



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DE LA TROMBINA EN LA
PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS GLIALES DE
MÜLLER**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G O
P R E S E N T A:**

OSCAR AMAURY AGUILAR LOMAS



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ANA MARÍA LÓPEZ COLOMÉ
2017**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

1. Datos del alumno

Aguilar

Lomas

Oscar Amaury

5548562371

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

412060302

2. Datos del tutor

Dra

Ana María

López

Colomé

3. Datos del sinodal 1

Dr

Luis Felipe

Jiménez

García

4. Datos del sinodal 2

Dra

Rocío

Salceda

Sacanelles

5. Datos del sinodal 3

Dra

María de Lourdes

Segura

Valdez

6. Datos del sinodal 4

Dr

Josué Orlando

Ramírez

Jarquín

7. Datos del trabajo escrito

Efecto de la trombina en la proliferación de las células gliales de Müller

49 p.

2017

Por haber sido mi mentora y mecenas...

A mi familia

Esta tesis se desarrolló en el laboratorio que dirige la Dra. Ana María López Colomé, en la división de Neurociencias, del Instituto de Fisiología Celular, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El trabajo fue parcialmente financiado por los donativos otorgados a la Dra. Ana María López Colomé, como parte de los proyectos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (proyecto 254333) y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) (proyecto N205317/28).

Agradecimientos

Agradezco mucho a la Dra. López Colomé por haberme permitido formar parte de este equipo. Debo mucho de mi formación profesional y humana a sus siempre atinadas observaciones.

Agradezco encarecidamente el tiempo que dedicó la QFB Edith López Hernández en mi formación técnica dentro del laboratorio. Especialmente agradezco a la Dra. Irene Lee Rivera por su paciencia y todo el tiempo que dedicó en mi instrucción. Sus consejos han sido fundamentales en mi desarrollo profesional.

A mis compañeros de laboratorio les agradezco por haberse involucrado tanto en mi labor y formación profesional.

Agradezco la amable atención y disposición crítica de los miembros de mi jurado: la Dra. Rocío Salceda Sacanelles, el Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín, el Dr. Luis Felipe Jiménez García y la Dra. María de Lourdes Segura Valdez.

Resumen

La vitreorretinopatía proliferativa (VRP) es una enfermedad que se caracteriza por la proliferación y migración anormal de las células del epitelio pigmentado de la retina (EPR), células gliales de Müller, fibroblastos, linfocitos, microglia y macrófagos. La migración y proliferación de éstas deriva en la formación de membranas contráctiles epirretinales que tensan a la retina, lo que provoca su desprendimiento parcial o total, según el estadio de desarrollo de la enfermedad. La VRP puede ser causada por el desprendimiento regmatógeno de la retina, intervenciones quirúrgicas en este tejido o traumatismos oculares. Aunque la causa específica de la VRP no se conoce, se sabe que su desarrollo está relacionado con el daño tisular retiniano y, de manera muy estrecha, con el rompimiento de la barrera hematorretiniana (factores comunes en los traumatismos y las cirugías oculares). De esta manera, la VRP surge como una respuesta de reparación tisular (*wound-healing response*), estimulada en exceso y de adaptación deficiente.

Cuando la barrera hematorretiniana se rompe, se altera el intercambio metabólico selectivo que impide que ingrese cualquier componente exógeno a la retina. Ésto, permite que diversas sustancias del suero sanguíneo entren en contacto con la retina. Se sabe que la actividad de la trombina aumenta significativamente en los pacientes que sufren de VRP. La trombina es una proteasa de serina presente en el suero sanguíneo que desempeña un papel fundamental en la cascada de coagulación. Además, la trombina estimula un gran número de respuestas celulares mediante la activación de los receptores activados por proteasas (PAR 1-4), una familia de cuatro GPCRs (receptores acoplados a la proteína G) activados por proteólisis de su extremo amino terminal. En el sistema nervioso, PAR1 promueve la proliferación de astrocitos a través de la activación de las cinasas de la proteína C (PKCs) y de la vía de la cinasa de la proteína activada por mitógeno (MAPK). Aún no se ha explorado si las células gliales de Müller en la retina, como sucede con los astrocitos en el resto del sistema nervioso, responden fisiológicamente a la presencia de la trombina.

En este trabajo se demuestra que las células de la línea celular de glia de Müller humana, MIO-M1, expresan a los cuatro subtipos de los PARs. También se demuestra que la trombina, una proteasa de serina/treonina presente en el suero sanguíneo, estimula la proliferación de las células MIO-M1, a través de la activación de los PARs. Aunque la proliferación causada por la trombina es muy clara, la trombina no estimula la migración en estas células.

Experimentos previos indican que la trombina también provoca la proliferación, la migración y la transición epitelio mesénquima en el EPR. Tomando todos estos datos en consideración, es razonable afirmar que la trombina es un factor clave en el desarrollo de la VRP, dado que afecta a las poblaciones celulares más abundantes que componen las membranas epirretinales características de esta enfermedad.

Índice general

Abreviaturas	xv
1 Introducción	1
1.1 Anatomía del ojo	1
1.2 Histología de la retina	2
1.3 La glia de Müller	4
1.3.1 Las células gliales de la retina	4
1.3.2 Morfología	5
1.3.3 Función	5
1.3.4 Patologías asociadas con las células gliales de Müller	7
1.3.5 Gliosis	9
1.4 La Vitreorretinopatía proliferativa	10
1.5 La trombina y los Receptores Activados por Proteasa (PARs)	12
1.5.1 La trombina	12
1.5.2 PAR1	14
1.5.3 PAR2	14
1.5.4 PAR3	15
1.5.5 PAR4	16
1.5.6 Señalización de los PARs	16
2 Planteamiento del problema	23
2.1 Hipótesis	25
2.1.1 Objetivo general	25
2.1.2 Objetivos específicos	25
3 Procedimiento experimental	27
3.1 Cultivo celular	27
3.2 RT-PCR	27
3.3 Análisis de proliferación celular en línea celular de glia de Müller humana (MIO-M1)	28

3.4	Estimulación y especificidad del efecto de la trombina	29
3.5	Incisión y cierre de heridas (<i>Wound Healing</i>)	29
3.6	Ensayos de migración en cámara de Boyden	30
3.7	Anticuerpos	30
3.8	Western Blot	30
3.9	Análisis estadístico	31
4	Resultados	33
4.1	La línea celular MIO-M1 expresa todos los Receptores Activados por Proteasas (PARs)	33
4.2	La trombina promueve la proliferación en las células MIO-M1	34
4.2.1	La trombina no promueve la migración de las células MIO-M1	36
5	Discusión	39
6	Conclusión	43

Índice de figuras

1.1	Estructura del ojo	2
1.2	Estratos de la retina	3
1.3	La Glía de Müller en la retina	8
1.4	La trombina en la hemostasia	13
1.5	Los cuatro receptores activados por proteasas (PARs)	18
1.6	Homología de los PARs	19
1.7	Principales vías de señalización de PAR1 evocadas por la trombina	20
4.1	Expresión de los PARs en la línea celular MIO-M1	33
4.2	Expresión relativa de los PARs en MIO-M1	34
4.3	Proliferación de MIO-M1 en presencia de trombina	35
4.4	Gráfica de la proliferación de las células MIO-M1 en presencia de trombina	35
4.5	Ensayos de cierre de heridas (<i>Wound Healing</i>)	36
4.6	Ensayos de migración celular en cámaras de Boyden	37
4.7	Gráfica de la migración celular en cámaras de Boyden	37
4.8	Ensayos de cierres de heridas con Ki67	38

Índice de cuadros

1.1	Principales características de los receptores activados por proteasas	21
3.1	Cebadores (<i>Primers</i>) y variables de las PCRs	28
3.2	Anticuerpos para <i>Western Blot</i>	31

Abreviaturas

APC proteína C activada. 15, 17

Ara-C Citosina β -D-Arabinofuranosida. 29, 36, 38, 41

ARPE-19 línea celular derivada del epitelio pigmentado de la retina humana. 30

bFGF factor de crecimiento fibroblástico básico. 39

BHR barrera hematorretineana. 3, 6, 10, 11, 39

CCG capa de células ganglionares. 5

cDNA DNA complementario. 28

CFNO capa de fibras del nervio óptico. 5

CNE capa nuclear externa. 5

CNI capa nuclear interna. 5

CPE capa plexiforme externa. 5

CPI capa plexiforme interna. 5

CTGF factor de crecimiento de tejido conectivo. 39

Ctl Control. 28

DMEM *Dulbecco's Modified Eagle Medium*. 27–30, 34, 40

DMEM-F12 *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F12*. 30

dNTPs deoxinucleótidos trifosfatados. 28

EGF factor de crecimiento epidérmico. 39

EPR epitelio pigmentado de la retina. xvi, 4, 6, 10, 29, 39, 40

FBS Suero fetal bovino. 27–31, 37, 38

FITC Isotiocianato de fluoresceína. 29, 38

FVa factor Va. 11

FVIIa factor VIIa. 11

FX factor X. 11

GPCR receptor acoplado a la proteína G. 13

- HGF** factor de crecimiento de hepatocitos. 39
- HRP** *Horseradish peroxidase* (peroxidasa de rábano picante). 31
- IP₃** inositol 1,4,5-trisfosfato. 14
- Ki-67** antígeno marcador de proliferación celular MKI-67. 29, 41, 43
- MC** medio condicionado recuperado a partir de cultivos de la línea celular del epitelio pigmentado de la retina (EPR) humano, ARPE-19, estimulados con 2 U/mL de trombina, durante 24 h. 29, 30, 38, 41
- MCP-1** proteína quimiotáctica de monocitos 1. 39
- MIO-M1** línea celular de glia de Müller humana. 25, 27–30, 34–36
- MLE** membrana limitante externa. 5
- MLI** membrana limitante interna. 4, 5
- MMPs** metaloproteinasas de matriz. 10
- MTS** 3-(4, 5-dimetil-tiazol-2yl)-5-(3-carboximetoxifenil-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio. 25, 28, 34
- PARs** receptores activados por proteasas. 13, 33, 40
- PBS** *Buffer* de fosfatos salino. 29
- PDGF** factor de crecimiento derivado de plaquetas. 10, 39
- PIP₂** fosfatidil inositol 3, 4 bifosfato. 15
- PLC** fosfolipasa C. 14
- PVDF** polivinildieno difluorado. 31
- RT-PCR** retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa. 27
- SN** sistema nervioso. 4, 7
- SNC** sistema nervioso central. 3, 4
- TBS** *buffer-tris* salino. 31
- TF** factor tisular. 11
- TGF- β** Factor de crecimiento transformante beta. 10, 39
- TTBS** *buffer* salino de Trizma con *Tween*. 29, 31
- VEGF** factor de crecimiento endotelial vascular. 39
- VRP** vitreorretinopatía proliferativa. 9–11, 34, 39, 43

Capítulo 1

Introducción

1.1 Anatomía del ojo

En los seres humanos, el 30% de las señales sensoriales que llegan al cerebro provienen de la retina. Estas señales se asocian con funciones neuronales complejas relacionadas con el comportamiento, el aprendizaje, la memoria y las emociones (Swaroop *et al.*, 2010). La retina es, por lo tanto, un componente del sistema visual fundamental y, tanto su fisiología como las patologías de este tejido, son de especial interés. Es imprescindible, también, entender a las enfermedades de la retina en el contexto anatómico y fisiológico ocular. A continuación se da una breve descripción anatómica del ojo.

El ojo es un órgano sensorial complejo en el que un sistema de lentes (medios refringentes) hace incidir la imagen de los objetos sobre un mosaico de fotorreceptores de la retina. Se distinguen dos compartimentos en el ojo, la cámara anterior y el globo ocular, separados por el cristalino, el ligamento anular, la zónula de Zinn y el cuerpo ciliar. La cubierta externa del globo ocular es la esclerótica, que en su región anterior se modifica y da lugar a la córnea, a través de la cual, penetran los rayos luminosos al ojo. En posición interna respecto de la esclera se localiza la coroides, un estrato conectivo altamente vascularizado y pigmentado. El epitelio pigmentado de la retina (EPR) recubre la superficie interna de la coroides. El EPR es un epitelio simple, compuesto por una membrana basal (la membrana de Bruch), que pertenece y forma el límite interno de la coroides, y del estrato simple de células cuboidales, que pertenecen a la retina no neural. Situada internamente y en continuidad con respecto al EPR, se encuentra la retina neural, una serie de estratos celulares que contiene a las células receptoras, interneuronas y células ganglionares. La retina recubre sólo los dos tercios internos y posteriores de la coroides (López-Colomé, 2005).

En la cámara anterior se ubican el cristalino, la coroides y la córnea. El cristalino es una lente transparente sostenida por el ligamento lenticular, el cual se enlaza a un engrosamiento anterior de la coroides, llamado cuerpo ciliar, que contiene fibras musculares circulares y longitudinales

ancladas en el borde entre la esclerótica y la córnea. La cara anterior del cristalino está recubierta por la porción colorida del ojo, el iris, cuyas fibras musculares circulares y radiales contraen o dilatan la pupila, respectivamente, para controlar la cantidad de luz que incide en la retina. El espacio entre el cristalino y la retina contiene un gel transparente llamado vítreo o humor vítreo, mientras que la cámara anterior del ojo contiene el humor acuoso, el cual procede del cuerpo ciliar por difusión y transporte activo (López-Colomé, 2005).

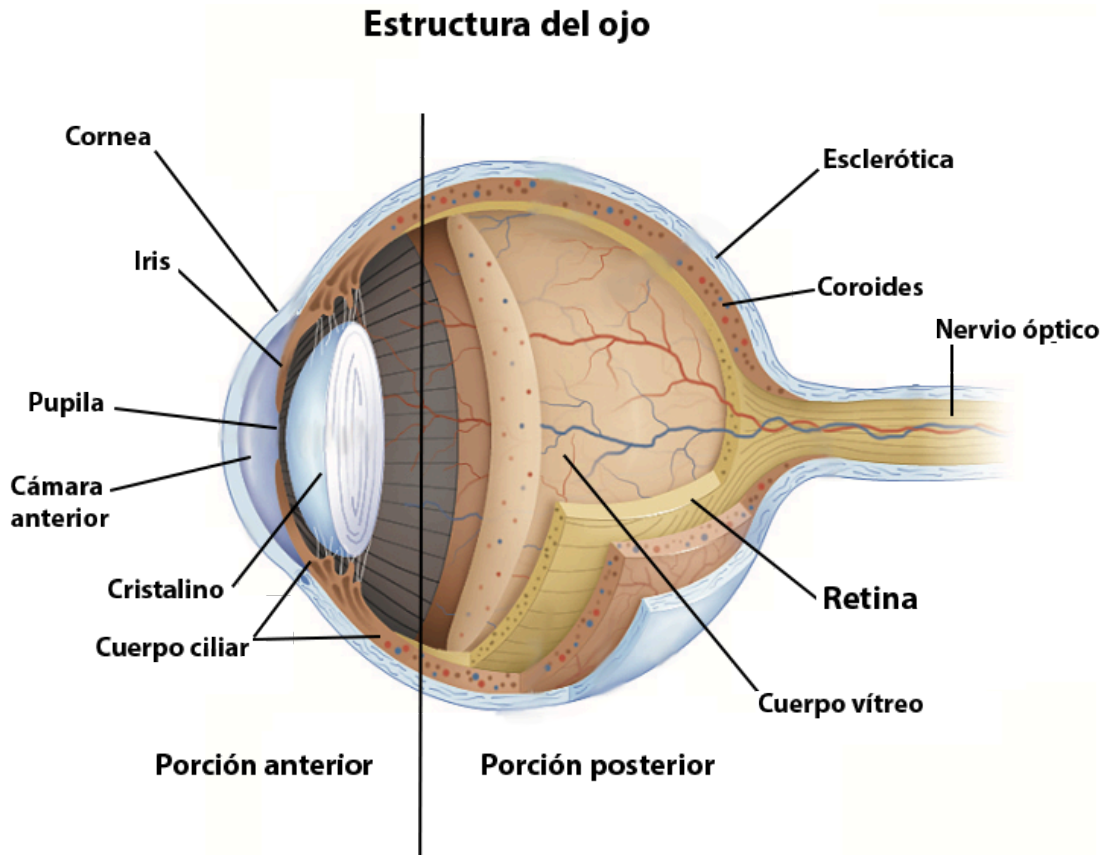


Figura 1.1: El ojo es un órgano compuesto por varios tejidos. La retina es una capa de tejido que reviste internamente el globo ocular, localizada entre la coroides y el cuerpo vítreo. (Imagen modificada tomada de (Eroschenko, 2013))

1.2 Histología de la retina

La retina es la porción fotosensible del ojo que contiene a los fotorreceptores: los conos (responsables de la visión del color) y los bastones (principales responsables de la visión en la oscuridad). Cuando la luz excita a los conos y a los bastones, la señal se transmite a través de una sucesión de neuronas en la retina y, finalmente, a través del nervio óptico, hasta la corteza cerebral. La retina es un tejido estratificado que incluye diez capas : **1.** El epitelio pigmentado de la retina (EPR) **2.** La

capa que contiene los segmentos externos de los fotorreceptores (capa de fotorreceptores) **3**. La membrana limitante externa **4**. La capa nuclear externa, que contiene los cuerpos celulares de los fotorreceptores. **5**. La capa plexiforme (sináptica) externa. **6**. La capa nuclear interna **7**. La capa plexiforme interna **8**. La capa de células ganglionares **9**. La capa de fibras del nervio óptico **10**. La membrana limitante interna (Figura 1.2). Las capas 2 a 8 forman la retina neural. Además de los fotorreceptores, en la retina existen cinco tipos de neuronas: las células bipolares, las ganglionares, las horizontales y las amacrinas. Las células bipolares hacen sinapsis con los fotorreceptores en la capa plexiforme externa, y con las ganglionares en la capa plexiforme interna (López-Colomé, 2005).

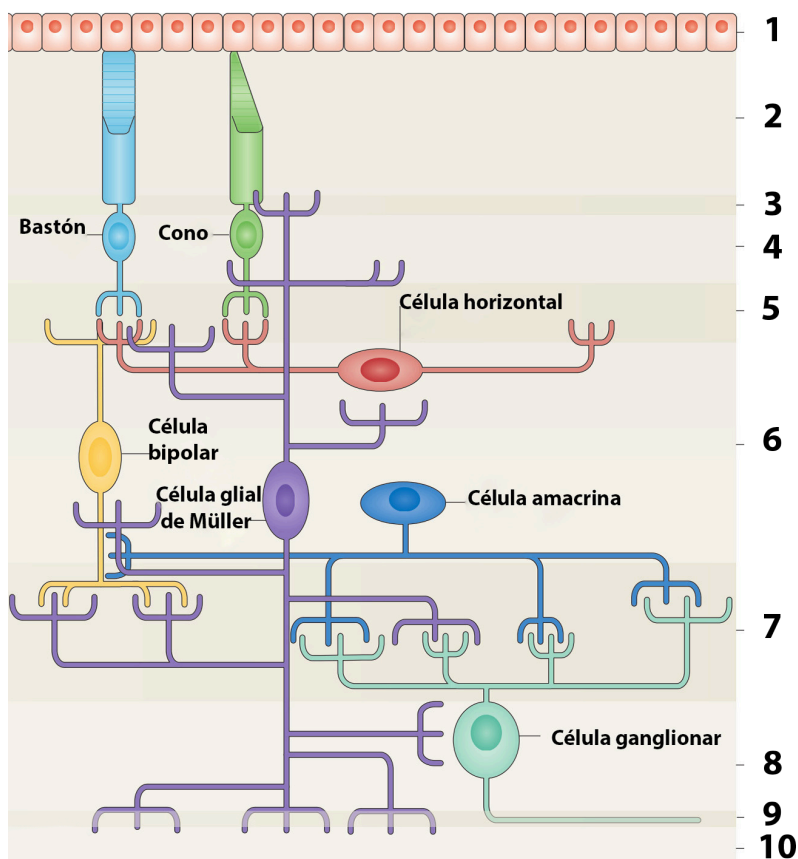


Figura 1.2: La retina es un tejido estratificado compuesto por diez capas: **1** el epitelio pigmentado de la retina (EPR), **2** la capa de fotorreceptores, **3** la membrana limitante externa, **4** la capa nuclear externa, **5** la capa plexiforme externa, **6** la capa nuclear interna, **7** la capa plexiforme interna, **8** la capa de células ganglionares, **9** la capa de fibras del nervio óptico y **10** la membrana limitante interna. Cada célula glial de Müller atraviesa casi todas las capas que componen la retina (3-10) e interactúa con todos los tipos de neuronas retinales formando, de cada uno de estos conjuntos, unidades funcionales. (Figura modificada de (Goldman, 2014)).

Los axones de las células ganglionares forman el nervio óptico, el cual conduce los impulsos hacia centros superiores de integración. Las células horizontales hacen sinapsis con los fotorreceptores y los interconectan en la capa sináptica externa, mientras que las amacrinas conectan a las células bipolares y ganglionares, no poseen axones y sus neuritas establecen conexiones presinápticas y postsinápticas con las neuronas circundantes (López-Colomé, 2005).

Además de las neuronas, la retina contiene células gliales llamadas glia radial de Müller que atraviesan la retina en todo su espesor y se ramifican extensamente en las capas plexiformes, en donde envuelven a los contactos sinápticos. Los procesos de estas células forman la membrana limitante interna en la superficie interna de la retina, y la membrana limitante externa en la capa

de los fotorreceptores (López-Colomé, 2005).

De manera análoga a la barrera hematoencefálica en el sistema nervioso central (SNC), la retina posee una barrera fisiológica, la barrera hematorretineana (BHR), que limita el flujo directo de las sustancias del suero sanguíneo hacia los intersticios celulares de la retina neural. Esta barrera está constituida por los endotelios capilares de la retina, el EPR, las células gliales de Müller y astrocitos fibrosos (Shechter *et al.*, 2013).

1.3 La glia de Müller

1.3.1 Las células gliales de la retina

En los seres humanos, la retina está compuesta por tres tipos de células gliales: la microglia, los astrocitos y las células gliales de Müller (o glia de Müller) (Vecino *et al.*, 2016). Aunque estas células tienen orígenes embrionarios distintos y funciones específicas en la retina, todas contribuyen al mantenimiento de la homeostasis retinal, tal como sucede en el resto del sistema nervioso (SN). En las últimas décadas, se ha revelado que, en ciertas condiciones, algunas células gliales pueden convertirse en progenitores pluripotenciales, capaces de regenerar varios tipos de neuronas (Goldman, 2014; Robel *et al.*, 2011; Vecino *et al.*, 2016). Más allá de la indispensable función reguladora y de mantenimiento de la glia, se sabe que, eventualmente, puede generar daño cuando algún agente nocivo provoca su reactivación y ocasiona que pierda su principal función. Es en este momento cuando la glia se convierte en un elemento patogénico primario (Vecino *et al.*, 2016).

Las células de la microglia están ampliamente distribuidas por todo el SNC. Tienen un soma pequeño rodeado de esbeltos procesos citoplasmáticos, que constantemente se mueven y sondan el microambiente circundante (Li y Zhang, 2016). Estas células nerviosas son las únicas que no derivan, durante la embriogénesis, del neuroepitelio, sino del mesodermo. Ante el daño nervioso, la microglia es la primera línea de respuesta inmune de la retina y son fundamentales durante la iniciación de procesos inflamatorios y de reparación tisular (Bringmann *et al.*, 2006).

Los astrocitos y la glia de Müller son dos tipos de células macrogliales que derivan de las células neuroepiteliales embrionarias (Alvarez-Buylla *et al.*, 2001). La macroglia tiene mecanismos de señalización intrínsecos, como la difusión de corrientes de calcio, que están correlacionadas con la liberación de glutamato. Lo anterior, tiene una función muy importante en la defensa inmune, en la angiogénesis y la neuroprotección (Vecino *et al.*, 2016). Aunque no es el caso de las células gliales de Müller, que son exclusivas de la retina, los astrocitos están presentes, también, en el resto del sistema nervioso (Reichenbach y Bringmann, 2012). En la retina, los astrocitos están confinados, de manera casi exclusiva, a las zonas más internas, próximas a la membrana limitante interna (MLI), en donde proveen metabolitos neurotróficos, soporte estructural y contribuyen al

mantenimiento de la barrera hematorretiniana (Vecino *et al.*, 2016). Los astrocitos permanecen quiescentes (esto es, con funciones regulares) en la retina, hasta que son reactivados por ciertos estímulos (por ejemplo, aumento en la presión intraocular, excitotoxicidad o isquemia retinal), en cuyo caso, cambia el comportamiento celular (véase más adelante, gliosis reactiva).

1.3.2 Morfología

Con respecto a las demás células gliales de la retina, la glia de Müller es la predominante y, por lo tanto, la que demanda mayor atención en las patologías retinales. El 90% de la glia total en la retina son células de Müller (Vecino *et al.*, 2016). Además, mientras que los astrocitos están localizados únicamente en la capa de células ganglionares (CCG) y la capa de fibras del nervio óptico (CFNO), la glia de Müller se ubica a lo largo de todas las capas de la retina neural, desde la MLI, hasta la membrana limitante externa (MLE) (Reichenbach y Bringmann, 2012). Los cuerpos de la glia de Müller se encuentran en la capa nuclear interna (CNI), desde donde emergen dos proyecciones citoplasmáticas oblongas en direcciones opuestas. El límite de una de estas proyecciones que se extiende internamente tiene forma de embudo y se conoce como pie terminal (*endfoot*). El conjunto de los pies terminales forman la MLI. La proyección contraria se extiende externamente hasta la MLE; ahí, las puntas de cada proyección terminan en microvellosidades que envuelven los segmentos internos de los fotorreceptores. La glia de Müller presenta procesos laterales que se extienden hacia las capas plexiformes (la capa plexiforme interna (CPI) y la capa plexiforme externa (CPE)), en donde forman vainas muy elaboradas alrededor de las sinapsis neuronales, y presenta procesos que se extienden también hacia las capas nucleares (la CNI y la capa nuclear externa (CNE)), en donde envuelven a cada pericarión neuronal (Figura 1.2)(Reichenbach y Bringmann, 2012). Este tipo de comunicación intercelular, de las células gliales de Müller con el resto de las neuronas de la retina, ocurre en columnas celulares que cruzan todas las capas de la retina, en las que cada célula de Müller es el pilar que sostiene y se comunica con un cono, diez bastones, hasta seis neuronas de la CNI y hasta dos células ganglionares (Reichenbach y Bringmann, 2012). Estas columnas celulares constituyen la unidad mínima funcional de procesamiento de información por retroalimentación en la retina (Reichenbach y Bringmann, 2012).

1.3.3 Función

Como se mencionó, las columnas celulares de la retina, de las cuales, la glia de Müller es el núcleo, son las unidades funcionales de procesamiento de la información óptica que la retina recibe (Reichenbach y Bringmann, 2012). Además, a cada célula de Müller le corresponde cierto espacio intercelular y un conjunto de células al que constantemente sondea, procura el equilibrio homeostático y provee de precursores metabólicos. Las funciones que la glia de Müller desempeña

son las siguientes:

- **Mantener la cohesión y la forma estructural de la retina.** La glia de Müller es el principal soporte estructural de las columnas celulares de la retina; sostiene a las neuronas y a los capilares de la retina, como si se tratara de un andamio (Reichenbach y Bringmann, 2013).
- **Suministrar de precursores metabólicos a las neuronas de la retina.** A manera de un intercambio molecular entre cada célula de Müller y las neuronas a las que esta asociada, la glia de Müller provee de metabolitos y precursores de neurotransmisores, a la vez que libera de desechos metabólicos a las células adyacentes (Reichenbach y Bringmann, 2013).
- **Regular el espacio intersticial** La actividad neuronal esta asociada con alteraciones en el volumen de los intersticios celulares neuronales. Esto ocurre por el flujo continuo de iones a través de los receptores ionotrópicos de las neuronas que, eventualmente, modifican la osmolaridad del medio extracelular. La glia de Müller modifica la longitud y grosor de sus procesos celulares, por un lado y, secreta iones de potasio y de cloro para compensar decrementos en la osmolaridad del medio, por el otro (Reichenbach y Bringmann, 2012).
- **Drenar y mantener niveles adecuados de agua intersticial** El agua suele acumularse en el intersticio retinal por el transporte activo de la glucosa y el metabolismo oxidativo de este mismo glúcido. El agua es evacuada de la retina hacia la circulación sanguínea, el espacio coroideo y la cámara vítrea, por transporte transmembranal, mediante acuaporinas de las células de Müller (Reichenbach y Bringmann, 2013).
- **Contribuir al mantenimiento de la integridad de la BHR** Las células de Müller y los astrocitos forman la BHR interna. Esta barrera fisiológica tiene mayor distribución en la retina que la BHR externa, compuesta por el EPR, la membrana de Bruch y los endotelios capilares asociados. La BHR interna esta formada por las células endoteliales de los capilares sanguíneos distribuidos en la retina y los procesos celulares de la macroglia que envuelven a estos. Las células de Müller, por tanto, son un filtro adicional de la BHR interna. Estas células evitan que cualquier sustancia que pueda alterar el delicado equilibrio homeostático ingrese en la retina (Reichenbach y Bringmann, 2013).
- **Modular las respuestas inflamatorias e inmunes** Cuando ocurre algún tipo de daño en la retina, la microglia es la primera en reaccionar frente a este. Estas células son las primeras en reclutar a los mecanismos de inflamación e inmunológicos necesarios para responder ante los daños generados. Aunque la glia de Müller son las últimas células en responder, tienen receptores capaces de reconocer patógenos (los receptores *Toll-like* (TLR)), y en consecuencia,

secretan citocinas y quimiocinas que provocan la inflamación, péptidos antimicrobianos y factores de crecimiento neuroprotectivos (Kumar *et al.*, 2013).

- **Alterar directamente la función neuronal** A través de la liberación de gliotransmisores y otras sustancias neuroactivas, las células de Müller pueden modificar los potenciales de acción que las neuronas generan. El glutamato es uno de estos gliotransmisores que, además de ser metabolizado por la glia de Müller para el suministro neuronal, es secretado para afectar de manera directa la actividad sináptica neuronal (Reichenbach y Bringmann, 2013).
- **Conducir la luz a través del entramado de las capas retinales hasta los fotorreceptores.** La organización estructural de las columnas celulares, además, permite que cada célula de Müller tenga la función de un conductor de luz, como si esta fuera un cable de fibra óptica. De esta manera, la luz que entra en la cámara vítrea es encauzada, desde los pies terminales, que funcionan como colectores fóticos, a lo largo de ambas proyecciones celulares, hasta llegar a los procesos celulares de los fotorreceptores, evitando que la luz sea bloqueada en las capas nucleares y plexiformes por dispersión óptica (Reichenbach y Bringmann, 2012).
- **Regenerar los ftopigmentos necesarios en la transducción de las señales luminosas** La función más elemental de los fotorreceptores, la transducción de los estímulos ópticos en señales bioquímicas, está íntimamente relacionada con la glia de Müller. El proceso de fototransducción en los fotorreceptores implica la conversión de 11-*cis* retinal en holo-*trans* retinal por un estímulo óptico. La disponibilidad de 11-*cis* retinal depende de dos ciclos de regeneración independientes que parten de la conversión de holo-*trans* retinal en holo-*trans* retinol, en los mismos fotorreceptores. El holo-*trans* retinol que proviene de los fotorreceptores es reciclado para generar 11-*cis*retinal. Esto último ocurre en el epitelio pigmentado de la retina (EPR) y en la glia de Müller. El 11-*cis* retinal generado en el EPR es enviado a los bastones, mientras que el 11-*cis* retinal que generan las células gliales de Müller se destina a los conos (Reichenbach y Bringmann, 2013).

1.3.4 Patologías asociadas con las células gliales de Müller

La retina debe mantenerse completamente extendida y unida a la capa coroidea, para lograr que la percepción luminosa sea nítida. La deformación de la retina es reconocida por las células gliales de Müller, las cuales, responden induciendo vías de señalización mediadas por la activación de calcio, la activación de ERK1/2 y el aumento de la expresión de c-FOS y bFGF (Lindqvist *et al.*, 2010). Las membranas epirretinales que surgen en algunas enfermedades proliferativas pueden provocar la respuesta anterior en las células de Müller. Las fibras vítreas que se adhieren a los pies terminales de las células de Müller, durante la tracción inducida por el desprendimiento

de la retina, también provocan su reactivación. La reactivación de estas células se traduce en la proliferación e hipertrofia y, en ciertos casos, en fuga vascular (Reichenbach y Bringmann, 2012).

Lo anterior sugiere que, si bien es incuestionable la importancia de la células gliales de Müller para combatir los desequilibrios homeostáticos y los daños en la retina, existe un umbral en el que estas células dejan de mitigar y tratar de revertir el daño para convertirse en un factor patológico primario (Reichenbach y Bringmann, 2012). Esto ocurre a partir de la reactivación glial, o también llamada gliosis reactiva. En principio, esta es una respuesta normal de la glia para combatir el daño en el SN. Sin embargo, esta respuesta tiene un lado negativo en el tejido que debería reparar cuando, al parecer, pierde el control de su actividad durante la reactivación. En particular, la proliferación exacerbada de la glia de Müller es una respuesta de gliosis reactiva que tiene efectos adversos en la retina. Cuando esto ocurre, se pierde la estrecha y delicada interacción simbiótica entre glia y neuronas.

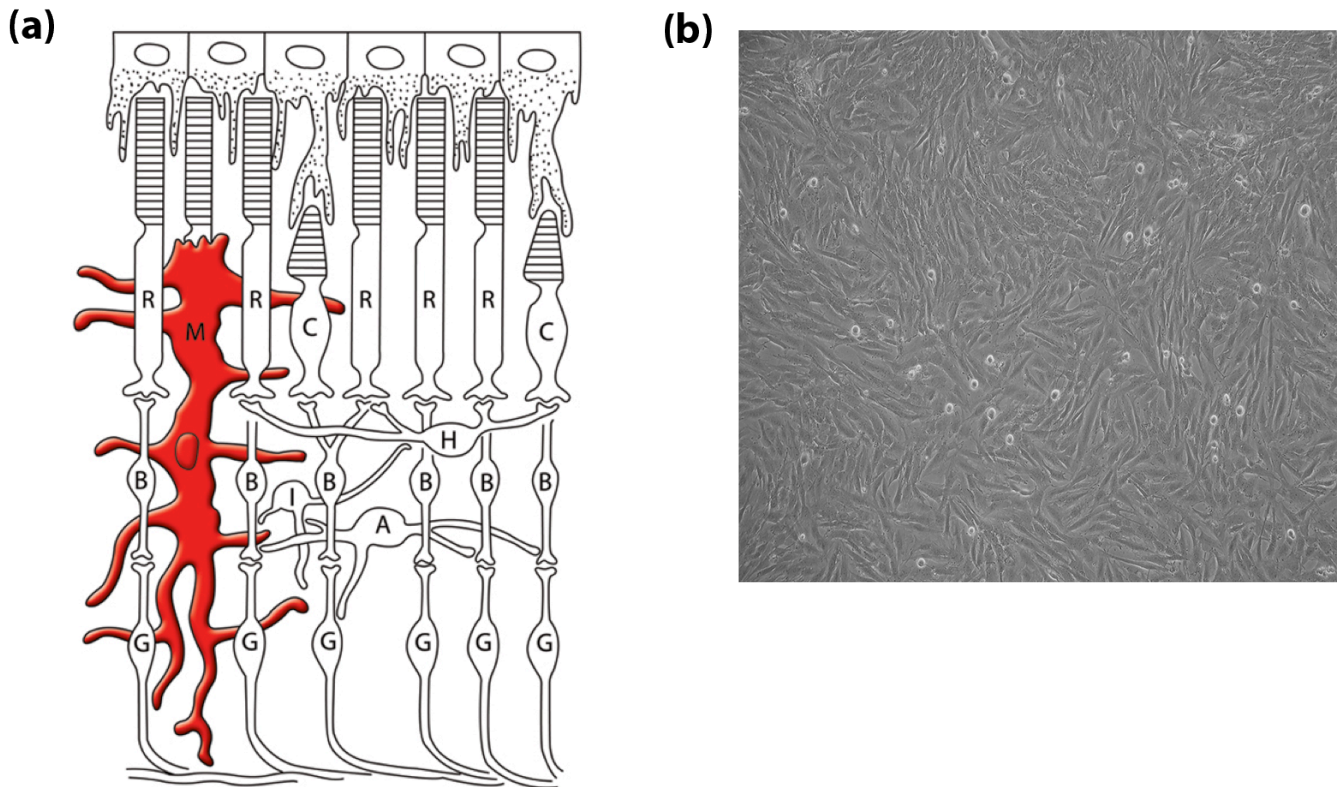


Figura 1.3: La organización de la retina está definida por el sistema estratificado de las células nerviosas, sus cuerpos, proyecciones y las uniones entre estos. (a) Cada célula de Müller se extiende a lo largo de todos los estratos retinianos, interactúa, regula la función de las neuronas contiguas y les proporciona soporte estructural y metabólico. (b) Microfotografía de un cultivo de la línea de células gliales de Müller, MIO-M1. (Las imágenes son cortesía del acervo digital de la Dra. López Colomé). M: célula glial de Müller ; R: bastón; C: cono; B: célula bipolar; H: célula horizontal; I: célula interplexiforme; A: célula amacrina; G: célula ganglionar

1.3.5 Gliosis

El daño en el tejido del sistema nervioso provoca la activación de respuestas fisiológicas en las células circundantes a la herida que, probablemente, surjan como mecanismos de reparación y mitigación del daño. En el sistema nervioso, el comportamiento de las células gliales que están próximas a una herida puede cambiar por el estímulo que el daño genera y, cuando esto ocurre, se dice que la glia ha sido reactivada (Burda y Sofroniew, 2014; Robel *et al.*, 2011). Se piensa que, en principio, este es un intento de la glia por detener el avance del daño tisular, promover la reparación y restringir la remodelación del tejido (Reichenbach y Bringmann, 2012). La gliosis en astrocitos (astrogliosis) y la gliosis en la microglia (microgliosis) han sido las mejor estudiadas por la ubicuidad de estas células en el sistema nervioso. No obstante, se ha documentado también la reactivación de la glia NG2 (células progenitoras de oligodendrocitos positivas a NG2) y la glia de Müller cuando se generan daños en aquellos tejidos de los que éstas células forman parte (Bringmann *et al.*, 2006; Burda y Sofroniew, 2014; Robel *et al.*, 2011). En general, durante la gliosis las células pueden adoptar cambios morfológicos, como la hipertrofia, o fisiológicos, como la migración y la proliferación, aunque, el tipo de respuestas en particular, depende del tipo celular y la intensidad del estímulo (Robel *et al.*, 2011).

La microglia es la primera línea de defensa en reactivarse en respuesta al daño nervioso (Li y Zhang, 2016). Cuando esto ocurre, la microglia migra a la zona de daño e inicia las posteriores reacciones gliales e inmunes (Robel *et al.*, 2011). Además, la microgliosis se distingue por el aumento en la tasa de proliferación de la microglia, el repliegue de sus procesos citoplasmáticos, la alteración de los marcadores de membrana, la hipertrofia y la adopción de fenotipos celulares ameboides (Li y Zhang, 2016). En el cerebro, las últimas células en activarse son los astrocitos. Estos presentan cambios drásticos en su morfología, expresión genética y función (Robel *et al.*, 2011). Recientemente, se ha documentado que la glia NG2 es reactivada cuando ésta es estimulada por daño nervioso. Cuando estas células son reactivadas, migran hacia el sitio de la herida nerviosa, proliferan y, además, algo que es particular de esta glia, son capaces de regenerar oligodendrocitos (Burda y Sofroniew, 2014).

En modelos experimentales *in vivo*, que consisten en cirugías de desprendimiento de la retina en conejos y gatos para su evaluación histológica y molecular, a distintos intervalos de tiempo, la gliosis en células de Müller ha sido observada pocos días después del desprendimiento de la retina (Anderson *et al.*, 1986). Experimentos similares han demostrado que la severidad del daño causado por la gliosis es proporcional al tiempo en el cual la retina permanece desprendida (Anderson *et al.*, 1986; Geller *et al.*, 2001). Como ya se ha mencionado, en la retina, la población de células macrogliales está principalmente compuesta por la glia de Müller y, en menor medida, por astrocitos fibrosos. Es por esta razón que, en la retina, el interés de la gliosis reactiva se concentre en las células gliales de Müller. Se sabe que en las células de Müller, la gliosis reactiva está principalmente

asociada con la proliferación (Bringmann *et al.*, 2006), pero no existen muchos estudios que lo demuestren experimentalmente, ni aquellos que expliquen los mecanismos moleculares por los cuales ocurre esta respuesta.

1.4 La Vitreorretinopatía proliferativa

La vitreorretinopatía proliferativa (VRP) es la principal causa del fracaso que resulta de las cirugías para la corrección anatómica del desprendimiento de la retina. Aunque el 90% de estas cirugías logra corregir el desprendimiento de la retina, entre el 5 y el 10 % de los pacientes en esta proporción desarrollan, eventualmente, VRP (Guidry, 2010).

La VRP se caracteriza por la proliferación y migración celular anormal que genera membranas contráctiles celulares sobre ambas superficies de la retina causando, eventualmente, el desprendimiento parcial o total de la retina por la tracción que éstas membranas generan. El proceso específico que lleva a la formación de las membranas epiretinales en la VRP aún no es dilucidado (Nagasaki *et al.*, 1998), aunque la composición histológica de estas se conoce muy bien. Estas membranas están compuestas, principalmente, de células del EPR y células gliales de Müller y, en menor proporción, de astrocitos, microglia, fibroblastos, macrófagos y linfocitos (Nagasaki *et al.*, 1998).

La VRP puede ser causada por el desprendimiento regmatógeno de la retina, intervenciones quirúrgicas en este tejido o traumatismos oculares (Wiedemann *et al.*, 2013). Aunque la causa específica de la VRP no se conoce, se sabe que su desarrollo está relacionado con el daño tisular retiniano y, de manera muy estrecha, con el rompimiento de la barrera hematorretiniana (factores comunes en los traumatismos y las cirugías oculares) (Nagasaki *et al.*, 1998). En este contexto, la VRP surge como una respuesta de reparación tisular (*wound-healing response*), estimulada en exceso y de adaptación deficiente (Bringmann *et al.*, 2006; Wiedemann *et al.*, 2013). Lo anterior tiene como consecuencia dos cosas de reconocida importancia: que las células del EPR logren ingresar a la cámara vítrea y que muchos de los componentes del suero sanguíneo invadan la retina. Esto permite que tales sustancias entren en contacto con las células retinales que, de otra manera, no podrían ingresar por no ser permeables a través de la BHR. Estos componentes, a su vez, promueven y aceleran la migración y la proliferación de las células del EPR que ya han invadido el humor vítreo (Wiedemann *et al.*, 2013).

Las células del EPR tienen una actividad preponderante en la VRP y se consideran como un elemento clave en el desarrollo de esta enfermedad (Pastor *et al.*, 2002). Cuando el EPR pierde el contacto con la retina neural, las células de este epitelio sufren cambios morfológicos y funcionales que les confieren características propias de células mesenquimatosas, fibroblastos o miocitos (Pastor *et al.*, 2002; Ruiz-Loredo *et al.*, 2011). Durante la VRP, las células del EPR secretan citocinas,

como las isoformas I y II del Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), que a su vez promueven la transformación fenotípica y la secreción de proteínas de la matriz extracelular, entre las que destacan la fibronectina y las isoformas I, II y III de la colágena (Pastor *et al.*, 2002; Wiedemann *et al.*, 2013). La síntesis de matriz extracelular es un elemento que destaca en la formación de las membranas epirretinales en la VRP, en particular, la colágena es el principal componente extracelular de estas membranas. La síntesis de matriz extracelular aumenta la capacidad de las células del EPR para migrar, brindando un soporte de anclaje y tracción (Nagasaki *et al.*, 1998; Pastor *et al.*, 2002); al mismo tiempo, la síntesis y secreción de metaloproteinasas de matriz (MMPs), principalmente MMP-2 y MMP-9, permiten el desplazamiento de las células a través del espacio retinal y la remodelación de la matriz extracelular (Pastor *et al.*, 2002) .

Por convención, se han establecido estadios en el desarrollo de la VRP, según el daño que causa en la retina. El estadio inicial, el grado "A", se caracteriza por la presencia de "bruma" en el vítreo que obstaculiza la visión. En el siguiente estadio, el grado "B", se presentan "arrugas" o pliegues en la superficie interna de la retina, en este, también hay rigidez retinal y se observa tortuosidad vascular. El estadio siguiente, el grado "C", a su vez se subdivide en "C1", "C2" y "C3", dependiendo de la extensión de la retina afectada por el desarrollo de la enfermedad. Es "C1" si el engrosamiento retinal ocupa un cuadrante de la retina, "C2" si ocupa dos cuadrantes y "C3" cuando ocupa tres cuadrantes. El grado "D", se caracteriza por dobleces retinales fijados en cuatro cuadrantes. Por el grado de desprendimiento se subdivide en "D1", "D2" y "D3". Es "D1" si la retina ya presenta forma de embudo, "D2", si éste embudo es demasiado angosto, o "D3", si el embudo retinal está cerrado, de manera que se pierde de vista el nervio óptico (Nagasaki *et al.*, 1998).

El desarrollo de la VRP y la severidad del daño en la retina están asociados, a su vez, a la magnitud del daño que ha sufrido la integridad de la BHR. Si el daño en la BHR es mínimo, el desarrollo de la VRP es lento y, probablemente, reversible. De lo contrario, si el daño en la BHR es agudo, el desarrollo de la VRP sucede con celeridad y es, con mayor probabilidad, irreversible. En cualquier caso, el desarrollo de la VRP seguirá latente mientras la integridad de la BHR permanezca alterada (Nagasaki *et al.*, 1998).

Considerando los factores de incidencia de la VRP es sensato pensar que las causas moleculares que permiten el desarrollo de esta enfermedad puedan asociarse a las sustancias que ingresan a los intersticios celulares de la retina, cuando se rompe la continuidad de la BHR. Qué factores y en qué medida contribuyen al desarrollo de la VRP, son cuestiones complejas que aún no han sido totalmente aclaradas.

1.5 La trombina y los Receptores Activados por Proteasa (PARs)

1.5.1 La trombina

La trombina es una proteasa de serina, presente como zimógeno en el suero sanguíneo, que destaca como el activador más importante de la agregación plaquetaria y la trombosis, dos de los tres procesos más importantes durante la hemostasia (la secuencia de reacciones que detienen el sangrado) (Bode, 2006; Coughlin, 2000; Tortora y Derrickson, 2006; Vu *et al.*, 1991). La trombosis - o coagulación- ocurre en la superficie vascular dañada a través de la sucesiva conversión y activación de ciertos zimógenos de proteasas que derivan en la formación del coágulo sanguíneo para detener la hemorragia. Cuando ocurre una herida vascular, el factor tisular (TF) y el factor VIIa (FVIIa) activan al factor factor X (FX), y éste a su vez, se asocia con el factor factor Va (FVa) para formar la protrombinasa, que convierte al zimógeno protrombina en trombina (Coughlin, 2005) (figura 1.4). En esta cascada, la trombina es la última proteasa en ser activada. Una vez en su forma activa, la trombina cataliza la formación de fibrinógeno en fibrina y activa al factor XIII, que forma las uniones de los complejos de fibrina. La trombina, además, promueve la agregación plaquetaria mediante señalamiento intracelular, que actúa como un "tapón" en las heridas de los vasos sanguíneos, reduciendo la fuga vascular antes de la coagulación (Bode, 2006) (figura 1.4). La trombina regula su activación por retroalimentación negativa al activar al sistema de la proteína C, que inhibe su producción, y por regulación positiva, al activar a los factores de coagulación FIX FVIII y FV, que la estimulan (Coughlin, 2005).

Además de ser una enzima clave para lograr la trombosis, la trombina también participa en otras respuestas fisiológicas: durante la inflamación, en la reparación del daño vascular, como mitógeno de linfocitos, como factor que aumenta la expresión de la proteína de membrana granular 140 (GMP-140) en plaquetas y del PDGF en células endoteliales; por mencionar algunos ejemplos (Vu *et al.*, 1991). Particularmente, en contextos patológicos como el cáncer y otras enfermedades proliferativas, se ha vinculado la actividad de la trombina con proliferación, migración y metástasis (Wojtukiewicz *et al.*, 2015). Muestra de ello es el hecho de que el factor tisular y la trombina están presentes en los microambientes de las células malignas o tumorales y, a ambas moléculas, se les ha relacionado con la capacidad de invasión de estas (Asanuma *et al.*, 2004; Wojtukiewicz *et al.*, 2015).

Además del sitio catalítico, la trombina posee tres regiones o sitios que regulan su actividad: el sitio de unión de Na^+ , el exosito I y el exosito II. El Na^+ es un modulador alostérico que le confiere a la trombina dos estados: "rápido", cuando la trombina interactúa con él, y "lento", cuando el Na^+ está ausente. En el estado alostérico "rápido" la trombina tiene la capacidad de

catalizar la formación de fibrina, a partir de fibrinógeno, y de activar a PAR1 (uno de los receptores de la trombina); en el estado "lento", cuando el Na^+ está ausente, la trombina pierde las funciones anteriores y, en su lugar, actúa como anticoagulante (Bode, 2006). El exosítio I es una región en la trombina, con abundantes residuos de carga positiva, que interactúa y reconoce sitios específicos de sustratos, cofactores e inhibidores. Esta región de la trombina está involucrada en el reconocimiento específico del fibrinógeno y del extremo amino terminal de PAR1. El exosítio II de la trombina, como sucede con el exosítio I, es una región con carga preponderantemente positiva e involucrada en el reconocimiento de sustratos, inhibidores y cofactores. Esta región se asocia frecuentemente con el reconocimiento de la heparina y la trombosmodulina, ambos, inhibidores endógenos (Bode, 2006).

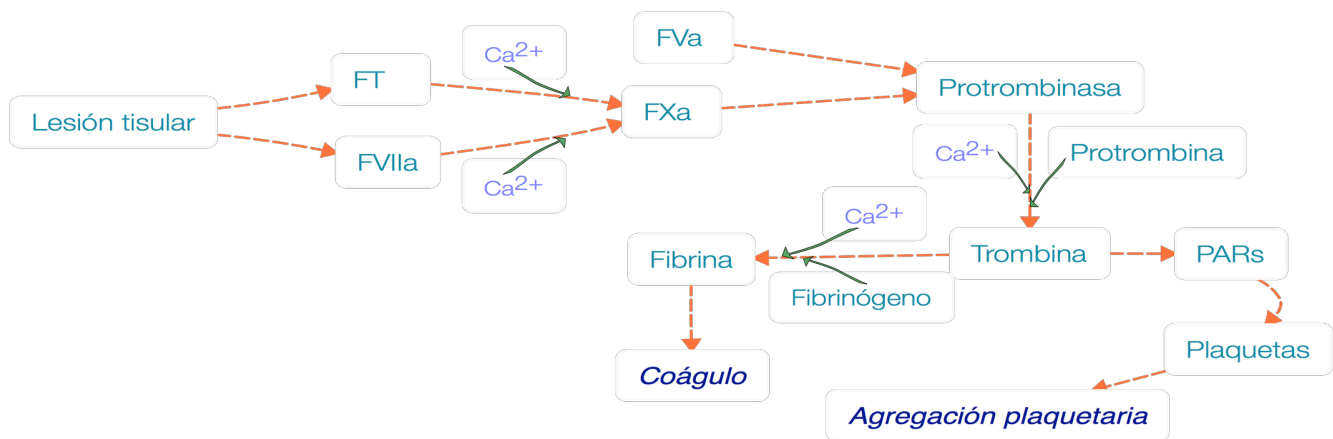


Figura 1.4: La trombina es un factor de coagulación clave en dos de los tres procesos más importantes de la hemostasia: la formación del coágulo de fibrina y la formación del tapón plaquetario. El Ca^{2+} participa como cofactor en todos los procesos de activación de los factores de coagulación. Por una parte, la trombina cataliza la formación de fibrina mediante la proteólisis del fibrinógeno; por otra parte, la trombina promueve el señalamiento intracelular, mediante los PARs, que provoca, principalmente, la agregación plaquetaria. **FT:** factor tisular ; **FVIIa:** factor VII activado; **FVa:** factor V activado; **FXa:** factor X activado

En el párrafo anterior se mencionaron algunos inhibidores de la trombina, empero, frecuentemente se usan algunos otros que son más específicos o potentes en el estudio de esta proteasa y sus efectos en las células. La hirudina es un polipéptido derivado de las sanguijuelas cuyo extremo carboxilo, abundante en residuos ácidos (en el dominio Asp-Phe-Glu-Glu-Ile), similar a la región reconocida en el fibrinógeno o PAR1, se une de manera reversible al exosítio I de la trombina, impidiendo el reconocimiento de sus principales sustratos. Por otra parte, PPACK (D-Phe-Pro-Arg-clorometilcetona) forma una unión covalente con la Ser del sitio activo de la trombina, evitando que la trombina pueda catalizar la proteólisis de cualquier sustrato (Bridging *et al.*, 2014).

Las respuestas celulares provocadas por la trombina, ocurren mediante el señalamiento intra-

celular, a partir de la activación de receptores membranales. Aunque la trombina no es el ligando de ningún receptor conocido, es capaz de activar a ciertos receptores: los receptores activados por proteasas (PARs). Estos, constituyen una familia de cuatro receptores acoplados a la proteína G (GPCRs): PAR1, PAR2, PAR3 y PAR4. Son los únicos GPCRs que se activan por proteasas y, con excepción de PAR2, la trombina es la activadora común y más importante. La activación de estos receptores ocurre cuando la trombina corta un fragmento del extremo amino extracelular del receptor y, de este modo, expone una nueva región peptídica: éste, es el verdadero ligando del receptor.

1.5.2 PAR1

Aunque muchas de las funciones de la trombina se conocían desde hace varias décadas, no se sabía de qué manera ésta es capaz de desencadenar el señalamiento intracelular. Se sugirieron modelos de interacción de la trombina como el ligando de un receptor hipotético, que tuvieron éxito al hallar proteínas que se ajustaron a este criterio, aunque estas no eran proteínas vinculadas a procesos de transducción de señales. Más tarde, un grupo de investigadores partió de la hipótesis de considerar a la trombina como agente activador de un receptor por proteólisis y, entonces, lograron clonar al primer receptor que satisfizo esta característica (Vu *et al.*, 1991). El receptor en cuestión fue nombrado "receptor de trombina", después renombrado como "receptor activado por proteasa 1" (PAR1). Estos investigadores demostraron que la trombina activa de manera específica a este receptor, que el péptido amino terminal resultante de la proteólisis por la trombina es el ligando del mismo receptor y que su activación provoca el aumento de la concentración de calcio intracelular (por lo que se infiere, señala a través de la vía fosfolipasa C (PLC) / inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃) / Ca²⁺) (Figura 1.5) (Vu *et al.*, 1991).

La trombina reconoce el dominio ácido (principalmente Tyr⁵², Glu⁵³ y Phe⁵⁵) del extremo amino de PAR1, en donde corta el enlace peptídico situado entre la Arg⁴¹ y la Ser⁴² (Vu *et al.*, 1991) (figura 1.5). Lo anterior descubre el nuevo extremo amino del receptor con la secuencia de aminoácidos, "SFLLR", que interactúa con la segunda asa extracelular del receptor y funciona como el ligando endógeno de PAR1 (Gerszten *et al.*, 1994) (figura 1.7). Esto provoca cambios en la conformación molecular de PAR1 descubriendo regiones en su extremo carboxilo citosólico que interactúan con la subunidad α de la proteína G acoplada, iniciando así el señalamiento intracelular (Soh *et al.*, 2010a).

1.5.3 PAR2

El segundo miembro de la familia de los PARs en ser descrito, PAR2, fue descubierto por la secuencia y topología similar que guarda con PAR1. PAR2 tiene, aproximadamente, 30% de iden-

tividad general con PAR1, 44% en los dominios membranales, y carece de identidad significativa en los extremos amino y carboxilo terminales (con excepción del sitio de proteólisis Arg-Ser) (Nystedt *et al.*, 1994). No obstante, este receptor promueve la señalización intracelular de forma muy similar a PAR1, aunque se distingue por ser activado proteolíticamente por la tripsina, entre la Arg³⁶ y la Ser³⁷ (Nystedt *et al.*, 1994). El ligando desenmascarado de esta proteólisis es "SLIGKV" (Nystedt *et al.*, 1994, 1995) (Figura 1.5 (b)). PAR2 también tiene selectividad funcional, dependiendo de la molécula que lo active (cuadro 1.1). Al igual que PAR1, PAR2 puede evocar cascadas de señalización a través de las proteínas G heterotriméricas G_q, G_{12/13} y G_i (Soh *et al.*, 2010a).

1.5.4 PAR3

El segundo receptor activado por la trombina y, el tercero de la familia, PAR3, fue descubierto en plaquetas de ratón. Estas células no expresan a PAR1 y, a pesar de ello, son activadas por la trombina (Connolly *et al.*, 1996). La activación de PAR3 ocurre por el corte proteolítico de la trombina en su extremo amino terminal, entre los aminoácidos Lys³⁸ y Thr³⁹ (Ishihara *et al.*, 1997), descubriendo el ligando endógeno "TFRGAP". No obstante, a diferencia de PAR1 y PAR2, los cuales son activados por varias proteasas y los péptidos agonistas sintéticos con la secuencia del ligando endógeno, PAR 3 sólo es activado por la trombina, la tripsina y la proteína C activada (APC). Los péptidos agonistas de PAR3, "TFRGAP" y "TFRGAPPNS", no son capaces de provocar respuesta alguna en este receptor (Ishihara *et al.*, 1997).

La capacidad de PAR3 para iniciar el señalamiento fue puesta en duda durante varios años, entonces se pensaba que PAR3 podría funcionar como cofactor al dimerizar con otro receptor (PAR4, por ejemplo) (Coughlin, 2005). Sin embargo, la activación de PAR3 por la trombina en las células del epitelio pulmonar A549, las cuales no expresan a ningún otro miembro de los PARs, provoca la secreción de ATP a través de la activación de las vías del Ca²⁺ intracelular y de Rho (Seminario-Vidal *et al.*, 2009). Lo anterior sugiere que, al menos en las células A549, PAR3 es capaz de señalar a través de la activación de las proteínas G heterotriméricas G_q y G_{12/13}.

La homología de las secuencias de aminoácidos de PAR3 y PAR1 tienen 27 % de identidad general (Ishihara *et al.*, 1997). PAR3 conserva la secuencia en la segunda asa extracelular del receptor, "ITTCHDV", un dominio que comparte con PAR1 y PAR2, que podría tratarse del sitio de interacción con el ligando que activan a los PARs (Gerszten *et al.*, 1994). Por otro lado, las secuencias en los extremos amino y carboxilo terminales están poco conservadas, con excepción del dominio ácido que el exosito I de la trombina reconoce "FEEF" (Ishihara *et al.*, 1997).

1.5.5 PAR4

El último receptor de la familia, PAR4, fue clonado y, desde entonces, ningún otro receptor similar ha sido descubierto. PAR4 fue hallado como intuición lógica al observar que, luego de silenciar el gen de PAR1 en plaquetas de humano, o el gen de PAR3 en plaquetas de ratón, la incubación con trombina seguía provocando, aunque de manera tardía, hidrólisis de fosfatidil inositol 3, 4 bifosfato (PIP₂), flujo de calcio intracelular y agregación plaquetaria (Kahn *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1998). PAR4 es activado por proteólisis en su extremo amino causada por la trombina, entre los sitios Arg⁴⁷ y Gly⁴⁸, descubriendo el ligando endógeno "GYPGQV". PAR4 también puede ser activado por varias proteasas (cuadro 1.1), sin embargo, la afinidad por la trombina en PAR4 es demasiado baja, comparada con la de PAR1 (Kahn *et al.*, 1998; Soh *et al.*, 2010a; Xu *et al.*, 1998). El péptido sintético con la secuencia del ligando endógeno de PAR4 "GYPGQV", puede activar al receptor, no obstante, el péptido sintético con la secuencia "AYPGKF" provoca la misma respuesta diez veces aumentada. La transducción de señal de éste receptor puede ocurrir a través de las proteínas G heterotriméricas G_q y G_{12/13} (Soh *et al.*, 2010a).

PAR4 tiene un 33% de identidad en la secuencia de aminoácidos comparada con PAR1, sin embargo, PAR4 carece del dominio ácido, adyacente al sitio de corte en el extremo amino, que el exosito I de la trombina reconoce en PAR1 y PAR3 (Xu *et al.*, 1998). Además, PAR4 sólo tiene tres aminoácidos de la secuencia del dominio en la segunda asa extracelular, "ITTCHDV", que conservan el resto de los PARs (Xu *et al.*, 1998). La ausencia del dominio ácido y la baja retención de la secuencia del dominio de la segunda asa extracelular en PAR4 podrían explicar la baja afinidad de la trombina por este receptor.

1.5.6 Señalización de los PARs

Los miembros de los PARs tienen efectos fisiológicos muy diversos y esto es dependiente del tejido celular o célula que los exprese. El cuadro 1.1 resume las principales características de estos receptores con las funciones que, se sabe, provocan en algunas células. El mecanismo de activación de PAR1, el receptor prototipo de los PARs, y las principales vías de señalización que estos receptores evocan se ilustran en la figura 1.7. A pesar de las diferencias en las secuencias de los extremos amino y carboxilo entre los PARs (figura 1.6), la activación de estos son similares; los cuatro receptores son activados por proteasas de serina, interactúan con el ligando endógeno de manera similar e interactúan con distintas isoformas de la proteína G (Soh *et al.*, 2010b).

Además de la trombina, los PARs pueden ser activados por otras proteasas o péptidos sintéticos con la misma secuencia, o muy similar, al ligando endógeno que la trombina genera (cuadro 1.1). Estos pueden provocar respuestas idénticas o muy distintas a las que la trombina provoca. Esto se conoce como "selectividad funcional", en la farmacología de los GPCRs (Soh *et al.*, 2010a). Este

sesgo en la señalización puede ser demasiado sensible al tipo de activación. Por ejemplo, en células endoteliales, las vías de señalización que la trombina y el péptido sintético desencadenan en PAR1 son distintas (Soh *et al.*, 2010a). La selectividad funcional se debe a que uno u otro activador provocan distintos cambios conformacionales en el receptor. La activación diferencial de los PARs puede desencadenar vías de señalización que son dependientes de las isoformas G_q , $G_{12/13}$ y G_i , de la proteína G acoplada al receptor o, incluso, independientes de ésta (Soh *et al.*, 2010a; Zhao *et al.*, 2014) (cuadro 1.1).

Además de los diferentes modos de activación, la selectividad funcional puede deberse a factores determinados por la célula. La glucosilación en los receptores membranales es una modificación postraduccional que ocurre en el aparato de Golgi y que, generalmente, provoca que los receptores recién sintetizados sean exportados a la membrana plasmática. No obstante, la glucosilación puede tener otras funciones que son particulares de cada proteína. En el caso de PAR1, los residuos glucosilados en su extremo amino funcionan como la señal que provoca que este receptor sea exportado a la membrana plasmática. Sin embargo, los residuos glucosilados en su segunda asa extracelular (figura 1.5) provocan que la señalización ocurra a través de la subunidad $G_{\alpha_{12}}$, mientras que la ausencia de glucosilación en esta región promueve el señalamiento, preferentemente, mediante la subunidad G_{α_q} (Soto *et al.*, 2015).

Por otra parte, se sabe que la homodimerización y heterodimerización de los PARs con algunos otros receptores, puede modificar la función y la interacción con la proteína G, en repercusión del señalamiento celular (Canto *et al.*, 2012; Soh *et al.*, 2010a). Por ejemplo, el caso de la dimerización de PAR1 y PAR4 o PAR4 y PAR4, en plaquetas humanas y de ratón respectivamente, provoca el aumento del efecto de la agregación plaquetaria; o en un caso muy distinto, la activación de PAR1 por APC provoca a su vez la activación directa del receptor de esfingosina 1-fosfato (S1P).

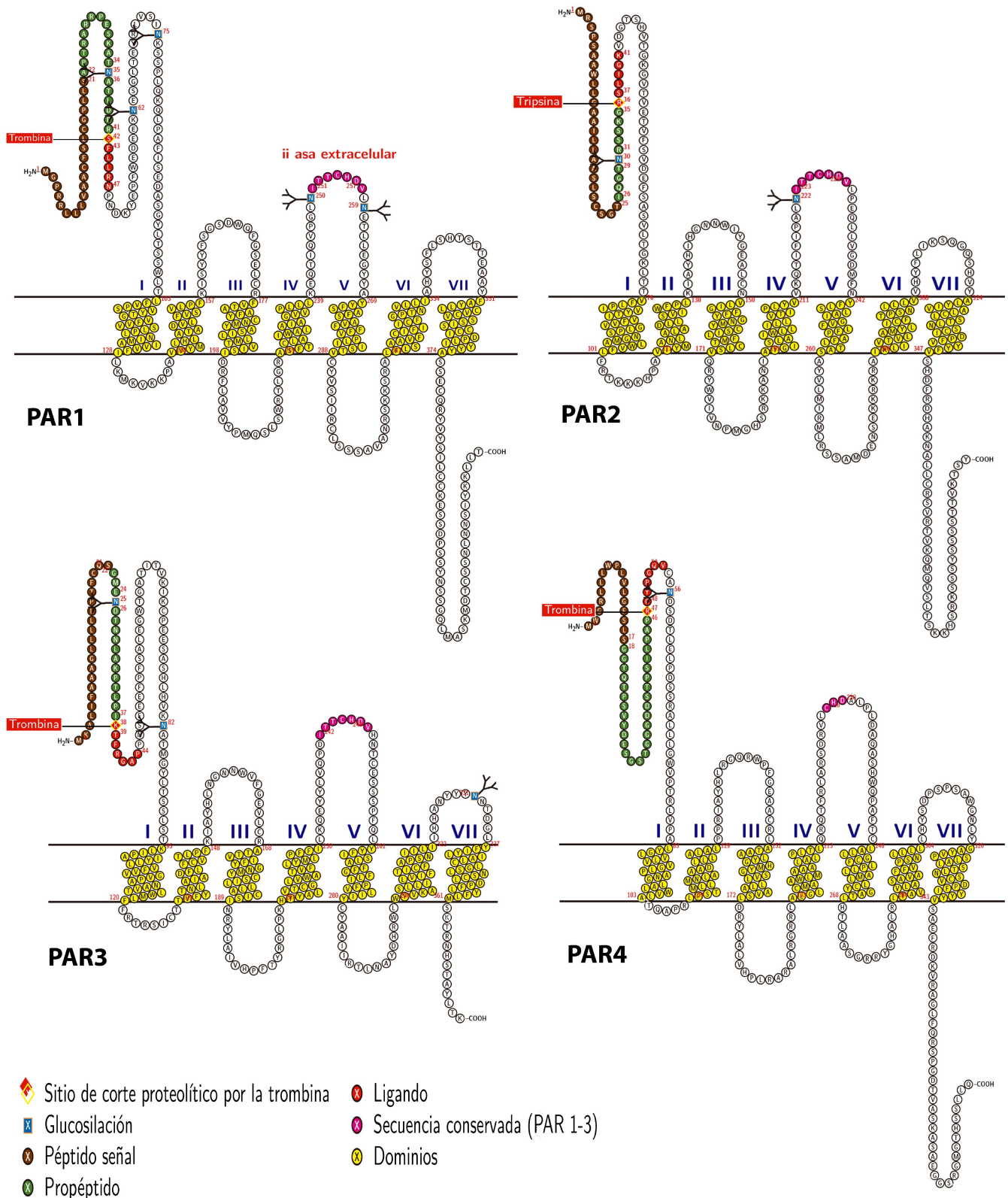


Figura 1.5: Los cuatro receptores activados por proteasas (PARs) tienen semejanzas, tanto en su activación, como en su interacción con el ligando endógeno (propéptido). Además, tienen similitudes y diferencias estructurales en los dominios funcionales que están definidos por la secuencia de aminoácidos. Aunque PAR1, PAR3 y PAR4 son activados por la trombina, la afinidad por ésta molécula y la eficacia de la activación difieren considerablemente. La longitud de los dominios en los extremos amino y carboxilo terminales podrían ser la causa de estas diferencias.



Figura 1.6: El índice de consistencia del alineamiento de los cuatro PARs es de 89 (100 es el valor más alto de consistencia). Las secuencias están sombreadas con colores que indican el grado de consistencia que, a su vez, es un reflejo de la homología de las secuencias, en dónde, el morado es 0 y el rojo 9. La homología está casi ausente en los extremos amino y carboxilo de los receptores, con excepción de PAR1 y PAR3, que comparten el dominio ácido de unión al exosito I de la trombina (secuencias encerradas en los cuadros morados). Por otro lado, todos los PARs, con excepción de PAR4, comparten el dominio propuesto de unión al ligando (secuencias encerradas en los cuadros verdes).

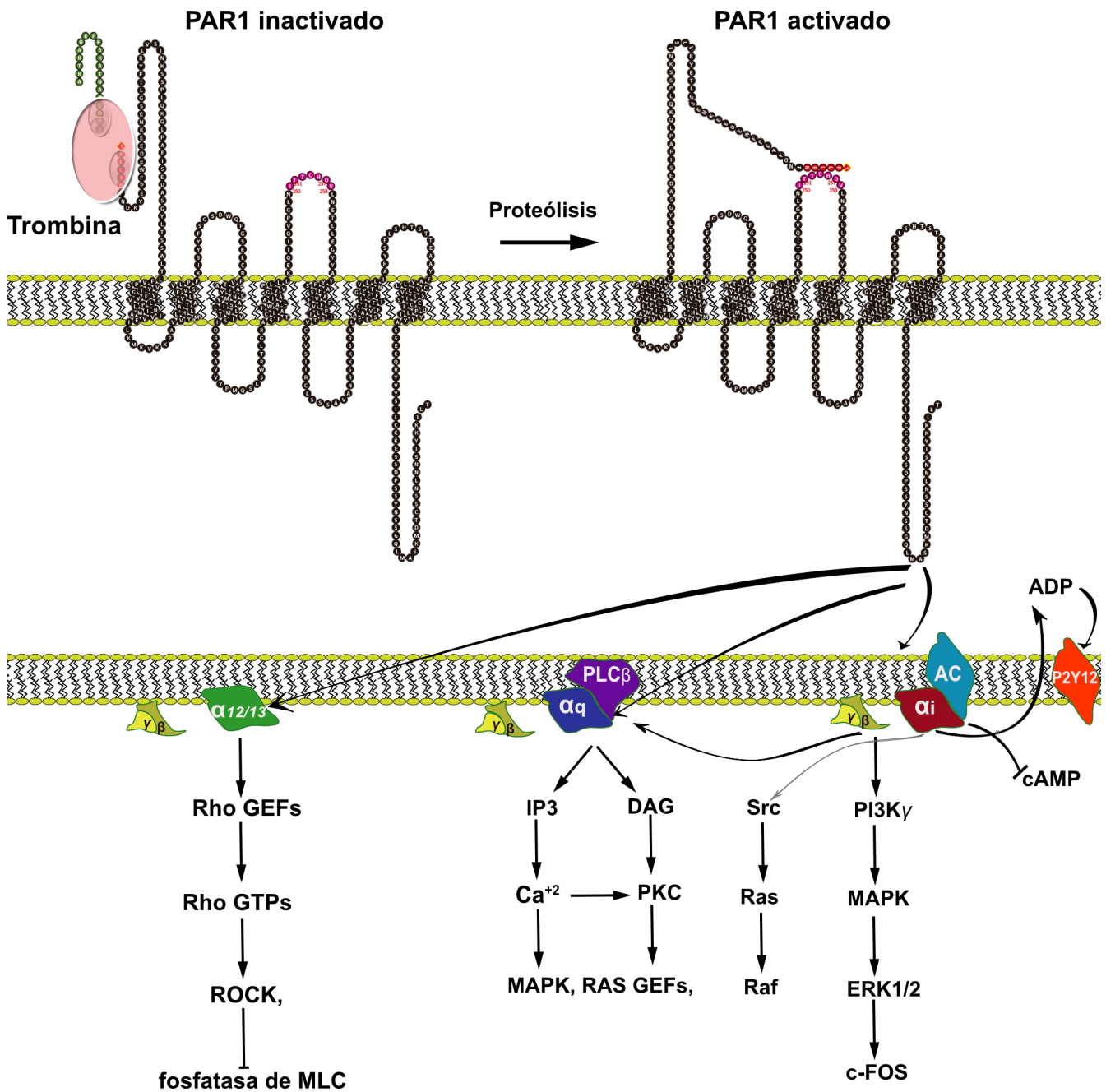


Figura 1.7: Principales vías de señalización de PAR1 evocadas por la trombina. El péptido señal de 20 aminoácidos (aa) es recortado durante la maduración del receptor, en el retículo endoplasmático (figura 1.5). La trombina corta 20 aa del extremo amino terminal de PAR1 (fragmento acotado en verde) en la Ser⁴¹. Esto expone un nuevo extremo amino terminal de seis aminoácidos que interactúan con la segunda asa exoterminal del receptor, provocando un cambio conformacional que promueve la dimerización y activación de la proteína G acoplada. **PLC β** : fosfolipasa C β ; **AC**: adenilato ciclasa; **cAMP**: adenosina monofosfato cíclico; **ADP**: adenosina difosfato; **P2Y12**: receptor purinérgico de adenosin difosfato; **DAG**: diacilglicerol; **IP3**: inositol trifosfato

Cuadro 1.1: Principales características de los receptores activados por proteasas

Características de los PARs*				
Característica	PAR1	PAR2	PAR3	PAR4
Tamaño molecular	425 aa	397 aa	374 aa	385 aa
Proteasas activadoras	Trombina, tripsina, FT/VIIa/Xa, FXa, plasminina, granzima A Gingipainas-R, MMP(1, 9, 2, 13, 14) cathepsina G, APC-EPCR	Tripsina, triptasa FVIIa, FXa, TF/VIIa FVIIa/FT/FX, TF/VIIa/Xa MT-SP1, proteinasas-3 gingipainas-R kallikreina 14	Trombina, tripsina APC	Trombina, tripsina, plasminina, cathepsina G, FXa gingipainas-R kallikreina 14 VIIa/FX, MASP-1
Sitio de corte y secuencia del ligando desenmascarada	LDPR ⁴¹ $\text{S}\llcorner\text{SFLLRN}$	SKGR ³⁶ $\text{S}\llcorner\text{SLIGKV}$	LPIK ³⁸ $\text{S}\llcorner\text{TFRGAP}$	PAPR ⁴⁷ $\text{S}\llcorner\text{GYPGQV}$
Agonistas selectivos (péptidos sintéticos)	TFLLR-NH ₂	SLIGKV-NH ₂	no se conoce [†]	GYPGQV-NH ₂ AYPGKF-NH ₂
Proteínas G efectoras	Gq, Gi, G _{12/13} , HSP90 Creatina cinasa, Zyxin	Gq, Gi, G _{12/13} β -arrestina, jab1	Gq	Gq, G _{12/13}
Desensibilización	Fosforilación, β -arrestinas, internalización y degradación	Fosforilación, β -arrestinas	?	Internalización
Distribución celular	Plaquetas, células endoteliales, fibroblastos, células T, queratinocitos, astrocitos, fibras del músculo liso, neuronas, oligodendrocitos	Células endoteliales, ovocitos, osteoblastos, neutrófilos, leucocitos, mastocitos, células T, fibras del músculo liso, melanocitos, neuronas, fibroblastos, células tubulares renales	Plaquetas, fibras del músculo liso.	Plaquetas, megacariocitos.
Distribución tisular	Cerebro, pulmón, corazón, estómago, colon, riñón, testículos	Próstata, intestino delgado, colon, hígado, páncreas y tráquea	Corazón, riñón, páncreas, timo, intestino delgado, nodos linfáticos, tráquea	Pulmón, páncreas, tiroides, testículos, intestino delgado, placenta, músculo esquelético, nodos linfáticos, glándulas adrenales, prostata, útero, colon
Funciones conocidas y patologías asociadas	Hemóstasis y activación plaquetaria, permeabilidad endotelial, migración, angiogenesis, secreción en células GI, inflamación intestinal y en el SNC, artritis, analgesia e hiperalgesia	Permeabilidad endotelial, migración, angiogenesis, secreción en células GI, artritis, inflamación intestinal y en el SNC, pigmentación en la piel, analgesia e hiperalgesia	Hemóstasis y activación plaquetaria, angiogenesis,	Hemóstasis y activación plaquetaria, permeabilidad endotelial, migración, angiogenesis, secreción en células GI [‡] , analgesia e hiperalgesia

*(Hansen *et al.*, 2008; Hollenberg, 2003; Hollenberg *et al.*, 2014; Noorbakhsh *et al.*, 2003; Ramachandran y Hollenberg, 2008; Soh *et al.*, 2010a)

[†]aunque el ligando unido al receptor es TFRGAP, el péptido sintético con esta secuencia no activa a PAR3.

[‡]células GI: células gastro intestinales.

Capítulo 2

Planteamiento del problema

En el capítulo anterior se mencionó que la reactivación de la glia en la retina, con el desarrollo de gliosis como consecuencia, puede tener dos destinos: en uno de los escenarios, esto podría ser una respuesta benéfica, en el otro, eventualmente, esta reacción podría convertirse en una patología. En el primer caso, la gliosis sería benéfica en la medida en la que sea capaz de contener la extensión del daño de la herida que provocó la reactivación. Considerando lo anterior, es válido afirmar que la herida es el estímulo que provoca la reactivación de la glia y que esta respuesta sólo ocurre en la región y en los márgenes de la herida. En este mismo caso, la gliosis es leve o moderada y, cuando el estímulo desaparece, las células regresan a su estado regular sin alterar más el tejido (Vecino *et al.*, 2016). En el segundo caso, la glia es reactivada, pero ésta permanece en aquel estado por un intervalo de tiempo indefinido y la extensión de la respuesta se manifiesta más allá de la región de la herida. En este caso, la gliosis se convierte en un elemento patológico (de primer orden). Qué es lo que permite que la reactivación de la glia se extienda más allá de la herida y se prolongue más del tiempo que le toma en ser reparada, es una cuestión que no ha sido resuelta. Esto último es de especial interés en el contexto de las enfermedades que se relacionan con algún desorden de la función regular de la glia y, en especial, en aquellos casos que muestran las características de gliosis reactiva.

Como se mencionó anteriormente, la vitreorretinopatía proliferativa (VRP) es una enfermedad que se caracteriza por la proliferación y migración anormal, principalmente, de las células del epitelio pigmentado de la retina (EPR) y las células gliales de Müller (Nagasaki *et al.*, 1998). No se sabe con precisión el papel que desempeña la glia de Müller en el desarrollo de la VRP, no obstante, se sabe que todas las enfermedades de la retina se asocian con el surgimiento de gliosis reactiva (Wiedemann *et al.*, 2013). En la mayoría de los casos la VRP ocurre por intervenciones quirúrgicas, traumatismos oculares o el desprendimiento regmatógeno de la retina. Lo anterior causa alteraciones en la continuidad de la barrera hematorretiniana y, probablemente, esto es el detonante de la reactivación glial. Además, aunque las células del EPR proliferan con mayor

frecuencia que cualquier otro tipo celular durante el desarrollo de la VRP, la gliosis reactiva y, en particular, la proliferación celular de la glia de Müller, es una respuesta que se manifiesta en todos los casos en los que ocurre esta enfermedad (Wiedemann *et al.*, 2013). De hecho, en las células de Müller, la gliosis reactiva está principalmente asociada con la proliferación (Bringmann *et al.*, 2006). En la VRP la proliferación es una respuesta de reparación tisular, estimulada en exceso y de adaptación deficiente, cuya duración es indefinida (Bringmann *et al.*, 2006; Wiedemann *et al.*, 2013). Por todo lo expuesto anteriormente, la proliferación celular en la VRP es el elemento patológico más importante y la comprensión de los factores que la causan demanda la mayor atención.

¿Qué permite que la glia permanezca reactiva y se convierta en un elemento patológico de la VRP? Al parecer, la glia de Müller permanece en éste estado mientras la barrera hematorretiniana (BHR) permanece rota, lo que a su vez, causa que las sustancias presentes en el suero sanguíneo entren en contacto con las células de la retina. En este tenor, se sabe que la actividad de la trombina, presente en el suero sanguíneo en condiciones normales, aumenta significativamente en el humor vítreo de los pacientes que sufren de VRP (Bastiaans *et al.*, 2014). La trombina, que estimula a un gran número de respuestas celulares mediante la activación de los receptores activados por proteasas (PARs) (Coughlin, 2000), además de ser indispensable en el proceso de coagulación, también es capaz de estimular respuestas fisiológicas generales como la migración y la proliferación. En el contexto del sistema nervioso, se ha demostrado que PAR1 promueve la proliferación de astrocitos (Noorbakhsh *et al.*, 2003). Si como los astrocitos, las células gliales de Müller también son capaces de proliferar en presencia de la trombina es algo que aún no se ha explorado.

En resumen, el interés de este trabajo es explorar la posibilidad de que la trombina, que una vez rota la BHR entra en contacto con las células de la retina, sea capaz de reactivar a la glia de Müller y estimular la proliferación de estas células mediante la activación del receptor de la trombina canónico, PAR1.

2.1 Hipótesis

La trombina promueve la proliferación y la migración de la glía de Müller humana a través de la activación de los receptores activados por proteasas (PARs)

2.1.1 Objetivo general

Determinar si la trombina, a través de la activación de los PARs, causa la migración o la proliferación en las células gliales de Müller.

2.1.2 Objetivos específicos

- Analizar, mediante ensayos de RT-PCR y *Western Blot*, la expresión de los PARs en las células MIO-M1.
- Analizar el efecto de la trombina en la proliferación de las células MIO-M1 mediante ensayos con 3-(4, 5-dimetil-tiazol-2yl)-5-(3-carboximetoxifenil-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS)
- Analizar la especificidad del señalamiento de la trombina, mediante ensayos con los inhibidores farmacológicos Hirudina y PPACK.
- Analizar el efecto de la trombina en la migración de las células MIO-M1, mediante ensayos de migración en cámaras de Boyden.
- Analizar el efecto de la trombina en la migración y la proliferación de las células MIO-M1 en ensayos de cierre de herida (*Wound Healing*).

Capítulo 3

Procedimiento experimental

3.1 Cultivo celular

Las células MIO-M1 fueron generosamente donadas por Astrid Limb, del Instituto de Oftalmología y el Hospital del Ojo en Moorfields, Londres. Para estimular su crecimiento, las células fueron cultivadas en medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado con 10% de Suero fetal bovino (FBS), durante una semana, hasta confluencia total.

La viabilidad celular fue estimada mediante la tinción, con azul de tripano, de muestras de cultivos creciendo en medio en presencia o ausencia de FBS, durante intervalos desde 24 h, hasta 8 días. Las células de cada uno de estos cultivos fueron incubadas en presencia de Tripsina + EDTA (1 %), durante 5 min, para disociarlas y, posteriormente, suspenderlas en medio DMEM sin FBS con azul de tripano (0.08%). Las células teñidas con azul de tripano y las células vivas fueron contadas en una cámara de *Neubauer*, en un microscopio óptico. La viabilidad fue expresada como la proporción de las células vivas sobre el total de las células contadas.

En todos los experimentos, los cultivos de células MIO-M1 fueron privados de suero, sustituyendo el medio DMEM FBS (10%) por DMEM sin FBS, 24 h antes de estimular las células con trombina.

3.2 RT-PCR

La transcripción de los genes de los cuatro miembros de la familia de los PARs fue analizada mediante retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). El RNA de los cultivos se extrajo utilizando Trizol (*Invitrogen*), siguiendo las indicaciones del fabricante. La retrotranscripción de los mRNAs se hizo utilizando, 1 μg de RNA para las muestras de las que se midieron PAR 1-3, 3 μg para las muestras de las que se midió PAR 4, y para los cuatro receptores, 20 U de retrotranscriptasa derivada del virus de leucemia Moloney (murina), 1 μg de inhibidor de

RNAsas (*RNaseOUT*, *Invitrogen*), y $0.25 \mu\text{g}$ de *primers Oligo dT*, utilizados estos reactivos como lo indica el fabricante. $5 \mu\text{L}$ del DNA complementario (cDNA) obtenido de la retrotranscripción, fue utilizado como sustrato para la amplificación durante la PCR. La reacción de amplificación se llevó a cabo con 2.5 U de la enzima Taq polimerasa recombinante (*Altaenzymes, Alberta Canadá*), en el buffer que recomienda el fabricante y $0.4 \mu\text{g}$ de oligonucleótidos y deoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs). Los *primers* para el mRNA de cada uno de los PARs, las concentraciones del cofactor para cada reacción ($MgCl_2$) y, las temperaturas de templado, se describen en la tabla 3.1. Las muestras para medir el mRNA de los PARs fueron amplificadas durante 28 ciclos; aquellas para medir el mRNA de β -actina, fueron amplificadas durante 21 ciclos. La transcripción de β -actina se utilizó como control de carga, para normalizar la transcripción de los receptores, calculando la proporción que guarda la amplificación de ambos en cada muestra.

Cuadro 3.1: Cebadores (*Primers*) y variables de las PCRs

<i>Primer</i>	Secuencia	$MgCl_2$	Temperatura de templado ($^{\circ}\text{C}$)
PAR 1 F	5' – CCCACAAACGTCCTCCTGAT – 3'	1.5 mM	59
PAR 1 R	5' – ATCAACTGCCCACTGCTGTT – 3'	1.5 mM	59
PAR 2 F	5' – CTGTCATGATGTTTTGCCTG – 3'	1.5 mM	59
PAR 2 R	5' – ACTAGGAGTGAAGCAGATCA – 3'	1.5 mM	59
PAR 3 F	5' – CCTGCCATCTACCTCCTGGT – 3'	1.5 mM	59
PAR 3 R	5' – CAGGTGGTGATGTCTGGCTG – 3'	1.5 mM	59
PAR 4 F	5' – CAGGCCAAGTCTGTGCCCAAT – 3'	0.75 mM	51.5
PAR 4 R	5' – GTCGCGAGGTTTCATCAGCAG – 3'	0.75 mM	51.5
β -actina F	5' – GCTCGTCGTCGACAAACGGGCT – 3'	1.5 mM	59
β -actina R	5' – CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC – 3'	1.5 mM	59

3.3 Análisis de proliferación celular en MIO-M1

Células de cultivos celulares de MIO-M1 fueron estimuladas con 0 a 4 U/mL de trombina, en medio DMEM sin FBS, durante 24 h y hasta 7 días. Se midió la proliferación en cultivos no confluentes mediante el ensayo colorimétrico basado en el método de reducción de MTS, siguiendo las indicaciones del fabricante (*Cell Titer 96 Aqueous One Solution Reagent; Promega, Madison, WI, USA*). Cultivos en medio DMEM sin FBS, ni trombina, fueron utilizados como Control (Ctl) basal de proliferación. Este valor se tomó como 100%, de manera arbitraria, en la gráficas mostradas más adelante.

3.4 Estimulación y especificidad del efecto de la trombina

Las células MIO-M1 fueron sembradas en placas de 6 multipozos (*Costar, Corning, Inc., Washington, DC, USA*), en medio DMEM + FBS (10%) y, una vez que llegaron al 50 % de confluencia, el medio se sustituyó por DMEM sin suero, durante 24 horas. Pasado este periodo de privación, los cultivos fueron estimulados con $2 U/mL$ de trombina, o con medio sin FBS, durante diferentes intervalos de tiempo que van de 24 h a 5 días. En las condiciones en las que fueron utilizados los inhibidores de la trombina, estos se agregaron al medio 30 min antes de la estimulación con trombina. Se utilizaron los inhibidores farmacológicos PPACK (500 nM) e hirudina ($4 U/mL$); estos fueron anteriormente probados y demostraron no ser tóxicos usados a estas concentraciones (Lee-Rivera *et al.*, 2015).

3.5 Incisión y cierre de heridas (*Wound Healing*)

Se cultivaron células MIO-M1 en placas de 6 multipozos (*Corstar, Corning, Inc.*), en medio DMEM suplementado con FBS al 10%. Cuando las células crecieron hasta confluencia, se les retiró el medio con FBS y se les sustituyó por medio DMEM sin suero, durante 24h. Pasado este tiempo, con la punta de una micropipeta de $200 \mu L$, se hizo una herida en la monocapa celular, a la mitad de cada uno de los pozos, de 1.2 mm de ancho. Las monocapas de células en estos pozos fueron lavadas con medio DMEM sin FBS y, después, incubadas en medio DMEM en presencia de $2 U/mL$ de trombina, medio DMEM con suero como control positivo, o medio DMEM sin FBS como control negativo. Las células fueron incubadas en estos medios a $37^{\circ}C$, en intervalos de tiempo, desde 24 h hasta 5 días. Pasado el tiempo indicado las monocapas fueron observadas en un microscopio óptico de contraste de fases, en aumento de 100 X. En estas mismas condiciones, cultivos de MIO-M1 fueron incubados con el antígeno marcador de proliferación celular MKI-67 (Ki-67). Estas células se fijaron en acetona durante 30 min, fueron bloqueadas con FBS al 10 % en *Buffer* de fosfatos salino (PBS), el exceso de la solución de bloqueo se lavó con *buffer* salino de Trizma con *Tween* (TTBS) y, después, se incubó el anticuerpo primario anti- Ki-67 (Abcam, 16667; Cambridge, UK) diluido 1:200 en PBS con Triton X-100 al 0.3 %, durante toda la noche. Se incubó el anticuerpo secundario, anti-conejo, acoplado a Isotiocianato de flouoresceína (FITC) (*Jackson Labs, 111-095-003; Sacramento, CA, USA*), durante 1 h. Para las condiciones de inhibición farmacológica, se incubaron los inhibidores, Hirudina ($4 U/mL$) o PPACK (500 nM), durante 30 min a $37^{\circ}C$, antes de estimular con $2 U/mL$ de trombina, durante los intervalos de tiempo descritos. En aquellos casos que se indica, cultivos de MIO-M1 fueron tratados con $2 U/mL$ de Citosina β -D-Arabinofuranosida (Ara-C) o medio condicionado recuperado a partir de cultivos de la línea celular del EPR humano, ARPE-19, estimulados con $2 U/mL$ de trombina, durante 24

h (MC), 30 min antes de ser estimulados con trombina, y durante diferentes intervalos de tiempo, desde 24 h hasta 5 días. La línea celular ARPE-19 (*American Type Culture Collection, CRL-2302; Bethesda, MD, USA*) fue cultivada en medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F12* (DMEM-F12), en presencia de 4 % de FBS, como fue descrito en (Dunn *et al.*, 1996). El medio condicionado por la trombina (MC) fue recuperado a partir del medio de cultivos de línea celular derivada del epitelio pigmentado de la retina humana (ARPE-19), creciendo en DMEM sin FBS en presencia de 2 U/mL de trombina, durante 24 h; estos cultivos fueron privados de suero, 24 h antes de la estimulación con trombina, en medio DMEM.

3.6 Ensayos de migración en cámara de Boyden

La superficie inferior del encaje de los pozos de la cámara de Boyden (*Falcon Multiwell Cell Culture Plates; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA*) fue cubierta con colágena I (50 $\mu g/mL$) o colágena IV (10 $\mu g/mL$), durante 1 h, a temperatura ambiente. Aquellos encajes sin sustrato fueron utilizados como controles del ensayo de migración. La quimiotaxis celular fue estimulada al agregar, en medio DMEM, 2 U/mL de trombina, 10 % de FBS o medio sin FBS, en la cámara inferior del pozo de migración. Después de 48 h de incubación, las células que no migraron y yacían en la superficie superior de la cámara, fueron removidas con un hisopo de algodón estéril; las células que migraron a la superficie de la cámara inferior, fueron teñidas con cristal violeta (0.05 %) y contadas manualmente. Los datos de las células que migraron fueron graficados con base en la proporción que guardan con respecto al control basal (pozos con medio DMEM, sin trombina, ni FBS), tomado como el 100 %.

3.7 Anticuerpos

Los siguientes anticuerpos fueron utilizados: anti-PAR-1 (*Novus Biologicals, Littleton, CO, USA*), anti-PAR-2 (*Santa Cruz Biolabs, Santa Cruz, CA, USA*), anti-PAR-3 (*Santa Cruz Biolabs*), anti-PAR-4 (*Novus Biologicals*), anti- β -actina (*EMD Millipore, Billerica, MA, USA*). El uso de estos anticuerpos se detalla en la tabla 3.2.

3.8 Western Blot

Después de ser estimuladas las células MIO-M1 creciendo en cajas de 6 multipozos, como ya se ha descrito, los extractos proteicos fueron recuperados en *buffer* de lisis desnaturizante (*RIPA*), en hielo, con ayuda de un gendarme de plástico (*scraper*). La concentración de proteína en los lisados celulares fue cuantificada mediante el método de *Bradford*; se cargaron 20 μg de

muestra en cada carril para medir la expresión de los receptores. Las muestras se resolvieron por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (10 % SDS-PAGE) y, posteriormente, electrotransferidas a membranas de polivinildieno difluorado (PVDF) (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Las membranas fueron bloqueadas en 5 % de leche sin grasa y 3 % de FBS disueltos en *buffer-tris* salino (TBS) durante 1 h, después, los anticuerpos primarios para cada receptor fueron incubados en diferentes geles, toda la noche, a 4 °C, en las condiciones que se indican en la tabla 3.2. Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con HRP (*Horseradish peroxidase*) (Invitrogen), incubados durante 1 h, a temperatura ambiente. Las membranas fueron lavadas durante 5 min, 5 veces, con TTBS, después de haberse incubado cualquier anticuerpo. Incubados los dos anticuerpos, se incubó la solución con el sustrato de *Horseradish peroxidase* (peroxidasa de rábano picante) (HRP) (*Immobilon Western AP Chemiluminescent Substrate*; EMD Millipore, Billerica, MA, USA), durante 5 min, para revelar la señal de las membranas en películas Kodak. Las películas fueron digitalizadas en un fotodocumentador (*Alpha Digi-Doc system*; Alpha-Innotech, San Leandro, CA, USA). Para el análisis de la densitometría de las bandas se utilizó el programa de procesamiento de imágenes Image-J (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Se utilizó β -actina como control de carga, y la expresión de los PARs fue normalizada con respecto a este valor, en cada uno de los casos.

3.9 Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado, a partir de cultivos celulares independientes. En los experimentos en los que sólo se compararon dos grupos de datos, los resultados fueron analizados mediante pruebas *t de Student*. En aquellos casos en los que se compararon más de dos grupos de datos se utilizó la prueba ANOVA de una vía con comparaciones múltiples y ajuste de Bonferroni.

Cuadro 3.2: Anticuerpos para *Western Blot*

Anticuerpos para <i>Western Blot</i>				
Anticuerpos primarios	Hospedero	Fabricante	Dilución del anticuerpo primario	Dilución del anticuerpo secundario
anti-PAR-1	Conejo	Novus Biologicals	1:175	1:800
anti-PAR-2	Cabra	Santa Cruz Biolabs	1:1,000	1:3,000
anti-PAR-3	Conejo	Santa Cruz Biolabs	1:7,500	1:15,000
anti-PAR-4	Conejo	Novus Biologicals	1:3,000	1:3,000
anti- β -actina	Ratón	EMD Millipore	1:25,000	1:50,000

Capítulo 4

Resultados

4.1 La línea celular MIO-M1 expresa todos los Receptores Activados por Proteasas (PARs)

Para saber si los efectos de la incubación de las células MIO-M1 con trombina están regulados por la activación de alguno de los PARs, se analizó la transcripción del mensajero mediante RT-PCR y, la expresión mediante *Western Blot*, de los cuatro receptores de la familia. Los resultados de estos experimentos demuestran que la línea celular MIO-M1 expresa todos los receptores de la familia de los PARs (figuras 4.1 y 4.2).

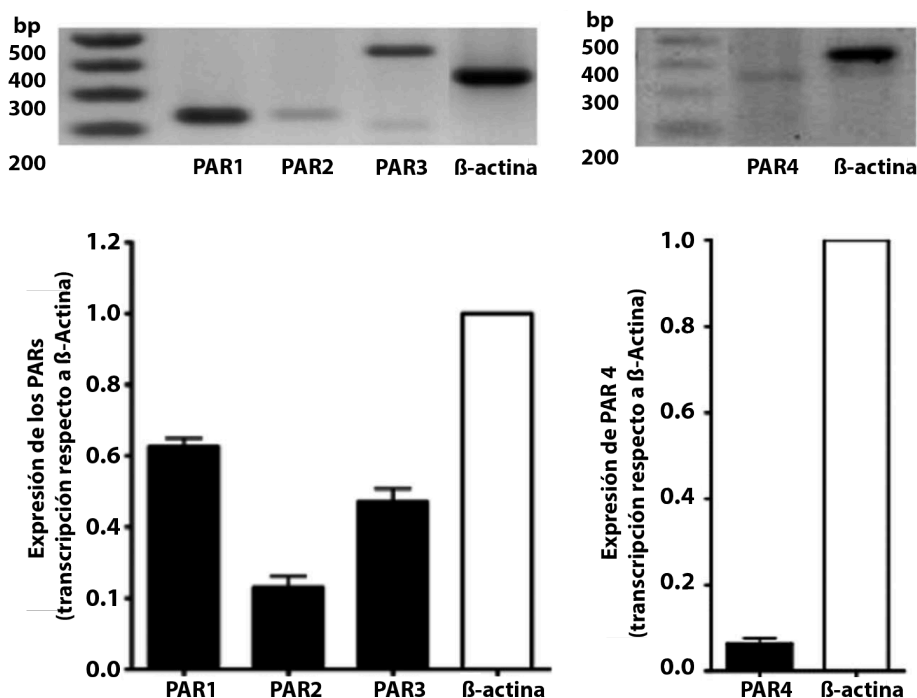


Figura 4.1: Transcripción del mRNA de los cuatro miembros de la familia de los PARs

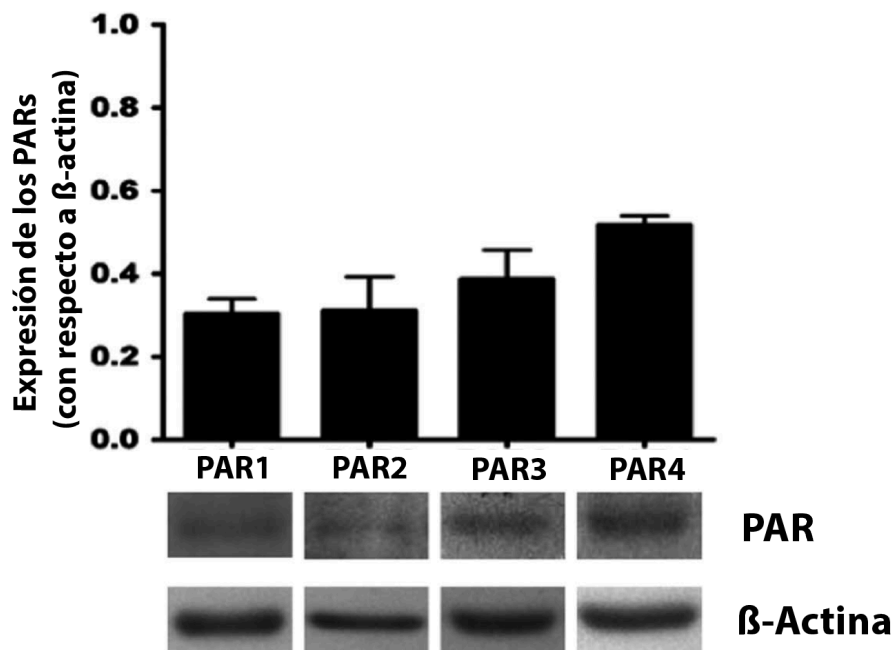


Figura 4.2: Porcentaje de expresión de los PARs en células MIO-M1, normalizados con β -actina

4.2 La trombina promueve la proliferación en las células MIO-M1

Ya se ha mencionado que la proliferación de las células gliales de Müller está asociada a la formación de cicatrices gliales (gliosis). También se ha señalado que la VRP implica tanto migración como proliferación celular. Por su parte, como fueron descritas en la introducción, hay dos vías de señalización que el receptor canónico, PAR-1, puede desencadenar, una vez que ha sido activado, dependiendo del tipo de proteína G al que está acoplado: una vía relacionada con la proliferación y otra con la migración. En este tenor, una vez que se demostró que las células MIO-M1 expresan los cuatro receptores de la familia de los PARs, se incubaron en presencia de trombina para observar si esta puede causar proliferación o migración.

Cultivos de MIO-M1 fueron privados de suero durante 24 horas y, pasado este tiempo, fueron estimulados con $0.1 U/\mu L$, $0.3 U/\mu L$, $0.5 U/\mu L$, $1 U/\mu L$ y $2 U/\mu L$ de trombina (que corresponde a $0.88 nM$, $2.64 nM$, $4.4 nM$, $8.8 nM$ y $17.6 nM$) en medio DMEM, sin suero; se utilizó medio D5030, sin suero ni trombina, como control basal. En estas condiciones de estímulo, se analizó la proliferación a las 24 h, 48 h, 72 h y 5 días, mediante ensayos de MTS. Estos resultados demuestran que la trombina provoca la proliferación celular y, además, este efecto no es dependiente de la dosis que se probó, aunque sí es del tiempo de incubación (Figura 4.3). No obstante, en la figura 4.3, la dosis de $0.88 nM$ no sigue el patrón apenas descrito, pero esto puede deberse a que esta dosis

corresponde a la EC_{50} .

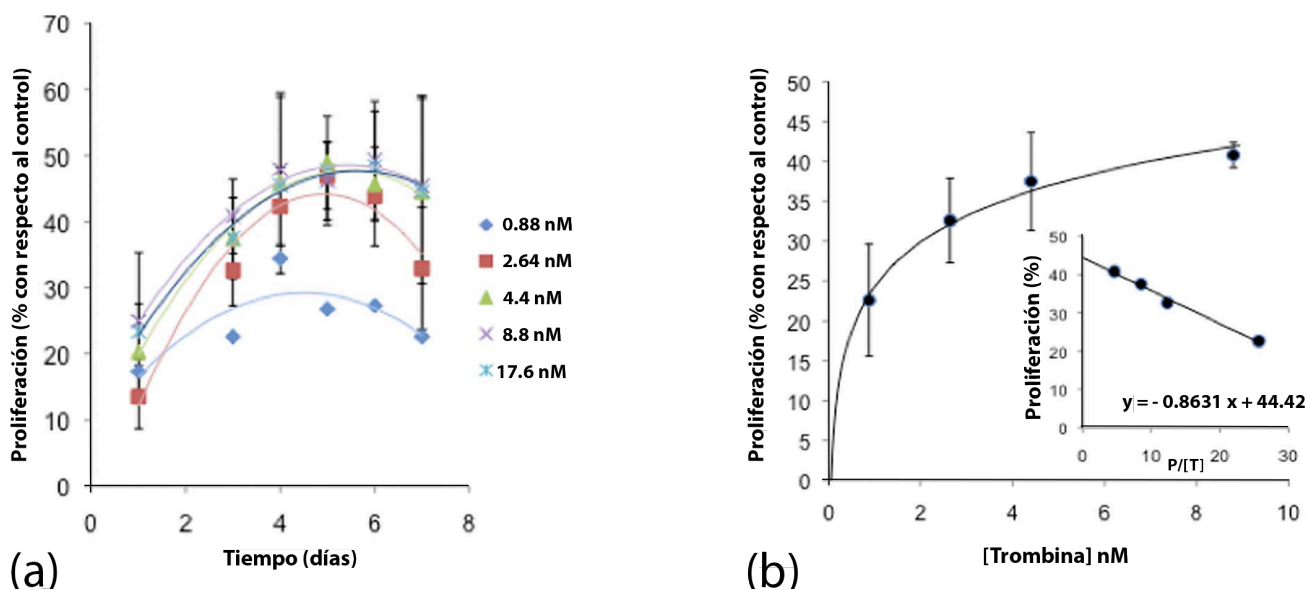


Figura 4.3: (a) Porcentaje de la proliferación de las células MIO-M1 a diferentes concentraciones de trombina. La concentración de trombina parece no tener efecto en la magnitud de la proliferación, como sí sucede con el tiempo de incubación. (b) El nivel máximo de proliferación es de 44% respecto del control, con un valor de EC_{50} de 0.8631 nM. El inserto en (b), es una gráfica de Eadie-Hofstee que se utilizó para calcular el valor de EC_{50} (la pendiente de la recta). EC_{50} : el 50 % de la concentración de agonista o fármaco necesaria para obtener el efecto máximo; P/[T]: Proliferación sobre la concentración de trombina.

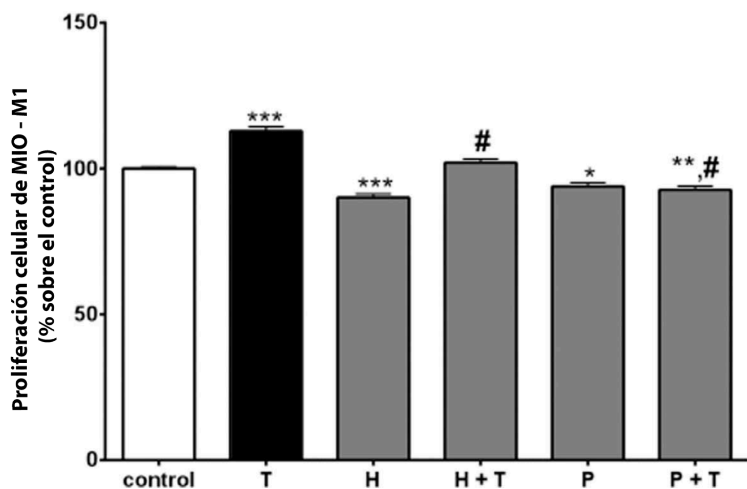


Figura 4.4: El efecto de la trombina en la proliferación es específico, como lo sugiere la inhibición farmacológica con hirudina y PPACK. H: hirudina (500nM); P: PPACK (4 U/mL); control: medio sin suero; T: trombina (2 U/mL). Significancia con respecto al control en pruebas *t de Student*: * (P<0.05); ** (P<0.01); *** (P<0.001). Significancia con respecto al estímulo con trombina en pruebas *t de Student*: # (P<0.001).

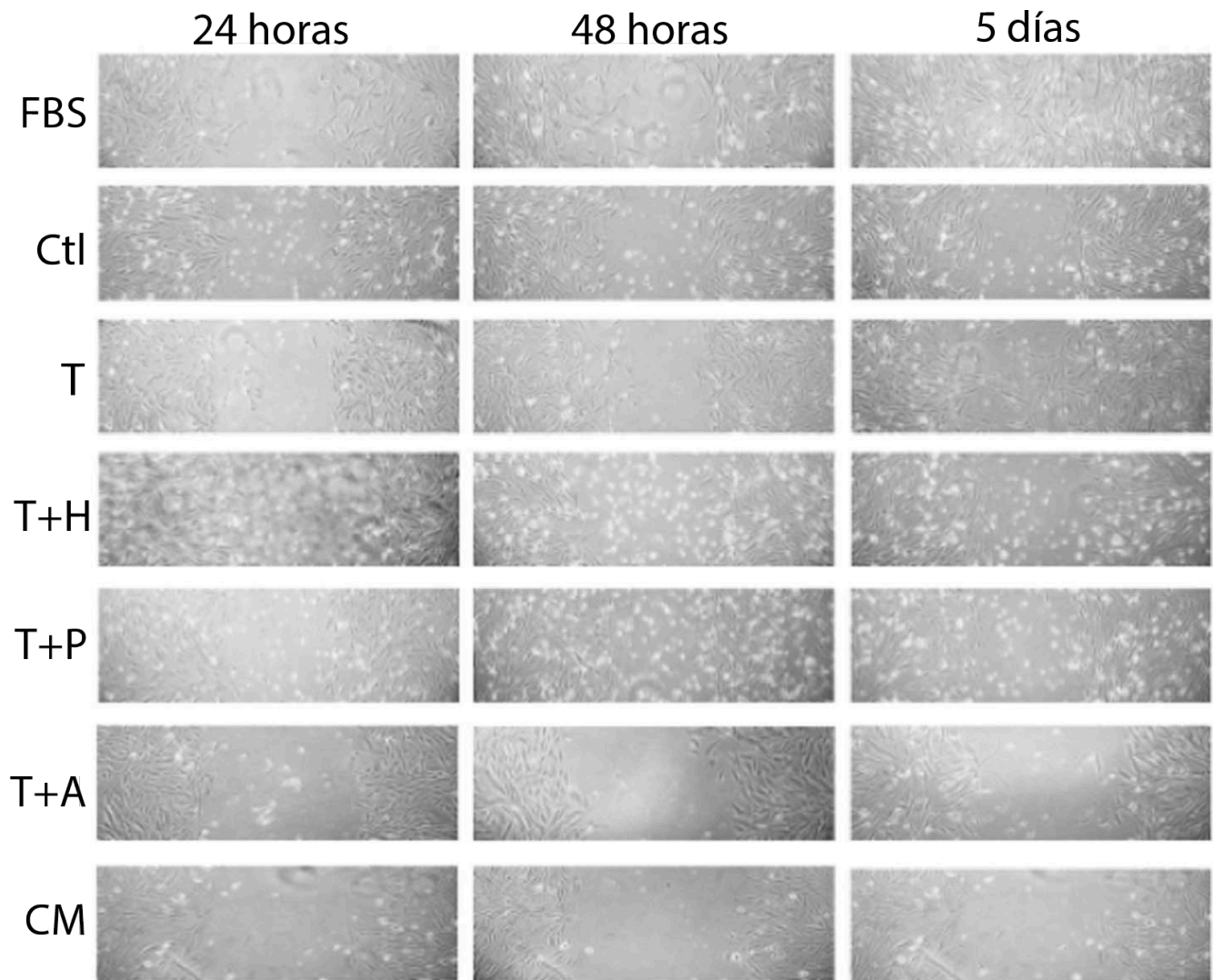


Figura 4.5: El cierre de las heridas depende únicamente de la capacidad de las MIO-M1 para proliferar, pero no para migrar. Con suero (FBS) y Trombina (T2), a los 5 días de estímulo, las heridas están casi completamente cerradas. En el control negativo (Ctl), con los inhibidores de la trombina - hirudina (H) y PPACK (P)-, el inhibidor de la proliferación, Ara-C (A), y con el medio condicionado por el EPR (CM), no se observa el cierre de las heridas después de 5 días. Lo anterior sugiere que la trombina ocasiona el cierre de las heridas y lo hace al promover la proliferación celular, pero no la migración.

4.2.1 La trombina no promueve la migración de las células MIO-M1

En ensayos de *Wound healing*, cultivos de MIO-M1 en presencia de FBS o trombina provocaron el cierre de las heridas a los 5 días del estímulo. De manera muy similar a lo ocurrido en el control negativo (cultivos con medio sin suero), el cierre de las heridas no ocurrió cuando, además de la

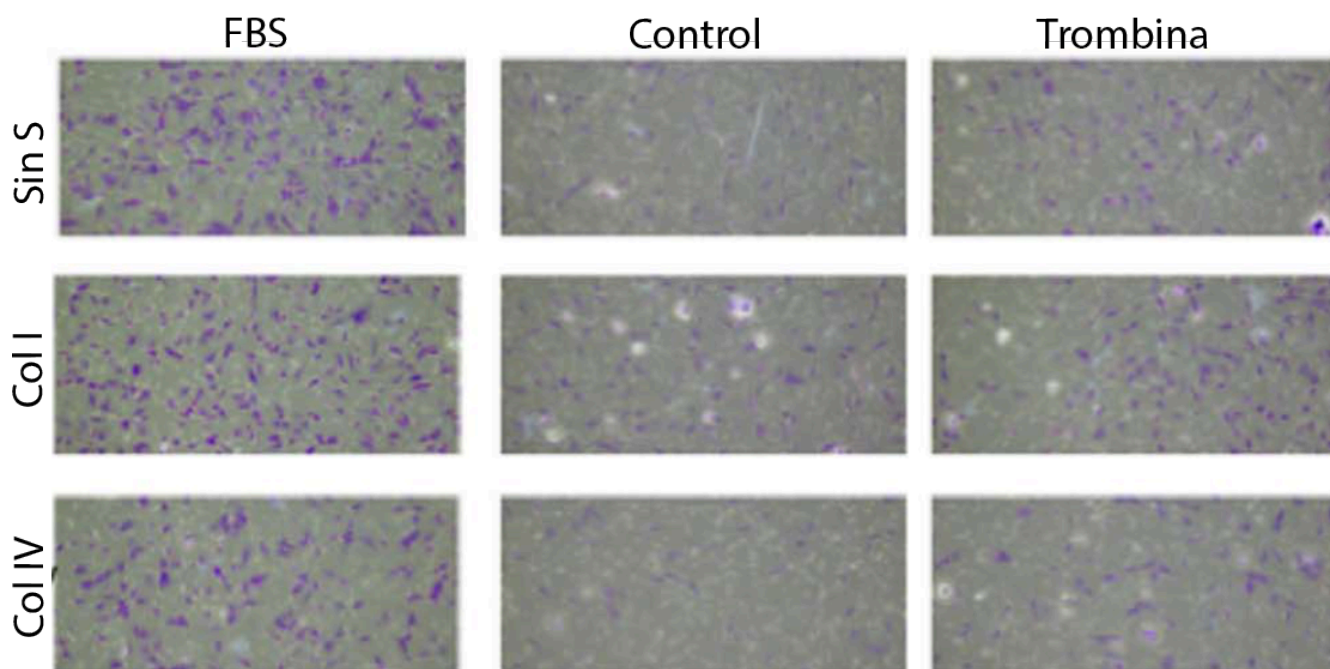


Figura 4.6: Las imágenes muestran campos representativos, obtenidos de la superficie inferior cámaras de Boyden, en la que se observan las células que migraron. (Sin S: cámara sin sustrato; Col I: cámara con colágena I; cámara con colágena IV)

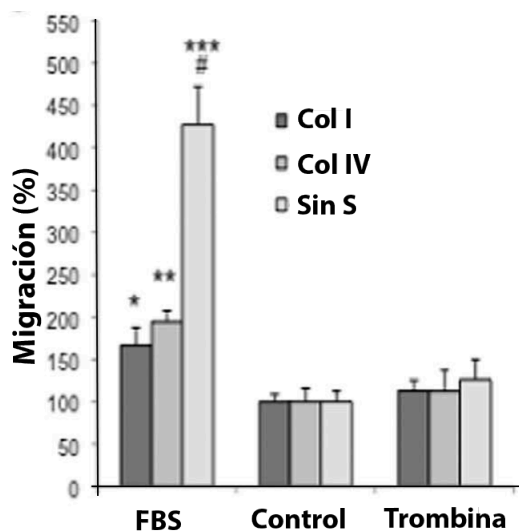


Figura 4.7: Mientras que el porcentaje de las células que migraron es relativamente alto en las células estimuladas con medio en presencia de FBS, en las condiciones de control de migración (medio sin FBS y las células estimuladas con trombina, los porcentajes de migración fueron muy similares entre estos, e inferiores a los pozos tratados con FBS (Sin S: cámara sin sustrato; Col I: cámara con colágena I; cámara con colágena IV).

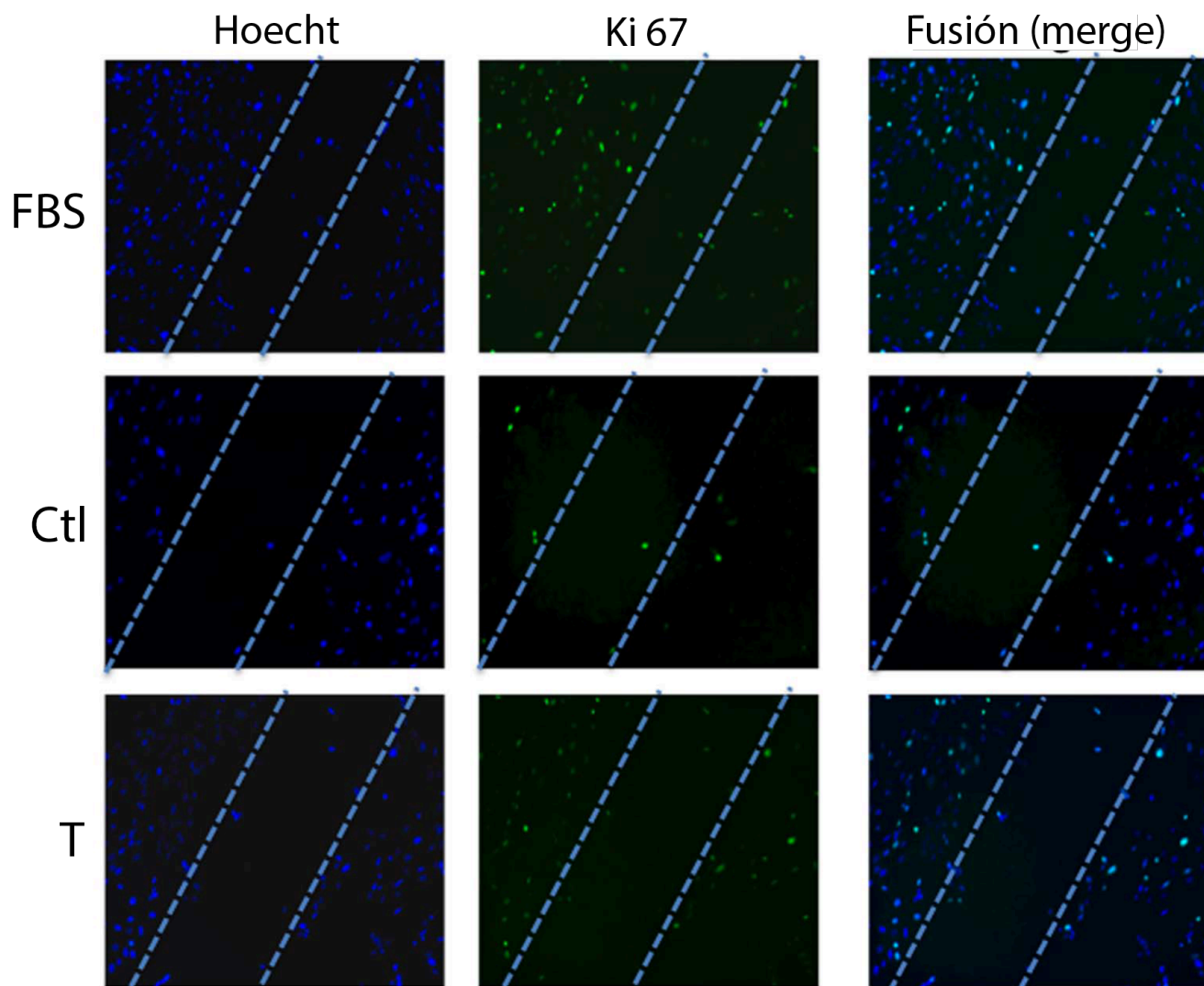


Figura 4.8: El marcador de la proliferación Ki 67 tiene el fluoróforo FITC acoplado (verde). Las células que proliferan en los ensayos de *Wound Healing* no están circunscritas a los límites de las heridas, la proliferación se observa como un fenómeno generalizado, promovido por el FBS o la trombina (fluorescencia verde).

trombina, se agregaron los inhibidores de la trombina, hirudina y PPACK, o el inhibidor de la proliferación Ara-C. Tampoco ocurrió el cierre de las heridas en cultivos a los que se les agregó el medio condicionado por el EPR (MC) (figura 4.5).

Independientemente del sustrato empleado, las MIO-M1 solo migran en presencia de FBS. La superficie inferior de las cámaras con presencia de trombina no difieren mucho de aquellas con medio DMEM sin suero, lo que sugiere que la trombina no es un agente que promueva la migración en estas células (figura 4.6 y 4.7).

El efecto de la proliferación es un fenómeno generalizado y no una reacción yuxtácrina o parácrina que dependa del sitio de la herida (cómo sí sucede en el EPR), como se observa en la figura 4.8.

Capítulo 5

Discusión

La ruptura de la barrera hematorretiniana es la principal causa de varias enfermedades proliferativas en la retina, como es el caso de la VRP (Guidry, 2010; Stern y Temple, 2015). Cuando la BHR se rompe, las células de la retina quedan expuestas a una enorme cantidad de sustancias presentes en el suero sanguíneo que estimulan a las células de la retina a migrar, proliferar y remodelar la matriz extracelular (Wiedemann *et al.*, 2013). Se han identificado a factores de crecimiento como el PDGF, el TGF- β , la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Reconocer a todos los factores que están implicados en el desarrollo de la VRP, y la manera en la que modifican la actividad celular en la retina, es necesario tomando en cuenta que la etiología de esta enfermedad es compleja y multifactorial. Por lo tanto, cualquier tratamiento que ignore alguno de los factores implicados en la progresión de la VRP sería insuficiente. En este mismo sentido, la prognosis adecuada de la VRP reduciría el fracaso latente de un porcentaje importante de las cirugías de corrección anatómica de desprendimiento de la retina. Además, el conocimiento de las causas moleculares que permiten el desarrollo de la VRP es aún más pertinente, considerando los fracasos en los tratamientos altamente invasivos para tratar a la VRP - p. e. la banda esclerótica, la vitrectomía, la remoción quirúrgica de las cicatrices, la inyección de aceite de silicona en la cámara vítrea o la exfoliación de los cúmulos celulares - (Guidry, 2010).

De manera significativa, la actividad de la trombina aumenta en pacientes que padecen VRP (Bastiaans *et al.*, 2014). Esta proteasa es capaz de actuar como un factor de crecimiento, promoviendo la proliferación, la migración y el reordenamiento del citoesqueleto en diferentes células (Coughlin, 2000). Estudios previos han demostrado que la trombina es capaz de promover la proliferación (Parrales *et al.*, 2010), la migración (Palma-Nicolás *et al.*, 2010) y la transición epitelio-meséquima (Ruiz-Loredo *et al.*, 2011) en las células del EPR, lo que sugiere que, además de ser uno

de los tantos factores involucrados en el desarrollo de la VRP, la trombina es clave, dado que en las células del EPR promueve los principales procesos patológicos que intervienen en el desarrollo de esta enfermedad. La contribución de la trombina en la reactivación de la glia de Müller, más allá de la caracterización histológica, ha sido apenas estudiada (Puro *et al.*, 1990). En particular, no hay ningún estudio que desde la perspectiva de los procesos de transducción de señal, trate de comprender el efecto de la trombina en el desarrollo patológico de la glia de Müller. En este trabajo se demuestra que la línea celular de la glia de Müller, MIO-M1, es capaz de expresar a todos los miembros de la familia de los PARs (Figura 4.1).

Ya se ha mencionado que el efecto de la trombina en las células del EPR provoca tanto la migración, la proliferación y la transición epitelio-mesénquima (Palma-Nicolas *et al.*, 2008; Parrales *et al.*, 2010; Ruiz-Loredo *et al.*, 2011). Aunque se sabe que la principal consecuencia de la reactivación de la glia de Müller es la proliferación (Bringmann *et al.*, 2006), en general, la gliosis reactiva se caracteriza por los cambios morfológicos, la migración, la proliferación y la expresión de marcadores, además del tipo celular específico y el estímulo que provoca esta reacción en la glia (Robel *et al.*, 2011). Los ensayos de MTS demostraron que las células MIO-M1 son muy sensibles a la presencia de trombina en el medio y la tasa de proliferación aumenta desde las 24 h hasta los 7 días después de haber administrado la trombina (Figura 4.3). Del mismo modo, al administrar trombina y los inhibidores farmacológicos, PPACK e hirudina, el efecto en la migración disminuye, sugiriendo que se trata de un efecto específico de la trombina (Figura 4.4).

Es de notar que las células MIO-M1 tienen demasiada sensibilidad para responder a concentraciones bajas de trombina administrada y, sin embargo, la administración de dosis más altas no provoca una mayor respuesta en la migración. La sensibilidad de estas células a la trombina podría entenderse por la capacidad que tienen para expresar los cuatro miembros de los PARs. Como se menciona en la introducción, los cuatro receptores de esta familia están sujetos a señalamiento selectivo. No obstante, aunque no se conocen los mecanismos de señalización específicos de cada receptor en estas células, sí se sabe que, potencialmente, PAR1, PAR3 y PAR4, pueden ser activados por la trombina y señalar intracelularmente a través de la proteína heterotrimérica G_q y la liberación de Ca^{2+} intracelular. Esta vía ha sido vinculada con la migración celular (Coughlin, 2000), por lo que no es aventurado suponer que ésta es la vía involucrada en la migración de las células gliales de Müller, estimulada por la trombina y, en un caso hipotético, los tres receptores activados por la trombina señalarían al unísono.

La activación de los PARs puede provocar la migración celular, el rearrreglo del citoesqueleto y la modificación de la morfología celular, a través de la activación de la proteína $G_{12/13}$ (Coughlin, 2000; Ruiz-Loredo *et al.*, 2011). Una característica distintiva de la reactivación glial en las células de Müller es la hipertrofia celular y la proliferación, mientras que en otras células gliales es también la migración. Los experimentos de cierre de heridas (figuras 4.5) y los hechos en cámaras de Boyden

(figura 4.6), demuestran que la trombina no promueve la migración celular de las células MIO-M1. Las heridas sólo cierran en las condiciones del control positivo (FBS) y en presencia de dos unidades de trombina (T2). Por otro lado, en el control negativo (Ctl, medio DMEM), o cuando el efecto de la trombina es inhibida con hirudina o PPACK (T+H y T+P, respectivamente), las heridas no logran cerrar, incluso cinco días después de haberlas formado. Ara-C interactúa con la topoisomerasa I promoviendo la fragmentación del DNA y, por tal motivo, es un importante inhibidor del ciclo celular. Las heridas tratadas con trombina y Ara-C (T+A), permanecieron abiertas hasta el día cinco, después de haberlas formado. Aunque el inhibidor Ara-C promueve la fragmentación del DNA, no interviene en la síntesis del RNA. Además, las vías de señalización que promueven la migración, mediante los PARs, no están afectadas por la actividad nuclear, de manera directa (Coughlin, 2000; Ruiz-Loredo *et al.*, 2011; Soh *et al.*, 2010a), por lo que Ara-C sólo podría estar afectando a la proliferación celular. Esto claramente sugiere que la trombina promueve el cierre de las heridas tisulares a través de la proliferación celular y no de la migración.

Por otra parte, el medio condicionado por las células del EPR (MC) se obtuvo a partir de la estimulación de un cultivo de la línea celular del EPR, ARPE-19, con $2 U/\mu L$ de trombina. Se sabe que la trombina provoca la liberación de citocinas y factores de crecimiento en las células del EPR, que provocan la migración autócrina de éstas (Palma-Nicolás *et al.*, 2010). Para saber si las citocinas y los factores de crecimiento que las células del EPR secretan promueven la migración o la proliferación de las células de Müller, como un efecto de secreción parácrina, se utilizó el medio condicionado por las células del EPR (MC) en los experimentos de *Wound Healing*. El MC no fue capaz de provocar el cierre de las heridas ni con cinco días de estímulo continuo (figura 4.5 (MC)). Lo anterior, descarta la posibilidad de que la proliferación de las células gliales de Müller se deba, en parte, al efecto secundario que causa la interacción de la trombina con el EPR.

Ya se ha mencionado que el daño nervioso provoca la reactivación de la glia que responde proliferando, migrando, con cambios morfológicos, entre otras respuestas (Robel *et al.*, 2011; Vecino *et al.*, 2016). El daño, sea químico, mecánico o infeccioso, es percibido por la glia en general (Robel *et al.*, 2011) y, en las células gliales de Müller, se han descrito receptores que detectan el daño para responder en consecuencia (Kumar *et al.*, 2013); cuando esto ocurre, la glia de Müller secreta citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento (Kumar *et al.*, 2013). Los experimentos de *Wound Healing*, con el marcador de proliferación celular Ki-67, no mostraron ninguna preferencia por las células gliales de Müller a proliferar sólo en los límites de las heridas, en contraste, la proliferación es generalizada. Esto indica que la secreción de los factores que promueven la proliferación no ocurre de manera yuxtácrina, si acaso, la liberación de estos factores ocurre como una respuesta parácrina de factores que se difunden en el medio extracelular.

Capítulo 6

Conclusión

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que las células gliales de Müller son capaces de expresar a los cuatro receptores activados por proteasas (PAR1, PAR2, PAR3 y PAR4). Aunque la respuesta y la vía de señalización específicas para cada uno de estos receptores aún tienen que ser esclarecidas, este trabajo también demuestra que la glia de Müller responde de manera específica a la trombina. Lo anterior permite afirmar que por lo menos uno de los PARs está involucrado en la respuesta a la proliferación que la trombina provoca.

La glia de Müller es muy sensible a la activación por la trombina, tomando en cuenta el efecto en la migración como la respuesta generada ($EC_{50}=0.863$ nM). Particularmente interesante, es el hecho de que concentraciones cada vez más altas de trombina no generan una mayor respuesta. No obstante, la magnitud de la migración es claramente dependiente del tiempo del estímulo.

En este trabajo queda demostrado que la trombina provoca la proliferación celular, pero no la migración. Este es un punto importante por dos razones. La primera es que, en general, la glia se acumula en las zonas de daño tisular por dos mecanismos: la migración y la proliferación. Es claro que la reactivación promovida por la trombina sólo provoca la proliferación en la glia de Müller. Esto es relevante para entender la participación de la glia de Müller en la formación de las membranas epirretinales que ocurren en la VRP. El otro punto importante es que, a diferencia de las células del EPR, en las cuales, la trombina parece tener un efecto pleiotrópico, provocando así, la migración, la proliferación y la modificación morfológica (durante la transición epitelio-mesénquima), en el caso de la glia de Müller, el efecto parece sólo conducirse por alguna vía relacionada con la proliferación (la activación de la vía $G_i/PI3K$, por ejemplo). No es insensato considerar, por tanto, que existe un efecto de señalización convergente por parte de los PARs activados por proteasas (PAR 1,2 y 3), como sucede en la activación plaquetaria a través de los receptores PAR1 y PAR4, en humanos, o PAR3 y PAR4 ratones (Lin *et al.*, 2013; Nakanishi-Matsui *et al.*, 2000).

Por último, las células positivas para el marcador Ki-67 demuestran que el daño mecánico

provocado por una herida en las células de Müller, no promueve la migración por un efecto de secreción yuxtácrina por parte de las mismas células. En contraste, el factor que provoque la proliferación en la células es fácilmente difundido por el líquido intersticial, probablemente.

Tomados juntos estos resultados, a la luz de lo que se ha publicado sobre la actividad de la trombina durante la VRP y su efecto en el epitelio pigmentado (Palma-Nicolás *et al.*, 2010; Parrales *et al.*, 2010; Ruiz-Loredo *et al.*, 2011), es pertinente afirmar que la trombina es un factor crucial en el desarrollo de la VRP. De este modo, la trombina y sus efectores involucrados, son candidatos para convertirse en dianas de fármacos diseñados para el control de enfermedades proliferativas, como la VRP.

Referencias

- Alvarez-Buylla, A., García-Verdugo, J. M., y Tramontin, A. (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2(4):287–293.
- Anderson, D. H., Guerin, C. J., Erickson, P. A., Stern, W. H., y Fisher, S. K. (1986). Morphological recovery in the reattached retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 27(Feb):168–183.
- Asanuma, K., Wakabayashi, H., Hayashi, T., Okuyama, N., Seto, M., Matsumine, A., Kusuzaki, K., Suzuki, K., y Uchida, A. (2004). Thrombin inhibitor, argatroban, prevents tumor cell migration and bone metastasis. *Oncology*, 67(2):166–73.
- Bastiaans, J., van Meurs, J. C., Mulder, V. C., Nagtzaam, N. M. A., Smits-te Nijenhuis, M., Dufour-van den Goorbergh, D. C. M., van Hagen, P. M., Hooijkaas, H., y Dik, W. A. (2014). The role of thrombin in proliferative vitreoretinopathy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 55(7):4659–4666.
- Bode, W. (2006). Structure and interaction modes of thrombin. *Blood Cells, Mol. Dis.*, 36(2):122–130.
- Bridging, P., The, I. N., Of, I., Hirudin, W., y Mimics, I. T. S. (2014). Proton Bridging in the Interactions of Thrombin. 52(1):2472–2481.
- Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S. N., Osborne, N. N., y Reichenbach, A. (2006). Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog. Retin. Eye Res.*, 25(4):397–424.
- Burda, J. E. y Sofroniew, M. V. (2014). Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron*, 81(2):229–248.
- Canto, I., Soh, U. J. K., y Trejo, J. (2012). Allosteric modulation of protease-activated receptor signaling. *Mini Rev. Med. Chem.*, 12(9):804–811.
- Connolly, A. J., Ishihara, H., Kahn, M. L., Farese, R. V., y Coughlin, S. R. (1996). Role of the thrombin receptor in development and evidence for a second receptor. *Nature*, 381(June):516–519.

- Coughlin, S. R. (2000). Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*, 407(6801):258–264.
- Coughlin, S. R. (2005). Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost*, 3(8):1800–1814.
- Dunn, K. C., Aotaki-Keen, a. E., Putkey, F. R., y Hjelmeland, L. M. (1996). ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp. Eye Res.*, 62(2):155–169.
- Eroschenko, V. (2013). *Di Fiore's Atlas of Histology with functional correlations*. Wolters Kluwer-Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.
- Geller, S. F., Lewis, G. P., y Fisher, S. K. (2001). FGFR1, signaling, and AP-1 expression after retinal detachment: reactive Müller and RPE cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 42(May):1363–1369.
- Gerszten, R. E., Chen, J., Ishii, M., Ishii, K., Wang, L., Nanevicz, T., Turck, C. W., Vu, T. K., y Coughlin, S. R. (1994). Specificity of the thrombin receptor for agonist peptide is defined by its extracellular surface. *Nature*, 368(6472):648–651.
- Goldman, D. (2014). Müller glial cell reprogramming and retina regeneration. *Nat. Rev. Neurosci.*, 15(7):431–42.
- Guidry, C. (2010). Proliferative vitreoretinopathy. En Levin, L. y Albert, D., editores, *Ocul. Dis.*, volumen 48, cap tulo 78, pp. 612–617. Elsevier Inc.
- Hansen, K. K., Oikonomopoulou, K., Li, Y., y Hollenberg, M. D. (2008). Proteinases, proteinase-activated receptors (PARs) and the pathophysiology of cancer and diseases of the cardiovascular, musculoskeletal, nervous and gastrointestinal systems. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.*, 377(4-6):377–392.
- Hollenberg, M. D. (2003). Proteinase-mediated signaling: Proteinase-activated receptors (PARs) and much more. *Life Sci.*, 74(2-3):237–246.
- Hollenberg, M. D., Mihara, K., Polley, D., Suen, J. Y., Han, A., Fairlie, D. P., y Ramachandran, R. (2014). Biased signalling and proteinase-activated receptors (PARs): Targeting inflammatory disease. *Br. J. Pharmacol.*, 171(5):1180–1194.
- Ishihara, H., Connolly, A. J., Zeng, D. W., Kahn, M. L., Zheng, Y. W., Timmons, C., Tram, T., y Coughlin, S. R. (1997). Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans.

- Kahn, M. L., Zheng, Y. W., Huang, W., Bigornia, V., Zeng, D. W., Moff, S., Farese, R. V., Tam, C., y Coughlin, S. R. (1998). A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature*, 394(6694):690–694.
- Kumar, A., Pandey, R. K., Miller, L. J., Singh, P. K., y Kanwar, M. (2013). Muller glia in retinal innate immunity: a perspective on their roles in endophthalmitis. *Crit. Rev. Immunol.*, 33(2):119–35.
- Lee-Rivera, I., López, E., Parrales, A., Alvarez-Arce, A., y López-Colomé, A. M. (2015). Thrombin promotes the expression of *Ccnd1* gene in RPE cells through the activation of converging signaling pathways. *Exp. Eye Res.*, 139:81–89.
- Li, T. y Zhang, S. (2016). Microgliosis in the Injured Brain. *Neurosci.*, 22(2):165–170.
- Lin, H., Liu, A. P., Smith, T. H., y Trejo, J. (2013). Cofactoring and dimerization of proteinase-activated receptors. *Pharmacol. Rev.*, 65(4):1198–213.
- Lindqvist, N., Liu, Q., Zajadacz, J., Franze, K., y Reichenbach, A. (2010). Retinal Glial (Müller) Cells: Sensing and responding to tissue stretch. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 51(3):1683–1690.
- López-Colomé, A. M. (2005). Sistema visual. En Drucker-Colín, R., editor, *Fisiol. médica*, cap tulo 72, pp. 775–791. Editorial El Manual Moderno, México.
- Nagasaki, H., Shinagawa, K., y Mochizuki, M. (1998). Risk factors for proliferative vitreoretinopathy. *Prog. Retin. Eye Res.*, 17(1):77–98.
- Nakanishi-Matsui, M., Zheng, Y. W., Sulciner, D. J., Weiss, E. J., Ludeman, M. J., y Coughlin, S. R. (2000). PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature*, 404(6778):609–613.
- Noorbakhsh, F., Vergnolle, N., Hollenberg, M. D., y Power, C. (2003). Proteinase-activated receptors in the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.*, 4(12):981–990.
- Nystedt, S., Emilsson, K., Wahlestedt, C., y Sundelin, J. (1994). Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91(September):9208–9212.
- Nystedt, S., Larsson, A.-K., Aberg, H., y Sundelin, J. (1995). The Mouse Proteinase-activated Receptor-2 cDNA and Gene. *J. Biol. Chem.*, 270(March):5950–5955.
- Palma-Nicolas, J. P., López, E., y López-Colomé, A. M. (2008). PKC isoenzymes differentially modulate the effect of thrombin on MAPK-dependent RPE proliferation. *Biosci. Rep.*, 28:307–317.

- Palma-Nicolás, J. P., López, E., y López-Colomé, A. M. (2010). Thrombin stimulates RPE cell motility by PKC- ζ - and NF- κ B-dependent gene expression of MCP-1 and CINC-1/GRO chemokines. *J. Cell. Biochem.*, 110(4):948–959.
- Parrales, A., Palma-Nicolás, J. P., López, E., y López-Colomé, A. M. (2010). Thrombin stimulates RPE cell proliferation by promoting c-Fos-mediated cyclin D1 expression. *J. Cell. Physiol.*, 222(2):302–312.
- Pastor, J. C., De La Rúa, E. R., y Martín, F. (2002). Proliferative vitreoretinopathy: Risk factors and pathobiology. *Prog. Retin. Eye Res.*, 21(1):127–144.
- Puro, D. G., Mano, T., Chan, C. C., Fukuda, M., y Shimada, H. (1990). Thrombin stimulates the proliferation of human retinal glial cells. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 228(2):169–173.
- Ramachandran, R. y Hollenberg, M. D. (2008). Proteinases and signalling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more. *Br. J. Pharmacol.*, 153 Suppl:S263–82.
- Reichenbach, A. y Bringmann, A. (2012). Cell Biology of the Müller Cell. En Ryan, S., Schachat, A., Wilkinson, C., y Hinton, D., editores, *Retina*, p. 2564. Elsevier Inc., China.
- Reichenbach, A. y Bringmann, A. (2013). New functions of Müller cells. *Glia*, 61(5):651–678.
- Robel, S., Berninger, B., y Götz, M. (2011). The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. *Nat. Rev. Neurosci.*, 12(2):88–104.
- Ruiz-Loredo, A. Y., López, E., y López-Colomé, A. M. (2011). Thrombin promotes actin stress fiber formation in RPE through Rho/ROCK-mediated MLC phosphorylation. *J. Cell. Physiol.*, 226(2):414–423.
- Seminario-Vidal, L., Kreda, S., Jones, L., O'Neal, W., Trejo, J. a., Boucher, R. C., y Lazarowski, E. R. (2009). Thrombin promotes release of ATP from lung epithelial cells through coordinated activation of Rho- and Ca²⁺-dependent signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, 284(31):20638–20648.
- Shechter, R., London, A., y Schwartz, M. (2013). Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates. *Nat Rev Immunol*, 13(3):206–218.
- Soh, U. J., Dores, M. R., Chen, B., y Trejo, J. (2010a). Signal transduction by protease-activated receptors. *Br. J. Pharmacol.*, 160(2):191–203.
- Soh, U. J., Dores, M. R., Chen, B., y Trejo, J. (2010b). Signal transduction by protease-activated receptors. *Br. J. Pharmacol.*, 160(2):191–203.

- Soto, A. G., Smith, T. H., Chen, B., Bhattacharya, S., Cordova, I. C., Kenakin, T., Vaidehi, N., y Trejo, J. (2015). N-linked glycosylation of protease-activated receptor-1 at extracellular loop 2 regulates G-protein signaling bias. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 112(27):E3600–E3608.
- Stern, J. y Temple, S. (2015). Retinal pigment epithelial cell proliferation. *Exp. Biol. Med.*, 240:1079–1086.
- Swaroop, A., Kim, D., y Forrest, D. (2010). Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. *Nat. Rev. Neurosci.*, 11(8):563–576.
- Tortora, G. y Derrickson, B. (2006). *Principios de Anatomía y Fisiología*. Editorial Médica Panamericana, México.
- Vecino, E., Rodriguez, F. D., Ruzafa, N., Pereiro, X., y Sharma, S. C. (2016). Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Prog. Retin. Eye Res.*, 51:1–40.
- Vu, T. K., Hung, D. T., Wheaton, V. I., y Coughlin, S. R. (1991). Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, 64(6):1057–1068.
- Wiedemann, P., Yandiev, Y., Hui, Y.-n., y Wang, Y. (2013). *Pathogenesis of Proliferative Vitreoretinopathy*. Elsevier Inc., quinta edición.
- Wojtukiewicz, M. Z., Hempel, D., Sierko, E., Tucker, S. C., y Honn, K. V. (2015). Protease-activated receptors (PARs)—biology and role in cancer invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, pp. 775–796.
- Xu, W.-F., Andersen, H., Whitmore, T., Presnell, S., Yee, D., Ching, A., Gilbert, T., Davie, E., y Foster, D. (1998). Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95(June):6642–6646.
- Zhao, P., Metcalf, M., y Bunnett, N. W. (2014). Biased signaling of protease-activated receptors. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 5(MAY):1–16.