías; fusiforme, esférica, poligonal, unipolar, bipolar, multipolar, agregado esférico y proyecciones definidas a) DPSCs cultivadas con medio para cultivo organotípico (Control); b) DPSCs cultivadas con medio condicionado de retina control (CN); c) DPSCs cultivadas con medio condicionado de retina dañada (CD); d) Tabla de porcentajes del análisis morfológico, estos datos se obtuvieron de la cuantificación manual de 32 fotomicrografías representativas de DPSCs en campo claro a 200x.

Para determinar si este efecto en la morfología, mediado por el medio condicionado de retina, ocurre en otros tipos celulares, se utilizaron fibroblastos humanos de prepucio neonatal y se observó que conservan su forma típica luego de cultivarse en medio condicionado de explante organotípico de retina control (CN) y dañada (CD) (figura 10, 'd' y 'f'), demostrando la especificidad de la respuesta de las DPSCs (figura 10, 'c' y 'e').

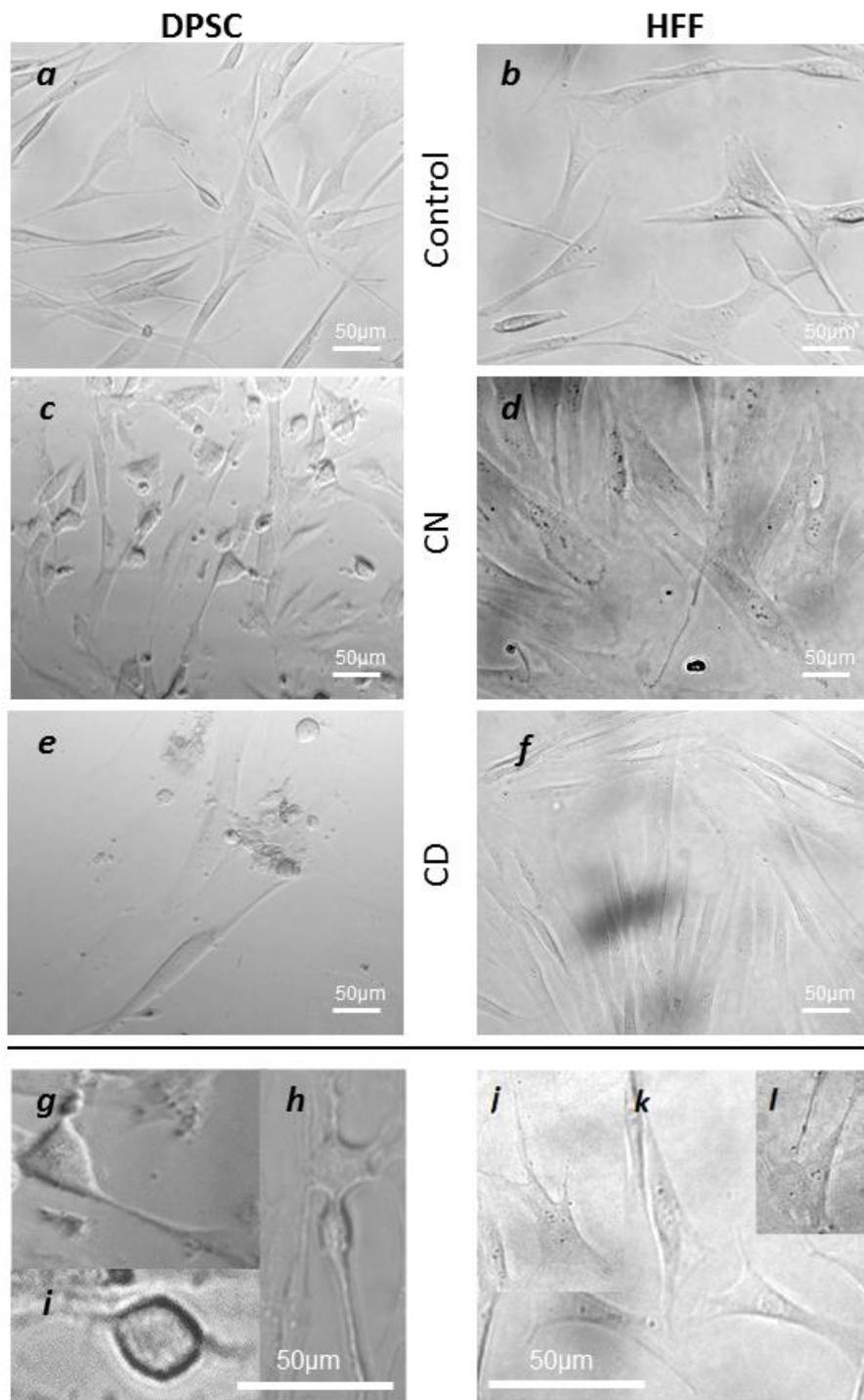


Figura 10. Fibroblastos humanos de prepucio neonatal cultivados en medio condicionado de explante organotípico de retina control y dañada. Columna izquierda, células aisladas de pulpa dental (DPSC); columna derecha, fibroblastos humanos de prepucio neonatal. *a, b*, células cultivadas en medio para explante organotípico de retina recién preparado (Control); *c, d*, células cultivadas en medio condicionado de retina control (CN) del día 14 *ex vivo*; *e, f*, células cultivadas en medio condicionado de retina dañada (CD) del día 2 *ex vivo*; *g, h*, morfologías encontradas en células cultivadas en medio condicionado de retina control del día 14 *ex vivo*.

4. El medio condicionado de retina modifica la viabilidad de las DPSC

Además de los cambios morfológicos observados al cultivar células troncales de pulpa dental con medio condicionado de retina se advirtió un cambio en el crecimiento de las DPSCs respecto al control (figura 8), para determinar si este cambio se debía a la presencia de N-metil-nitroso-urea (MNU) se realizó un ensayo colorimétrico de viabilidad con sales de tetrazolio y se observó que la MNU no afecta el crecimiento de las DPSCs (figura 11, panel 'a'). Esta prueba también se utilizó para demostrar que el medio condicionado de retina control (CN) y dañada (CD) modifica la viabilidad de las DPSCs, principalmente en el cultivo tratado con medio condicionado de retina dañada (CD) del día 5 (figura 11, panel 'b').

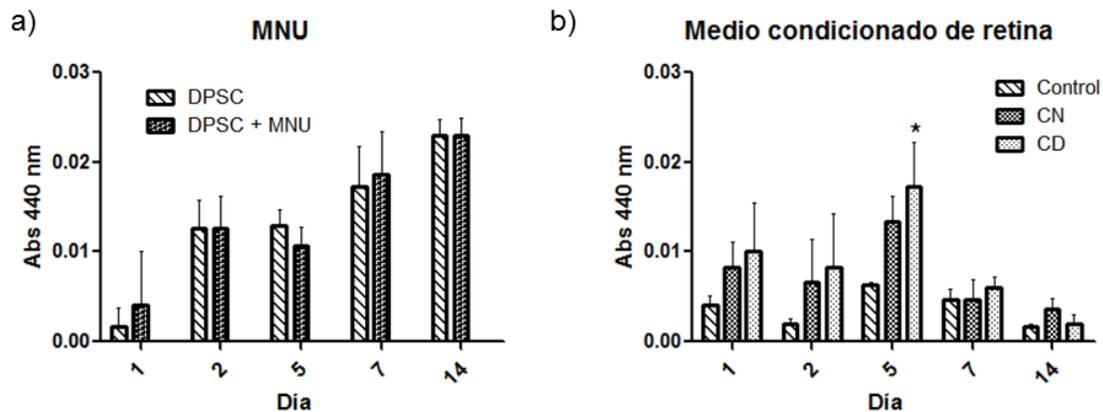


Figura 11. Efecto del medio condicionado de retina en la viabilidad de las células troncales de pulpa dental. Histogramas de la absorción a 440 nm de la forma hidrolizada del 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio (WST-1). a) Efecto de la N-metil-nitroso-urea (MNU) en la viabilidad de DPSC cultivadas en medio Opti-MEM I suplementado, luego de la medición del día 1 las DPSCs fueron cultivadas con 100µg/ml de MNU por 24 horas después de las cuales se retiró el medio con MNU y se continuo con el ensayo de viabilidad hasta los 14 días. b) Efecto del medio condicionado de retina control (CN) y dañada con MNU (CD) en la viabilidad de DPSC, Control = DPSC en medio para cultivo organotípico de retina recién preparado, CN = DPSC en medio condicionado de retina control y CD = DPSC en medio condicionado de retina dañada. (*, $p < 0.05$, análisis de varianza de 2 vías, post-prueba de Bonferroni, $n=3$).

5. Las DPSC expresan marcadores neurales al cultivarse con medio condicionado de retina

Para determinar si el medio condicionado de retina era capaz de inducir la diferenciación de las DPSCs evaluamos la inmunoreactividad a la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) como control de identidad y, la inmunoreactividad a la molécula polisialicilada de adhesión de célula neural (PSA-NCAM) como marcador de diferenciación neural. Como se observa en la figura 12, las células troncales de pulpa dental resultaron inmunopositivas a GFAP y PSA-NCAM en todos los casos, incluyendo el grupo control (figura 12, paneles 'a', 'b' y 'c'), esto se debe a que los componentes del medio de cultivo para explante organotípico de retina (B27, N2 y L-Glutamina) también se utilizan para inducir la diferenciación neural en células troncales. Para discriminar el efecto inductor del medio de cultivo 'Control' se realizó un doble marcaje GFAP/PSA-NCAM y se cuantificó la colocalización de los marcadores obteniendo el histograma que aparece en la figura 12 panel 'd'. En esta grafica se muestra que en el grupo control la mayoría de las DPSCs resultaron GFAP⁺ (54%) mientras que las DPSCs cultivadas en medio condicionado de retina control (CN) tuvieron el mayor porcentaje (18%) de células PSA-NCAM⁺ y las DPSCs cultivadas en medio condicionado de retina dañada (CD) alcanzaron el mayor porcentaje de colocalización GFAP⁺/PSA-NCAM⁺. También es importante señalar que se encontró una diferencia significativa en la expresión de GFAP y PSA-NCAM respecto del grupo control y entre las células de pulpa dental cultivadas con medio condicionado de retina.

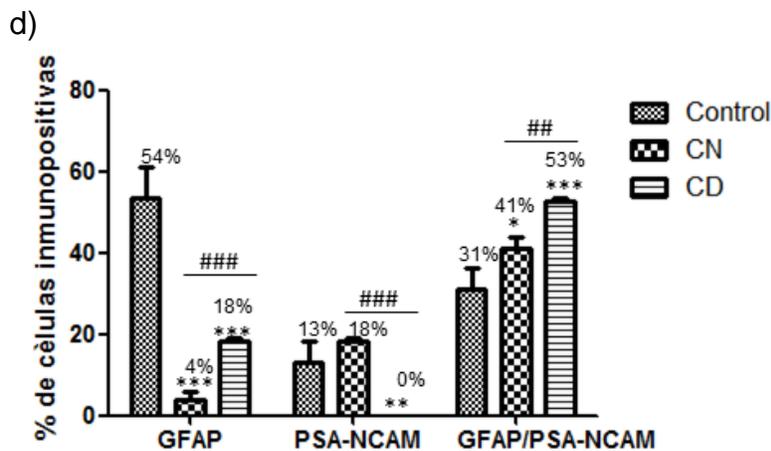
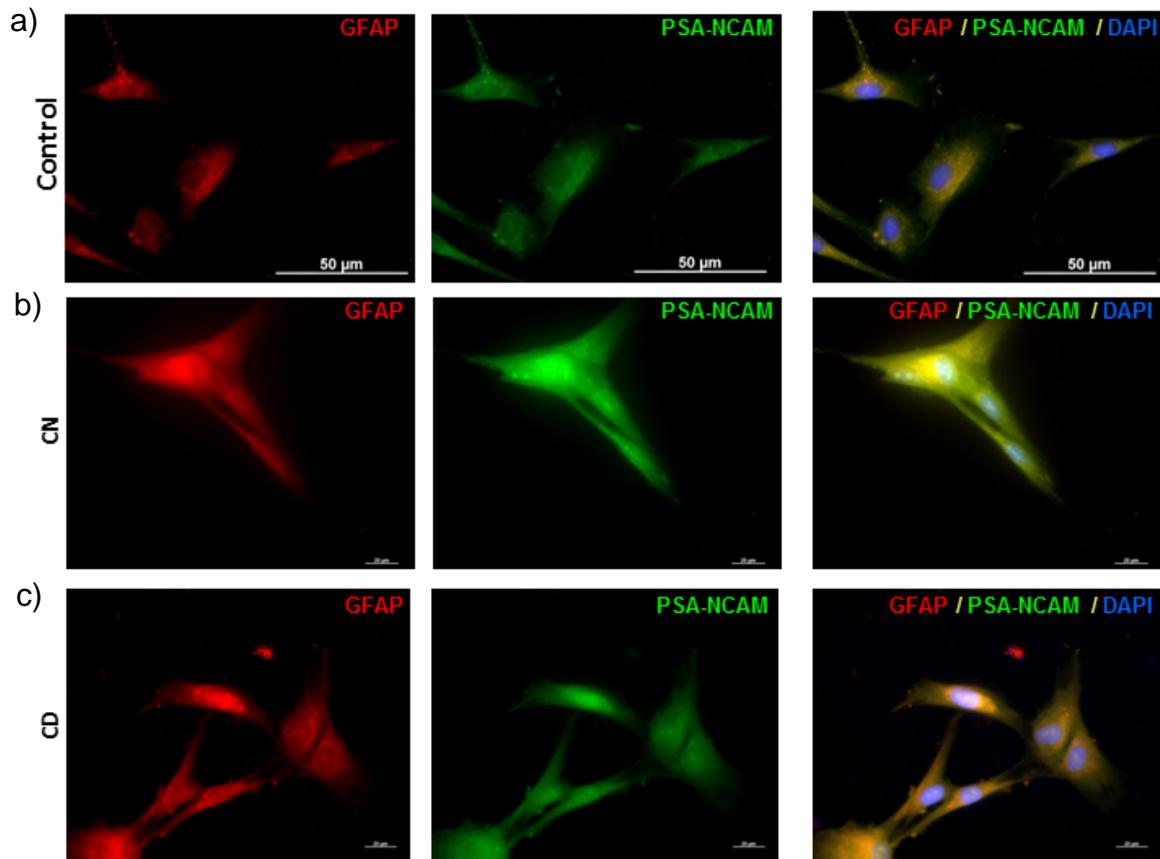


Figura 12. Células troncales de pulpa dental inmunopositivas a GFAP y PSA-NCAM luego de cultivarse por 7 días en medio a) control, b) condicionado de retina normal (CN) y c) dañada (CD) del día 7 *ex vivo*. Control = medio para cultivo organotípico recién preparado. a) Magnificación 20X, barra de calibración = 50 μ m, b) y c) Magnificación 40X, barra de calibración = 20 μ m.

d) Porcentaje de células inmunopositivas a GFAP y PSA-NCAM (***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$ ###, $p < 0.001$; ##, $p < 0.01$; Análisis de varianza de 2 vías, post-prueba de Bonferroni, $n=3$).

Para complementar este análisis, evaluamos la expresión por RT-PCR de otros marcadores de diferenciación neural (*PAX6*, *β 3-TUBULINA*, *POU4F1*, *OTX2*, *ASCL1* y *NEUROD1*), encontrando que el medio 'Control' induce la expresión de *OTX2* y *NEUROD1* que también se expresan en las células aisladas de pulpa

dental cultivadas con medio condicionado de retina control (CN) y dañada (CD), sin embargo *POU4F1* es detectable por RT-PCR únicamente en las DPSCs cultivadas con medio CD. Debido a la aparente diferencia en la expresión de *POU4F1*, *OTX2* y *NEUROD1* (figura 13 panel 'a') analizamos su expresión relativa a *GAPDH* mediante RT-PCR cuantitativa (figura 13 panel 'b') y observamos que, aunque la expresión de *NeuroD1* no se ve afectada por el medio de cultivo, la diferencia en la expresión de *POU4F1* y *OTX2* si es significativa entre los dos tratamientos con medio condicionado.

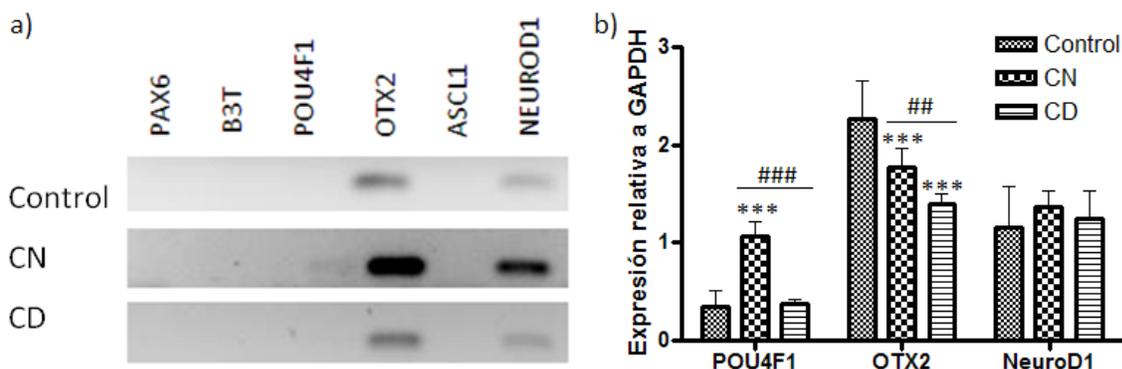


Figura 13. Expresión de marcadores de diferenciación neural en células aisladas de pulpa dental. a) Análisis por RT-PCR. Control, medio para explante organotípico de retina recién preparado; CN, medio condicionado de retina control; CD, medio condicionado de retina dañada con MNU. b) Histograma de la expresión relativa a *GAPDH* (Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa) de *OTX2*, *NeuroD1* y *POUF41* en células aisladas de pulpa dental cultivadas con medio condicionado de retina control y dañada. (***, $p < 0.001$; ##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$, Análisis de varianza de 2 vías, post-prueba de Bonferroni, $n=3$).

Debido a que *OTX2* y *NEUROD1* son factores de transcripción importantes en el desarrollo y diferenciación de las neuronas de la retina se evaluó la expresión de rodopsina, marcador molecular característico de fotorreceptores, y se observó que el 44% de los cultivos de DPSCs tratados con medio condicionado de retina dañada resultaron inmunoreactivos a este marcador (figura 14). Para complementar este hallazgo se evaluó por RT-PCR la expresión de otros marcadores de fotorreceptores: *NRL*, *CRX*, *RODOPSINA* y *CINASA DE RODOPSINA* encontrando *NRL*, *CRX* y *RODOPSINA* únicamente en el grupo de DPSCs cultivadas con medio condicionado de retina dañada.

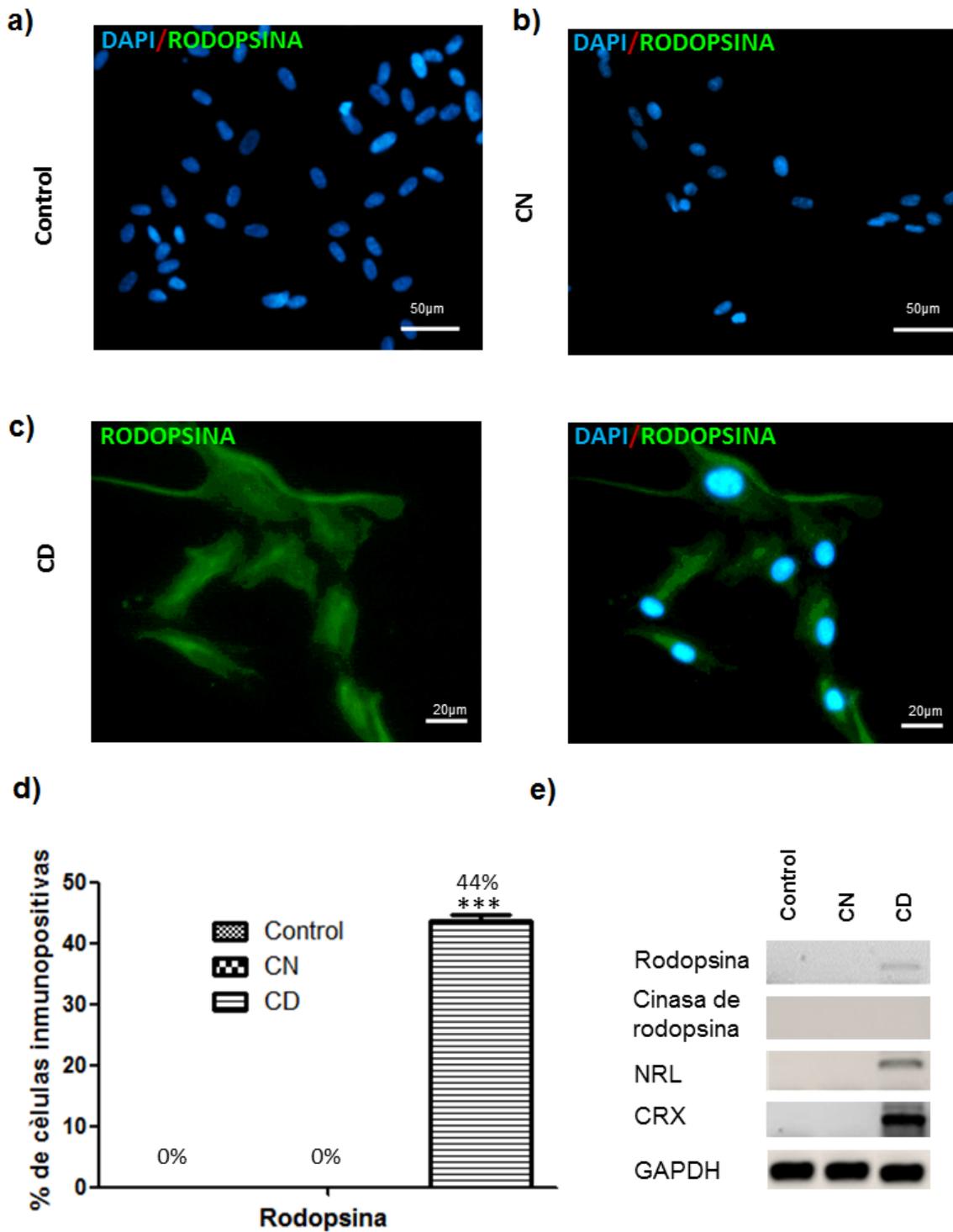


Figura 14. Inmunorreactividad a rodopsina. Células aisladas de pulpa dental luego de cultivarse por 7 días en medio a) control, b) condicionado de retina normal (CN) y c) dañada (CD) del día 2 ex vivo. Control = medio para cultivo organotípico recién preparado. a) Magnificación 20X, barra de calibración = 50 µm, b) y c) Magnificación 40X, barra de calibración = 20 µm. d) Porcentaje de células inmunorreactivas a rodopsina (***, $p < 0.001$; Análisis de varianza de 2 vías, post-prueba de Bonferroni $n=3$). e) RT-PCR de marcadores de fotorreceptores.

La diferencia entre la morfología y expresión de PSA-NCAM, GFAP, OTX2, POU4F1, NRL, CRX y RODOPSINA de las DPSCs cultivadas con medio condicionado de retina sugiere que el medio condicionado de retina dañada tiene factores solubles distintos a los del medio condicionado de retina control y estos determinan la respuesta de las DPSC como puede observarse en la siguiente tabla.

DPSC			Medio de cultivo		
			Control	CN	CD
% células fusiformes	Día	1	61.2	40.5	54.2
		7	61.5	23.5	5.9
% células con proyecciones definidas	Día	1	0	10.8	1.1
		7	6.4	13.3	29.4
% agregados esféricos	Día	1	0	0	15.9
		7	0	8.7	32.23
Cultivadas con medio condicionado del día 7 <i>ex vivo</i>	% GFAP ⁺		54	4	18
	% GFAP+/PSA-NCAM ⁺		31	41	53
	% PSANCAM ⁺		13	18	0
	OTX2		✓	✓	✓
	NEUROD1		✓	✓	✓
Cultivadas con medio condicionado del día 2 <i>ex vivo</i>	POU4F1		-	✓	-
	% RODOPSINA ⁺		0	0	44
	NRL		-	-	✓
	CRX		-	-	✓
	RODOPSINA		-	-	✓
CINASA DE RODOPSINA		-	-	-	

Tabla 5. Tabla resumen de la respuesta de células troncales de pulpa dental (DPSC) al medio condicionado de retina control (CN) y dañada (CD). ✓, detectado por RT-PCR, -, no detectado.

Finalmente, para verificar la especificidad de la respuesta de las DPSCs utilizamos fibroblastos humanos de prepucio neonatal y observamos que no resultan inmunoreactivos a GFAP, PSA-NCAM ni rodopsina (figura 15) luego de cultivarse en medio condicionado de explante organotípico de retina normal y dañada.

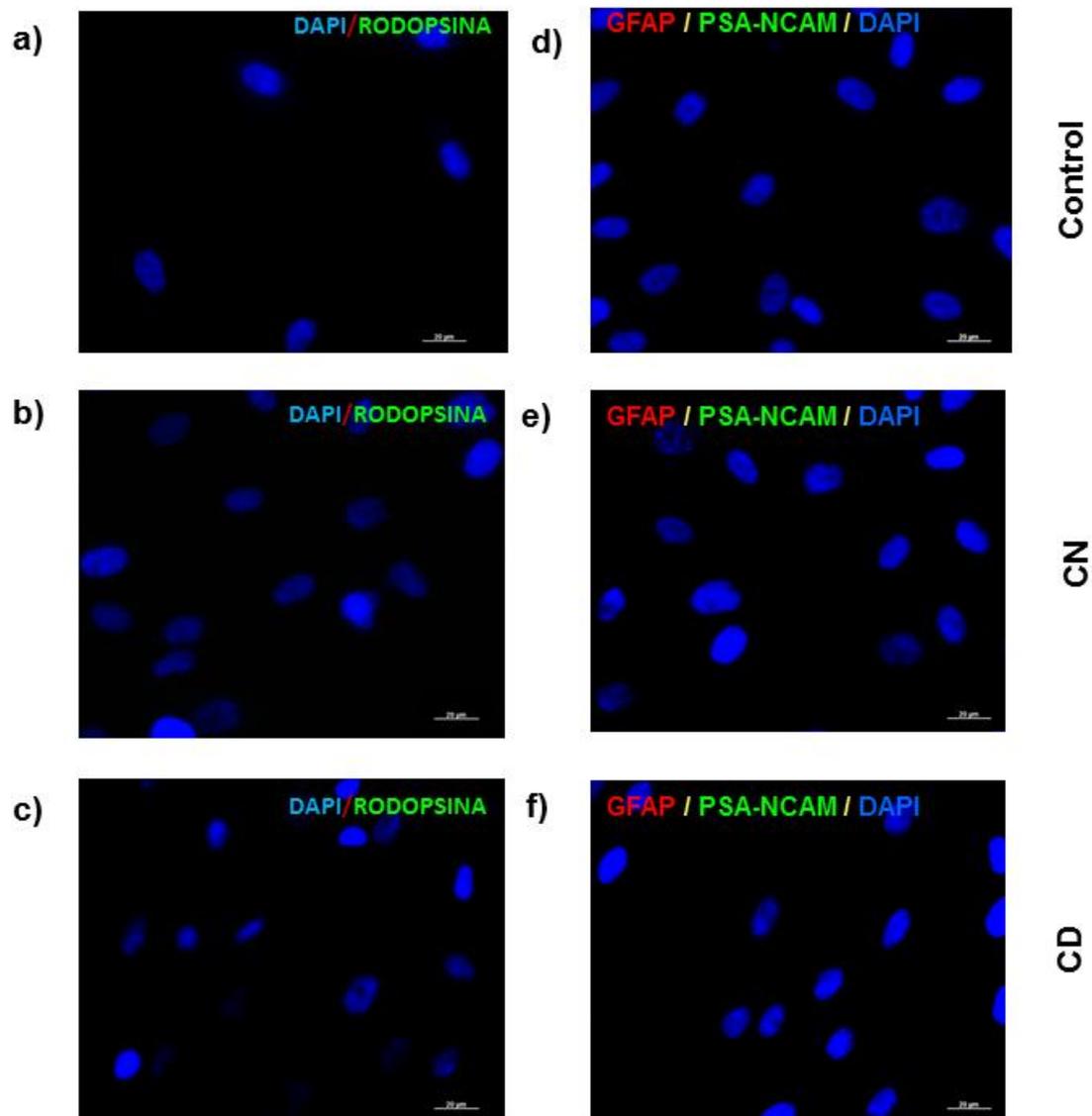


Figura 15. Inmunoreactividad a Rodopsina, GFAP y PSA-NCAM de fibroblastos humanos de prepucio neonatal cultivados en medio condicionado de explante organotípico de retina control (CN) y dañada (CD) con MNU. Columna izquierda inmunoreactividad a rodopsina, columna derecha inmunoreactividad a GFAP y PSA-NCAM; a) y d), fibroblastos cultivados en medio para cultivo organotípico recién preparado (control); b) y e), fibroblastos cultivados en medio CN del día 14 *ex vivo*; c) y f), fibroblastos cultivados en medio CD del día 2 *ex vivo*.

DISCUSION

1. Determinación de la dosis de MNU *in vitro*

La N-metil-nitrosourea (MNU) es un conocido agente alquilante que se utiliza para inducir cáncer mamario y retinitis pigmentosa en modelos animales, los efectos órgano-trópicos dependen de la dosis, frecuencia, ruta y edad de administración [69] generalmente se utiliza una sola dosis intraperitoneal de MNU (60 mg/kg) para inducir la ablación de la capa de fotorreceptores y se sabe que con 75 mg/kg se obtiene el mismo efecto, pero no hay reportes del efecto de dosis mayores en la retina. También está reportado que la administración de 100 µg/ml de MNU es suficiente para producir radicales libres en la línea celular 661W de fotorreceptores de manera comparable al peróxido de hidrogeno y que no ocurre lo mismo en la línea RGC-5 de células ganglionares [32]. No se encontraron reportes del uso de MNU en cultivo organotípico, por ello se determinó la dosis necesaria para destruir la capa de fotorreceptores en cultivo organotípico de retina y se encontró que luego de 24 horas de incubación con 100 µg/ml de MNU hay menos células en la capa nuclear externa en comparación con las dosis de 250 µg/ml y 500 µg/ml de MNU.

Esto podría deberse a que los agentes alquilantes que interaccionan directamente con el DNA (como la MNU) entran a la célula por difusión [70] de modo que en el cultivo organotípico de retina la MNU puede difundirse a todas las células que lo componen (incluyendo la glía de Müller) ya que no existe una barrera que controle su entrada como ocurre en la administración de MNU *in vivo*, en tal caso, la MNU debe atravesar la barrera hemato-retiniana que está compuesta por el endotelio vascular retinal y el epitelio pigmentado de la retina (el epitelio pigmentado de la retina está en contacto directo con los segmentos exteriores de los fotorreceptores, figura 2) para llegar a los fotorreceptores. Si la molécula se difunde al interior de las células de Müller podría ser inactivada por la cantidad de glutatión intracelular que estas poseen ya que la resistencia a los compuestos alquilantes está asociada a niveles incrementados de glutatión intracelular [70] y la velocidad de difusión depende de la concentración de la molécula en solución. De manera que una mayor concentración de MNU podría difundirse a mayor

velocidad e inactivarse consecuentemente. Además, cualquier estímulo nocivo activa a la glía de Müller y la liberación de compuestos antioxidantes (glutación, piruvato, α -cetoglutarato, metalotioneína, lisozima, ceruloplasmina, hemoxigenasa y ascorbato reducido) es uno de sus principales mecanismos de defensa [71]. También es posible que la curva dosis-respuesta de la N-metil-nitrosourea en cultivo organotípico de retina no sea lineal y requiera ser estudiada a través de un modelo matemático más complejo, como sucedió con los compuestos genotóxicos alquilantes etil-nitroso urea (ENU) y metil-metanosulfonato (MMS) [72].

2. Cinética de crecimiento

La capacidad de proliferar de una célula, depende de su estado de diferenciación, así como de los factores extrínsecos e intrínsecos que regulan el ciclo celular. Generalmente la transición entre las fases S, M y G_2 ocurre a tiempos similares (8, 1 y 2 horas respectivamente) entre distintos tipos de células eucariontes, en tanto que la transición de la fase G_0 a G_1 cambia con el tipo celular y está regulada por factores extrínsecos de respuesta al medio ambiente [37]. Para obtener una estimación indirecta de la proliferación de las DPSC en el ambiente de la retina, analizamos la viabilidad de células de pulpa dental cultivadas con medio condicionado de cultivo organotípico de retina control (CN) y dañada con MNU (CD). Habiendo establecido que la MNU no altera el crecimiento de las DPSCs (figura 11 panel 'a') analizamos el efecto de los medios CN y CD en la viabilidad y observamos que en los primeros 7 días de tratamiento hay un mayor número de células viables en el grupo cultivado con medio CD, este efecto puede apreciarse en las imágenes de la figura 8 donde aparentemente hay un mayor número de células en el grupo CD en comparación con los grupos Control y CN, y podría deberse a la presencia de factores de crecimiento liberados por los elementos gliales de la retina luego de la lesión con MNU ya que las DPSCs son sensibles a factores neurotróficos. En el panel 'b' de la figura 11 también se observa que hay más células vivas en el grupo CN respecto del Control, pero solamente se encontró un punto estadísticamente significativo en el día 5 del grupo CD y es precisamente en este día de tratamiento (5) que se detectó un pico de crecimiento

para todas las condiciones (Control, CN y CD) lo cual podría estar relacionado con un proceso de diferenciación -debido a la naturaleza inductora del medio Control y potenciado por los factores solubles en el medio condicionado- en el cual la fracción de células progenitoras ha terminado de dividirse y continua la maduración de las células hijas. Es importante recordar que al quinto día de cultivo con medio Control se detectó la aparición de células con proyecciones citoplasmáticas definidas (similares a las proyecciones neuronales) en el grupo Control (figura 9 paneles 'a' y 'd'). Normalmente el cultivo de DPSCs es adherente, sin embargo esta reportado que después de inducir la diferenciación neural, un gran número de DPSCs viables se despegan del plato de cultivo [9] lo cual podría explicar la disminución del número de células vivas en los días 7 y 14 del ensayo colorimétrico de viabilidad (figura 11 panel 'b') ya que es necesario cambiar el medio de cultivo antes de realizar el ensayo.

Esta cinética particular de crecimiento podría deberse tanto a un proceso de inducción de muerte celular como a la salida del ciclo celular por activación de un proceso de diferenciación neuronal que involucra una extensa maquinaria de proteínas e interacciones célula-célula [62] que conducen a la expresión de marcadores neuronales y causan el reordenamiento del citoesqueleto revelando cambios morfológicos como los que se discuten a continuación.

3. Cambios morfológicos

No es de extrañar que las células troncales de pulpa dental, por su origen ectomesenquimal, puedan diferenciarse hacia neuronas si consideramos que en la determinación de su perfil de expresión génica, se encontraron 18 genes involucrados en la diferenciación neuronal (GO:0030182) [12] que contribuyen directamente a la diferenciación de neuronas amacrinas y bipolares de la retina.

Es posible que este aparente proceso de diferenciación este mediado por sustancias neuroactivas provenientes de la retina, tales como ácido retinoico, GABA, glutamato y factores neurotróficos sintetizados por la glía de Müller y las células ganglionares, además del efecto que ejerce el medio de cultivo Control per se, ya que la expresión de marcadores neurales tempranos como nestina y β -

3tubulina puede inducirse en las DPSCs simplemente cultivándolas en medio libre de suero [38]. Los factores solubles presentes en los medios de cultivo utilizados (Control, CN y CD) ocasionaron cambios morfológicos en las DPSCs y para facilitar su análisis se establecieron 8 categorías: fusiforme, esférica, poligonal, unipolar, bipolar, multipolar, agregado esférico y células con proyecciones definidas.

Debido a la heterogeneidad del cultivo de DPSCs se distinguen 2 morfologías relevantes para este análisis; las células fusiformes y aquellas con proyecciones citoplasmáticas definidas y somas pequeños similares a neuronas. La morfología fusiforme es característica de las DPSCs en tanto que las células con proyecciones definidas no suelen encontrarse en el cultivo de DPSCs y podrían ser resultado del proceso de diferenciación mediado por el medio condicionado de retina. En la figura 9 se puede observar que la inducción de cambios morfológicos es menor en el grupo Control y que el porcentaje de células fusiforme se mantiene constante respecto de los grupos CN y CD, esto podría indicar que el medio condicionado de retina contiene factores solubles que potencian los cambios morfológicos y disminuyen el número de células con morfología típica de DPSCs (fusiformes). Además las diferencias encontradas en la morfología de DPSCs cultivadas con CN y CD sugiere que la composición del medio condicionado de retina control es diferente a la del medio condicionado de retina dañada y esto podría deberse a los factores solubles liberados por los componentes gliales en condiciones basales (CN) y luego de ser activados por la lesión con MNU (CD). Cabe resaltar que el menor porcentaje de células con morfología fusiforme (6%) se encontró en el grupo CD y también en este grupo se encontró el mayor porcentaje de células con morfología de tipo neuronal (35%).

Estas observaciones revelan la capacidad intrínseca y propia de las DPSCs para responder a las señales ambientales provenientes del medio condicionado como las que se mencionan en la tabla 1. Aunque no se realizó un estudio para determinar la composición del medio condicionado de retina (HPLC, espectrometría de masas, ELISA, etc.) sí se analizaron algunos marcadores de

diferenciación neuronal para detallar el efecto que producen los factores solubles presentes en el medio condicionado de retina en las DPSCs.

4. Expresión de marcadores de diferenciación neuronal

Para verificar el proceso de diferenciación neuronal inducido por el medio condicionado de retina, analizamos la inmunoreactividad a un marcador neuronal temprano: PSA-NCAM, él se expresa antes de β III-tubulina durante el desarrollo y se utiliza para seleccionar células neuronales inmaduras del tubo neural [42] y precursores neuronales de la zona subventricular [43] y, para observar si las DPSC mantenían su identidad luego de ser cultivadas con medio condicionado, analizamos la inmunoreactividad a GFAP, marcador característico de células troncales de pulpa dental. Como se aprecia en la figura 12, el porcentaje de células inmunoreactivas a GFAP disminuyó de manera estadísticamente significativa entre los cultivos con medio condicionado en las células cultivadas con medio CN y CD, de 54% en el grupo Control a 4% y 18% respectivamente ($p < 0.001$). Esto sugiere que hay más células que conservan su identidad en el grupo control en comparación con los grupos CN y CD, aunque el 41% y 53 % de las DPSCs cultivadas con medio condicionado (CN y CD respectivamente) co-expresan el marcador de identidad GFAP con el de diferenciación neuronal PSA-NCAM. La co-expresión de un marcador de identidad con uno de diferenciación ha sido reportada previamente y es posible que se deba a los mecanismos de regulación epigenética que mantienen el estado diferenciado de una célula. La memoria epigenética podría ser la causa del bajo porcentaje de células que resultaron inmunopositivas a PSA-NCAM únicamente: 18% para CN y 0% para CD. También se encontró que el 37% de células en el grupo CN y el 29% en el grupo CD no resultaron inmunopositivas a GFAP ni a PSA-NCAM por lo que posiblemente se encuentren en otra etapa de diferenciación, expresando marcadores previos o posteriores a PSA-NCAM, como NeuroD1 o β III-tubulina (fig. 16).

Considerando que el proceso de diferenciación neuronal inducido por el medio condicionado pudiera conducir a la diferenciación hacia elementos neuronales de

la retina, analizamos la expresión de *PAX6*, *βIII-TUBULINA*, *POU4F1*, *OTX2*, *ASCL1* y *NEUROD1* (figura 13), confirmando el efecto inductor del medio Control y la predisposición que estas células tienen para diferenciarse hacia linajes neuronales debido a su origen ectomesenquimal. Además, está descrito que *OTX2* está involucrado en el desarrollo de células bipolares [44], regula negativamente a *Pax6*, y positivamente la expresión de factores de transcripción involucrados en la determinación y especificación de fotorreceptores como *CRX*, *NRL* y *NEUROD*, entre otros [45], por lo que no es de extrañar haberlos detectado en las células cultivadas con medio condicionado de retina dañada (figura 14). No se detectó la expresión de *PAX6*, posiblemente debido a la presencia de *OTX2* que lo regula negativamente, ni de *ASCL1*, marcador de progenitores retinales que dan origen a todos los tipos neuronales de la retina excluyendo a las células ganglionares [44] lo cual coincide con la incipiente aparición de *POU4F1*. Recordando la cadena de factores de transcripción que se expresan durante el desarrollo del sistema nervioso (figura 16) también es posible que al momento de realizar el análisis, *PAX6* hubiera dejado de expresarse y habría que realizar un seguimiento temporal de la expresión de dichos factores para determinar hasta qué punto, el medio condicionado de retina es capaz de inducir la diferenciación hacia linajes neuronales en células aisladas de pulpa dental.

SOX2 → PAX6 → ASCL1 → OTX2 → NEUROD1 → PSA-NCAM → β3T

Figura 16. Factores de transcripción necesarios para el desarrollo de los componentes del sistema nervioso.

La evidencia experimental apunta al inicio de un proceso de diferenciación neuronal que incluye la expresión de marcadores neuronales tempranos, como *PSA-NCAM*, y de progenitores retinales, como *OTX2* y *ASCL1*, aunque no alcanza la expresión del marcador de neuronas maduras *βIII-TUBULINA* (figura 13), ni la supresión del gen de identidad *GFAP* (figura 12). Este proceso de inducción puede deberse al origen ectomesenquimal de las células aisladas de pulpa dental que utilizamos, la capacidad que tienen para interactuar con el microambiente y la aparente plasticidad para diferenciarse hacia linajes neuronales, puesto que al utilizar fibroblastos de prepucio neonatal, derivados del mesodermo, no se observó

ningún cambio en la morfología ni en la expresión de marcadores neuronales (figuras 10 y 15). Debido a su origen embrionario, los fibroblastos de prepucio neonatal podrían no tener la competencia necesaria, en términos de receptores y factores solubles para responder a las señales regenerativas que sintetiza la retina dañada.

De forma importante, el 44% de las células cultivadas en medio condicionado de retina dañada con MNU resultaron inmunoreactivas a RODOPSINA, proteína característica de células fotorreceptoras (figura 14 panel 'c'), la expresión de esta proteína fue confirmada con la detección del RNA mensajero de *RODOPSINA* por RT-PCR (figura 14 panel 'e'). Es posible atribuir la expresión de *RODOPSINA*, *CRX* y *NRL* a los factores solubles presentes en el medio condicionado de retina dañada en virtud de que sólo ocurrió en las DPSCs cultivadas con este medio, la ausencia de *CINASA DE RODOPSINA* indica el estado de maduración de las DPSCs que posiblemente iniciaron un proceso de diferenciación hacia fotorreceptores luego del cultivo con medio condicionado de retina dañada.

Esto es relevante puesto que la obtención de fotorreceptores es uno de los principales objetivos del área y la eficiencia de los protocolos previamente reportados es muy baja incluso al utilizar precursores retinales [54]. Partiendo de células estromales de médula ósea [55] se ha obtenido el 30%; 1% con células pluripotentes inducidas [20] y 12% al utilizar células embrionarias [56]. Recientemente se reportó el 60% de eficiencia en la diferenciación hacia fotorreceptores a partir de células humanas de Müller utilizando BMP, FGF, taurina, ácido retinoico e IGF [57,58]. Empero, obtener cultivos humanos de glía de Müller o de células embrionarias para alotrasplantes puede ser difícil o controversial y resulta más sencillo utilizar células autólogas de fácil acceso.

CONCLUSIONES

Las células humanas derivadas de pulpa dental responden ante señales neurogénicas de la retina modificando su cinética de crecimiento e iniciando un proceso de diferenciación neuronal donde el daño es un factor determinante que conduce a la expresión de *RODOPSINA*, *CRX* y *NRL*.

APÉNDICES

I. Cultivo de fibroblastos de prepucio neonatal

El cultivo primario de fibroblastos de prepucio neonatal utilizado en este trabajo fue adquirido de ATCC Primary Cell Solutions, número de catálogo PCS-201-010, lote número 59532382. También puede obtenerse de la siguiente manera:

1. Colectar tejido del prepucio neonatal luego de la circuncisión.
2. Lavar el tejido con solución salina isotónica.
3. Seccionar en pedazos pequeños con tijeras.
4. Digerir parcialmente con tripsina al 0.25% por 30 minutos a 37° C.
5. Inactivar la tripsina con una solución de SFB al 15% en DMEM.
6. Centrifugar la suspensión a 300 G durante 10 minutos
7. Resuspender el pellet en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% SBF, L-Glutamina 2mM, y 100µ/ml de antibiótico-antimicótico en una placa de cultivo de 60 mm.
8. Cambiar el medio de cultivo cada 3 días.

II. Índice de tablas y figuras

Tabla	Página
1. Señales paracrinas de la retina luego del daño celular en roedores	11
2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la detección de marcadores de diferenciación neural por RT-qPCR.	19
3. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la detección de marcadores de diferenciación neural por RT-PCR.	19
4. Anticuerpos utilizados en la detección de GFAP, PSA-NCAM y RODOPSINA.	20
5. Tabla resumen de la respuesta de células troncales de pulpa dental (DPSC) al medio condicionado de retina.	32

Figura	Página
1. Morfología <i>in vitro</i> de células troncales de pulpa dental.	3
2. Esquema y microfotografía de la localización de la retina en el ojo y organización de sus componentes celulares.	5
3. Esquema general de la secuencia experimental.	13
4. Progresión del daño a fotorreceptores con MNU.	16
5. Representación del cultivo de células de pulpa dental con medio condicionado.	17
6. Seguimiento del cultivo organotípico de retina.	21
7. Determinación de la concentración de MNU <i>in vitro</i> .	22
8. Fotomicrografías representativas de células aisladas de pulpa dental (DPSC) cultivadas en medio condicionado de explante organotípico	23

de retina	
9. Morfología de DPSC cultivadas con medio condicionado de retina	25
10. Fibroblastos humanos de prepucio neonatal cultivados con medio condicionado de explante organotípico de retina normal y dañada.	26
11. Efecto del medio condicionado de retina en la viabilidad de las células troncales de pulpa dental	27
12. Inmunoreactividad a GFAP y PSA-NCAM.	29
13. Expresión de marcadores de diferenciación neural en células aisladas de pulpa dental.	30
14. Inmunoreactividad a Rodopsina.	31
15. Inmunoreactividad a Rodopsina, GFAP y PSA-NCAM de fibroblastos humanos de prepucio neonatal cultivados en medio condicionado de explante organotípico de retina normal y dañada con MNU.	33
16. Factores de transcripción necesarios para el desarrollo de los componentes del sistema nervioso.	39

III. Abreviaturas

ABC	Células de la yema apical
AFSC	Células troncales del líquido amniótico
AGI	Inhibidores del crecimiento axonal
ASC	Células troncales de adulto
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
BM-MSC	Células troncales mesenquimales de médula ósea
bMP	Proteína de membrana basal
CBPE	Epitelio pigmentado del cuerpo ciliar
CD	Condicionado al daño
CD105	Endoglina
CD11b/c	Integrinas de leucocitos
CD34	Antígeno de células progenitoras hematopoyéticas
CD44	Receptor de linfocitos
CD45	Antígeno común de leucocitos
CD73	Ecto-5'-nucleotidasa
CD90	Glicoproteína anclada a Glicosilfosfatidilinositol, marcador mesenquimal
CMZ	Zona ciliar marginal
CN	Condicionado normal
CNPasa	Marcador de oligodendrocitos

CNTF	Factor neurotrófico ciliar
DAPI	4,6-Diamidin-2-fenilindol diclorhidrato
Dcx	Doblecortina
DMAE	Degeneración macular asociada a la edad
DPSC	Células troncales de pulpa dental
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ESC	Células troncales embrionarias
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
GABA	Ácido gama aminobutírico
GDNF	Factor neurotrófico derivado de glía
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
HFF	Fibroblastos de prepucio humano
HLA-DR	Antígeno leucocitario humano DR
IGF	Factor de crecimiento insulínico
ILM	Membrana interna limitante
INL	Capa nuclear interna
IP	Intraperitoneal
IPL	Capa plexiforme interna
IPSC	Células troncales pluripotentes inducidas
MNU	N-metil nitroso urea
NeuN	Núcleos neuronales

NF-Kb	Factor nuclear Kb
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NMDA	Ácido N-metil-D-aspártico
NSC	Célula troncal neural
OLM	Membrana limitante externa
ONL	Capa nuclear externa
OPL	Capa plexiforme externa
PBS	Solución reguladora de fosfatos
PSA-NCAM	Molécula polisialicilada de adhesión de célula neural
RGC	Células ganglionares de retina
RNA	Ácido ribonucleico
RPC	Células progenitoras de retina
RPE	Epitelio pigmentado de retina
RSC	Células troncales de retina
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa - transcriptasa reversa
UV	Ultravioleta
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
WST-1	2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio

IV. Material y Equipo

Botella de cultivo celular

Caja de cultivo de 6, 24 y 96 pozos

Filtros para cultivo en placa de 0.3 cm de diámetro

Jeringa desechable de 1 ml

Micropipetas de 10, 20, 200 y 1000 μ l

Pinzas de disección

Pipeta Pasteur de vidrio

Pipetas desechables de 5, 10 y 25 ml

Placa de Petri de plástico

Placa de 96 pozos para PCR

Porta y cubre objetos de vidrio

Tijeras de rectas y curvas de disección.

Tubos de polipropileno de 1.5, 2 y 50 ml

Tubos de polipropileno de 50 μ l

Vaso de precipitados de 200 ml

Balanza digital Sartorius 1219MP

Centrifuga Refrigerada Eppendorf 5810 R

Criostato Microm HM 505N

Espectrofotómetro de UV NanoDrop 2000™ de Thermo Fischer Scientific

Fuente de Poder PowerPac™ de BioRad

Gabinete de Bioseguridad NUAIRE NU-450-600

Incubadora Binder CB-150-UL

Microcentrífuga Labnet C0165

Microscopio de Epifluorescencia Zeiss AxioVert40 CFL™

Termociclador Eppendorf Mastercycler™ AG 22331

Termociclador PikoReal™ 96 de Thermo Scientific

Transiluminador UV y sistema de foto-documentación UVP™

Vórtex de VWR Scientific

V. Carta de consentimiento informado

STOREACELL, S.A. DE C.V. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Con fundamento en lo dispuesto por la Declaración de Helsinki de la Asamblea Médica Mundial que establece los Principios éticos para investigación médica en seres humanos, incluida la investigación del material humano; en la Declaración de Ginebra de la citada Asociación, que vincula al médico con la fórmula "velar solícitamente y ante todo por la salud de mi paciente"; en el Código Internacional de Ética Médica cuya premisa es "en investigación médica de seres humanos, el bienestar de la persona que participa en la investigación debe tener siempre primacía sobre los otros intereses" y, en la Ley General de Salud de México, Título Quinto, "Investigación para la Salud" se acuerda lo siguiente:

I. Justificación y Objetivos de la Investigación.

El signante de esta carta ha sido informado que la investigación identificada con la clave SB-2007-01 (82794, 2008-2011) apoyada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología tiene como objetivo investigar la capacidad de las células provenientes de tejidos de personas para cambiar su estado diferenciado y adquirir capacidad de formar otros tipos de células, por ejemplo, hueso, cartilago, etcétera. Para tal fin, es necesaria la obtención de tejidos de personas, como los provenientes de los dientes.

La obtención del tejido de personas proveniente de los dientes se realiza de la siguiente manera:

Etapas del Proceso. Una vez recibida la muestra en el laboratorio, éste realizará el proceso como sigue: Procesamiento, expansión y monitoreo, criopreservación y almacenamiento de las células madre obtenidas de las piezas dentales recibidas.

Procesamiento: Las células madre se obtendrán a partir del tejido pulpar de las piezas dentales recibidas. Una vez determinada la existencia de tejido pulpar en la pieza dental, el laboratorio procesará el mismo y realizará los análisis necesarios para confirmar la existencia de células madre.

Expansión, monitoreo y criopreservación: Una vez determinada la obtención de células a partir de las Muestras así como su viabilidad, el laboratorio realizará la expansión y criopreservación de las Células Madre Dentales.

La expansión será monitoreada de manera regular en intervalos máximos de tres días.

La criopreservación comprende el depósito y congelamiento controlado de las Células Madre extraídas y sometidas al proceso de expansión.

Almacenamiento. Se almacenarán las Muestras en el interior del laboratorio.

Esta carta tiene como finalidad, la acreditación del consentimiento que otorga la persona signante para que, del diente que le será extraído voluntariamente y/o por indicación médica preexistente a la extracción, se obtengan células de tejido que serán utilizadas para la investigación antes referida.

II. Procedimientos aplicables y su propósito, incluidos los experimentales.

El signante ha sido informado que para efectos de esta investigación, sólo se utilizará el diente que está predestinado a extracción voluntaria y/o por indicación médica en virtud de su estado.

III. Molestias y/o riesgos esperados. Cómo y quién los resolverá.

El signante fue informado de que con posterioridad a la extracción de la pieza dental indicada, no será necesaria intervención quirúrgica o tratamiento vinculado a esta investigación, lo que garantiza que la misma no será motivo de molestia o riesgo adicional.

IV. Beneficios que pueden obtenerse de la investigación.

Como resultado de la investigación se conocerán propiedades de las células provenientes de la pulpa dental, propiedades que podrán determinar el tratamiento idóneo de algunas enfermedades del signante.

V. Garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración relacionada a la investigación.

Se le garantiza al signante que toda inquietud, duda o consulta que tenga con relación a la investigación y a su participación en ella, será atendida de manera oportuna y completa, hasta que el signante encuentre total satisfacción a las mismas.

VI. Libertad de Retirar su consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en la investigación.

El signante fue informado de que en el momento en que él lo decida y sin que medie justificación alguna, puede revocar su consentimiento; lo que en ningún caso afectará la relación ni la atención médica preexistente con el médico o con el hospital.

V. Privacidad y Anonimato.

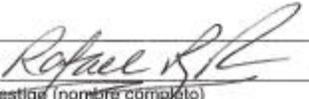
El signante autoriza la publicación de los resultados del estudio siempre que, en observancia al secreto profesional y de protección de sus datos personales, su nombre e identidad no sean revelados.

VI. Gastos adicionales, quien los absorbe.

Los estudios en laboratorio o de naturaleza similar que sean necesarios para esta investigación, serán erogados por el laboratorio institucional.

En México, el día ___ del mes de _____ de 201___, con total información, pleno entendimiento de lo anterior y aclaradas todas las dudas respecto a mi participación en el estudio titulado "Aislamiento, cultivo y crío preservación de células de pulpa dental humano", autorizo por tiempo indefinido a STOREACELL, S.A. de C.V. a obtener células de los tejidos provenientes de la pieza dental que me será extraída voluntariamente y/o por indicación médica preexistente, en el entendido de que mi participación se limita a proporcionar la pieza dental que me sea extraída, consintiendo en donar dicha pieza dental y todos y cada uno de los productos que de ella se deriven, siempre que se utilicen únicamente en el objeto del estudio precitado.

 Donante (nombre completo) Dirección:	_____ Storeacell, S.A. de C.V. Nombre completo del Apoderado legal

 Testigo (nombre completo) Dirección: Relación con el donante	_____ Testigo (nombre completo) Dirección: Relación con el donante

REFERENCIAS

1. Stembook [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; (2008-).
2. Takahashi K., Yamanaka S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663–676.
3. Janebodin K., Horst O.V., Ieronimakis N., Balasundaram G., Reesukumal K. et al. (2011) Isolation and characterization of neural crest-derived stem cells from dental pulp of neonatal mice. *PLoS ONE* 6(11): e27526.
4. Etsuko I., Kiyohito Y., Midori K., Takahiro Y., Akira O. et al. (2008) Multipotent cells from the human third molar: feasibility of cell-based therapy for liver disease. *Differentiation* 76:495-505.
5. Gronthos S., Mankani M., Brahim J., Robey P. G., Shi S. (2000) Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:13625-13630.
6. Sakai K., Yamamoto A., Matsubara K., Nakamura S., Naruse M. et al. (2012) Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *The Journal of Clinical Investigation* 122:80-90.
7. Nosrat I.V, Smith C.A., Mullally P., Olson L., Nosrat C.A. (2004) Dental pulp cells provide neurotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons *in vitro*; implications for tissue engineering and repair in the nervous system. *European Journal of Neuroscience* 19:2388-2398.
8. Agnieszka A., Songtao S., Zannettino A., Fujii N., Gronthos S. (2009) Implanted adult human dental pulp stem cells induce endogenous axon guidance. *Stem Cells* 27:2229-2237.

9. Agnes A., Rychkov G., Songtao S., Simon A., Grontho S. (2008) Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells* 26:1787-1795.
10. Huang A. H., Snyder B., Cheng P., Chanc A. (2008) Putative dental pulp-derived stem/stromal cells promote proliferation and differentiation of endogenous neural cells in the hippocampus of mice. *Stem Cells* 26:2654-2663.
11. Karaöz E., Demircan PC., Saflam O., Aksoy A., Kaymaz F. *et al.* (2011) Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Histochemistry and Cell Biology* 136:455-473.
12. Kim S.H., Kim Y.S., Lee S.Y., Kim K.H., Lee Y.M. *et al.* (2011) Gene expression profile in mesenchymal stem cells derived from dental tissues and bone marrow. *Journal of Periodontal & Implant science* 41:192-200.
13. Talarico Duailibi M., Domenici Kulikowski L., Eduardo Duailibi S., Nunes Lipay M. V., Melaragno M.I., *et al* (2012) Cytogenetic instability of dental pulp stem cell lines. *Journal of Molecular Histology* 43:89-94.
14. Kolb H., Fernández E., Nelson R., editores. *Webvision: The organization of the retina and visual system* [Internet]. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; (1995-).
15. Ahmad I., Del Debbio C.B., Das A.V., Parameswaran S., (2011) Müller glia: a promising target for therapeutic regeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52:5758-5764.
16. Harper M., Grozdanic S.D., Blits B., Kuehn M.H., Zamzow D. *et al* (2011) Transplantation of BDNF-secreting mesenchymal stem cells provides neuroprotection in chronically hypertensive rat eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52:4506-4515.

17. Wohl S.G., Schmeer C.W., Isenmann S. (2012) Neurogenic potential of stem/progenitor-like cells in the adult mammalian eye. *Progress in Retinal and Eye Research* 31:213-242.
18. Vugler A., Lawrence J., Walsh J., Carr A., Gias C. et al (2007) Embryonic stem cells and retinal repair. *Mechanisms of Development* 124:807-829.
19. Castanheira P., Torquetti L., Nehemy M.B., Miranda Goes A. (2008) Retinal incorporation and differentiation of mesenchymal stem cells intravitreally injected in the injured retina of rats. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* 71:644-650.
20. Lamba D.A., McUsic A., Hirata R.K., Wang P-R., Russell D. *et al.* (2010) Generation, purification and transplantation of photoreceptors derived from human induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE* 5(1): e8763.
21. Wong I.Y., Poon M.W., Pang R.T., Lian Q., Wong D. (2011) Promises of stem cell therapy for retinal degenerative diseases. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 249:1439–1448.
22. Pearson R.A, Barber A.C., Rizzi M., Hippert C., Xue T. *et al.* (2012) Restoration of vision after transplantation of photoreceptors. *Nature* 485: 99–103.
23. Haraa A., Niwab M., Kumadad M., Aokie H., Kunisadae T. *et al.* (2006) Intraocular injection of folate antagonist methotrexate induces neuronal differentiation of embryonic stem cells transplanted in the adult mouse retina. *Brain Research* 1085:33-42.
24. Gong L., Wu Q., Song B., Lu B., Zhang Y. (2008) Differentiation of rat mesenchymal stem cells transplanted into the subretinal space of sodium iodate-injected rats. *Clinical and Experimental Ophthalmology* 36:666-671.
25. Yu S., Tanabe T., Dezawa M., Ishikawa H., Yoshimura N. (2006) Effects of bone marrow stromal cell injection in an experimental glaucoma model. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 344:1071–1079.

26. Bull N.D., Limb G.A., Martin K.R. (2008) Human Müller stem cell (MIO-M1) transplantation in a rat model of glaucoma: survival, differentiation, and integration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49:3449-3456.
27. Wan J., Zheng H., Chen Z.L., Xiao H.L., Shen Z.J. *et al.* (2008) Preferential regeneration of photoreceptor from Müller glia after retinal degeneration in adult rat. *Vision Research* 48:223–234.
28. Hazardous Substance Fact Sheet for NMU, New Jersey Department of Health and Senior Services.
29. Yoshizawa K., Kuwata M., Kawanaka A., Uehara N., Yuri T. *et al.* (2009) N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in mice is independent of the p53 gene. *Molecular Vision* 15:2919-2925.
30. Yang J., Luol., Lin S., Chen J., Li D. *et al.* (2005) N-methyl-N-nitrosourea-induced apoptosis of photoreceptor cells in Sprague Dawley rats via nuclear factor κ B. *Chinese Medical Journal* 118:1081-1086.
31. Zulliger R., Lecaudé S., Eigeldinger-Berthou S., Wolf-Schnurrbusch U., Enzmann V. (2011) Caspase-3-independent photoreceptor degeneration by N-methyl-N-nitrosourea (MNU) induces morphological and functional changes in the mouse retina. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 249:859-869.
32. Tsuruma K., Yamauchi M., Inokuchi Y., Sugitani S., Shimazawa M. *et al.*, (2012) Role of oxidative stress in retinal photoreceptor cell death in N-Methyl-N-nitrosourea-treated mice. *Journal of Pharmacological Sciences* 118:351-362.
33. Yang P.B., Seiler M.J., Aramant R.B., Yan F., Mahoney M.J. *et al.* (2010) Trophic factors GDNF and BDNF improve function of retinal sheet transplants. *Experimental Eye Research* 91:727-738.
34. Comunicado de prensa de la Secretaria de Salud [internet] http://www.salud.gob.mx/ssa_app/noticias/datos/2005-04-09_1319.html

35. Lu B., Wang S., Girman S., McGill T., Ragaglia V. et al. (2010) Human adult bone marrow-derived somatic cells rescue vision in a rodent model of retinal degeneration. *Experimental Eye Research* 91:449-445.
36. Johnson T.V., Martin K.R. (2008) Development and characterization of an adult retinal explant organotypic tissue culture system as an *in vitro* intraocular stem cell transplantation model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49:3449-3456.
37. Andreeff M, Goodrich DW, Pardee AB. (2000) Cell proliferation, differentiation, and apoptosis. Bast RC Jr, Kufe DW, Pollock RE, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 5a edición. Hamilton (ON): BC Decker; Capítulo 2. Disponible en : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20860/>
38. Ibarretxe G., Crende O., Aurrekoetxea M., García-Murga V., Etxaniz J. et al. (2012) Neural crest stem cells from dental tissues: a new hope for dental and neural regeneration. *Stem Cells International* 2012:103503
39. Yu J., Wang Y., Deng Z., Tang L., Li Y. et al. (2007) Odontogenic capability: bone marrow stromal cells versus dental pulp stem cells. *Biology of the Cell* 99:465-474.
40. Gandia C., Armiñan A., García-Verdugo J.M., Lledó E., Ruiz A. et al. (2008) Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells* 26:638-645.
41. Tenley C.A., Jin J., Casey E.S. (2011) Interaction of Sox1, Sox2, Sox3 and Oct4 during primary neurogenesis. *Developmental Biology* 350(2):429-440.
42. Mayer Proschel M., Kalyani A.J., Mujtaba T., Rao M.S. (1997) Isolation of lineage restricted neuronal precursors from multipotent neuroepithelial stem cells. *Neuron* 19: 773–785.

43. Pennartz S., Belvindrah R., Tomiuk S., Zimmer C., Hofmann K. *et al.* (2004) Purification of neuronal precursors from the adult mouse brain: comprehensive gene expression analysis provides new insights into the control of cell migration, differentiation and homeostasis. *Molecular and Cellular Neuroscience* 25: 692–706.
44. Brzezinski J.A., Euseok J.K., Johnson J.E., Reh T.A. (2011) *Ascl1* expression defines a subpopulation of lineage-restricted progenitors in the mammalian retina. *Development* 138: 3519-3531.
45. Omori Y., Katoh K., Sato S., Muranishi Y., Chaya T. *et al.* (2011) Analysis of transcriptional regulatory pathways of photoreceptor genes by expression profiling of the *Otx2*-Deficient Retina. *PLoS ONE* 6(5): e19685.
46. Karl M.O., Hayes S., Nelson B.R., Tan K., Buckingham B. *et al.* (2008) Stimulation of retinal regeneration in the mouse retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:19508-19513.
47. Karl M.O., Reh T.A. (2010) Regenerative medicine for retinal diseases: activating endogenous repair mechanisms. *Trends in Molecular Medicine* 16(4):193-202.
48. Rattner A., Nathans J. (2005) The genomic response to retinal disease and injury: evidence for endothelin signaling from photoreceptors to glia. *The Journal of Neuroscience* 25(18):4540-4549.
49. Wan J., Zheng H., Xiao H., She Z., Zhou G. (2007) Sonic hedgehog promotes stem-cell potential of Müller glia in the mammalian retina. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 363:347–354.
50. Osakada F., Ooto S., Akagi T., Mandai M., Akaike A. (2007) Wnt signaling promotes regeneration in the retina of adult mammals. *The Journal of Neuroscience* 27(15):4210-4219.
51. Wen R., Song Y., Cheng T., Matthes M.T., Yasumura D. *et al.* (1995) Injury-induced upregulation of bFGF and CNTF mRNAs in the rat retina. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 15:7377–7385.

52. Gao H., Hollyfield J.G. (1996) Basic fibroblast growth factor: increased gene expression in inherited and light-induced photoreceptor degeneration. *Experimental Eye Research* 62:181–189.
53. Liaw L., Birk D.E., Ballas C.B., Whitsitt J.S., Davidson J.M. *et al.* (1998) Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (*spp1*). *Journal of Clinical Investigation* 101:1468-1478.
54. MacLaren R.E., Pearson R.A., MacNeil A., Douglas R.H., Salt T.E. *et al.* (2006) Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature* 444:203-207.
55. Kicic A., Shen W.Y., Wilson A.S., Constable I.J., Robertson T. *et al.* (2003) Differentiation of marrow stromal cells into photoreceptors in the rat eye. *The Journal of Neuroscience* 23(21):7742-7749.
56. Lamba D., Gust J., Reh T. (2009) Transplantation of human embryonic stem cells derived photoreceptors restores some visual function in *Crx* deficient mice. *Cell Stem Cell* 4(1):73-79.
57. Jayaram H., Jones M.F., Eastlake K., Cottrill P.B., Becker S. *et al.* (2014) Transplantation of photoreceptors derived from human Müller glia restore rod function in the P23H rat. *Stem Cells Translational Medicine* 3:1-11.
58. Giannelli S.G., Demontis G.C., Pertile G., Rama P., Broccoli V. (2011) Adult human Muller glia cells are a highly efficient source of rods photoreceptors. *Stem Cells* 29:344-356.
59. Zhou X-m., Yuan H., Wu D., Zhou X-r., Sun D. *et al.* (2009) Study of brain-derived neurotrophic factor gene transgenic neural stem cells in the rat retina. *Chinese Medical Journal* 122(14):1642-1649.
60. Sivilia S., Giuliani A., Fernandez M., Turba M.E., Forni M. *et al.* (2009) Intravitreal NGF administration counteracts retina degeneration after permanent carotid artery occlusion in rat. *BMC Neuroscience* 10:52.
61. Hauck S.M., Kinkl N., Deeg C.A., Swiatek-de Lange M., Schöffmann S. *et al.* (2006) GDNF family ligands trigger indirect neuroprotective signaling in retinal glial cells. *Molecular and Cellular Biology* 26:2746-2757.

62. Levine E.M., Fuhrmann S., Reh T.A. (2000) Soluble factors and the development of rod photoreceptors. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57:227-234.
63. Mead B., Logan A., Berry M., Leadbeater M., Scheven B.A., (2013) Intravitreally transplanted dental pulp stem cells promote neuroprotection and axon regeneration of retinal ganglion cells after optic nerve injury. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 54:7544-7556.
64. Kandel E.R., Schwartz T.M., Jessell T.M. (2000) *Principles of Neural Sciences*. 4a ed., McGraw-Hill.
65. Biella G., Di Febo F., Goffredo D. (2007) Differentiating embryonic stem derived neural stem cells show a maturation-dependent pattern of voltage-gated sodium current expression and graded action potentials. *Neuroscience*, 149:38 –52.
66. King J.L., Guidry C. (2004) Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins Modulate Müller Cell Responses to Insulin-Like Growth Factors. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 45:2848-2855.
67. Xing C., Wang X., Cheng C., Montaner J., Mandeville E. *et al.* (2014) Neuronal production of lipocalin-2 as a help-me signal for glial activation. *Stroke* 45(7):2085-92
68. Swiderski R.E., Nishimura D.Y., Mullins R.F., Olvera M.A., Ross J.L. *et al* (2007) Gene expression analysis of photoreceptor cell loss in *bbs4* knockout mice reveals an early stress gene response and photoreceptor cell damage, *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 48:3329-3340.
69. Tsubura A., Lai YC., Miki H., Sasaki T., Uehara N. *et al* (2011) Animal Models of N-Methyl-N-nitrosourea-induced Mammary Cancer and Retinal Degeneration with Special Emphasis on Therapeutic Trials, *In vivo* 25(1):11-22.
70. Colvin M. (2003) Alkylating Agents. En: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6a edición. Hamilton (ON): BC Decker. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12772/>

71. Bringmann A., Wiedemann P. (2012) Müller glial cells in retinal disease, *Ophthalmologica* 227:1-19.
72. Johnson G.E., Doak S.H., Griffiths S.M., Quick E.L., Skibinski D.O. *et al* (2009) Non-linear dose-response of DNA-reactive genotoxins: recommendations for data analysis, *Mutation Research* 678(2):95-100.